

Biotecnologia aplicada ao estudo da lignificação

Kelly Carla Almeida de Souza¹ e Heber dos Santos Abreu²

^{1,2}*Departamento de Produtos Florestais-Instituto de Florestas
-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - abreu@ufrjr.br - - almeida_kc@yahoo.com.br*

Recebido em 08 de Março de 2007

Resumo

A lignina apresenta funções relevantes no reino vegetal, como o aumento da resistência nas plantas, condução e defesa. Além disso, a lignina desenvolveu formas de suporte para as plantas se erguerem em direção oposta à gravidade. Por apresentar características que influenciam a sobrevivências das plantas, assim como também nos processos da indústria de base florestal. O interesse de estudar o processo de lignificação atualmente envolve técnicas que a biotecnologia oferece como: a calogênese e células em suspensão em função da utilização de fitorreguladores como auxinas e citocininas. 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) por exemplo, tem sido o fitorregulador mais importante na atenuação da lignificação em calos e em células em suspensão, com diferentes meios de cultura e com diferentes espécies. O processo de lignificação que envolve estádios de formação diferentes inclui a via pré-corísmica e fenilpropanoídica, é pesquisado em células tanto na condição de calo como na condição de células em suspensão, possibilitando condições viáveis de estudo do processo de lignificação.

Palavras-chaves: 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), lignina, suspensão celular

Biotechnology applied to the study of lignification

Abstract

Lignin presents important functions for plants as resistance, conduction and defense. In additions, this compound developed support for plants to grow up against the gravity. The lignin has many positive characteristic that can influence the plant life and this has open great interest to study the lignification process in cells, and the industrial process from the forest technology industrial. Through the biotechnology techniques as calogenesis and suspension cell, different growth regulator concentration were tested. 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), for example, has been considered the most important phyto regulator in the regulation of the lignification in callus and in suspension cells in the different culture medium and with several kind of plant. The lignification process, that involve different steps on lignin formation, includes the pre-corismatic and phenylpropanoids ways, and has been researched in the callus and suspension cell conditions. All those tools can be viable for the study of the lignification process.

Key words: 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), lignin, cell suspension

Introdução

Lignina é uma classe de substâncias macromoleculares que apresenta funções relevantes no reino vegetal, conferindo resistência à força de compressão, como um agente cimentador, de condução, de defesa física e química contra fatores bióticos e abióticos do ambiente. Sua existência foi imprescindível na adaptação das plantas há milhares de anos atrás, no período em que plantas aquáticas passaram para o ambiente terrestre (Stumpf & Conn, 1981). A lignina desenvolveu formas de suporte para as plantas se erguerem em direção oposta à gravidade. À medida que as plantas foram evoluindo, a composição da lignina foi modificando-se e se tornando menos complexa sob o ponto de vista estrutural, apresentando uma estrutura mais linear, como é o caso das ligninas de angiospermas (Abreu et al., 1999). Hoje os cientistas, com base nas características intrínsecas às ligninas, procuram ajustá-las à realidade da necessidade do desenvolvimento tecnológico, econômica e ambiental. Dentro destas possibilidades, a biotecnologia tem sido a ferramenta para o desenvolvimento de alternativas biológicas de novos materiais vegetais, assim como a obtenção de produtos de interesse da humanidade.

Atualmente várias aplicações de técnicas de biotecnologia celular de plantas têm sido utilizadas, a começar pela clonagem seguida pela cultura de células, a qual inclui suspensões celulares em meio líquido. A suspensão celular apresenta grande importância para a produção de metabólitos especiais entre outros, como é o caso da lignina, a qual pode ser produzida em meio líquido através da liberação de monolignóis e peroxidase.

A cultura de células em suspensão fornece excelentes informações para o estudo do metabolismo secundário; simples alterações no meio de crescimento freqüentemente resultam em expressões de uma via metabólica específica. Uma dessas informações é a via dos fenilpropanóides, que participa da formação de várias substâncias como flavonóides e lignina. A técnica de cultura de tecidos permite avaliar os efeitos fisiológicos dos nutrientes, os efeitos dos reguladores de crescimento e outros constituin-

tes químicos pertinentes ao processo de formação dos precursores e da formação da lignina.

As pesquisas relacionadas à cultura de células em suspensão são realizadas mediante a utilização de vários protocolos. Um dos meios mais utilizados para tal é o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), que tem se apresentado com bons resultados nos trabalhos com culturas de *Eucalyptus* (Torres & Caldas, 1990). No entanto, a utilização do meio LD (Liane & David, 1994) tem-se mostrado também eficiente para produção de calos da espécie *Eucalyptus urophylla*.

Um exemplo de pesquisa para viabilizar a produção de metabólitos fenilpropanóides tem sido a cultura de células em suspensão de *Glicine max* L., por (Hahlbrock et al., 1980), embora estudos detalhados de lignificação em cultura de células dessa planta não tenham sido publicados anteriormente. Hosel et al., (1982) foram capazes de induzir a lignificação nas células desta espécie por modificação na concentração de hormônios no meio de cultura. O mesmo ocorreu com a espécie *Pinus taeda*, para estudo de lignificação através da técnica de cultura de células em suspensão, variando a concentração do fitorregulador 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Eberhardt et al., 1993). A cultura de células desenvolveu papel semelhante quanto à indução da lignificação em células de *Pinus radiata* (Moller et al., 2006). Em *Arabidopsis* a técnica de suspensão celular foi eficiente para o estudo da biossíntese de um outro produto do metabolismo secundário, o ascorbato, um derivado do ácido ascórbico (Davey et al., 1999).

Outras pesquisas sobre culturas de células foram realizadas com espécies de gimnospermas e angiospermas, em que a lignificação foi aparentemente induzida de várias maneiras, com mudanças nos reguladores de crescimento, tipo de meio de cultura e ativação por fungos (Ramsden & Northcote, 1987; Campbell & Ellis, 1992; Nimz et al., 1975; Robert et al., 1989).

No meio de cultura é imprescindível que haja um balanço entre os reguladores de crescimento, ou seja, uma interação eficiente entre auxinas e citocininas.

No entanto, esta interação também depende da espécie, do tipo de tecido utilizado na cultura e idade do tecido. Ao utilizar explantes de plantas adultas, as respostas a um regulador de crescimento são modificadas em relação ao tecido jovem. Os explantes foliares de *Eucalyptus urophylla*, por exemplo, ao serem submetidos a fitorreguladores respondem de forma considerável através da produção de calos.

A formação de calos tem sido obtida de forma considerável através do uso do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), uma auxina sintética que auxilia no desenvolvimento do calo.

Uma das dificuldades em estudar os processos que acompanham a lignificação em plantas lenhosas é que as células diferem muito entre si no desenvolvimento da parede. A lignificação é um processo que tem sido muito estudado em calos e em células em suspensão, sendo induzida por balanço hormonal, atividades enzimáticas, utilização de fungos como agentes ativadores desse processo, para os mais variados fins (Moller et al., 2006). Um dos aspectos mais relevantes no estudo da lignificação com aplicação da biotecnologia é o entendimento de como esse processo se inicia, permitindo obter informações sobre o tipo de lignina formada, a topoquímica e sua arquitetura molecular adquirida, para diferentes espécies vegetais.

Bioquímica da lignificação

Em 1933, Erdtman postulava que a lignina era formada por desidrogenação enzimática dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Esta hipótese foi, mais tarde, confirmada e elaborada por um dos experimentos de Freudenberg (1959) através da polimerização do álcool *p*-cumarílico *in vitro* com a enzima lacase ou peroxidase (Grisebach, 1977). A biossíntese da lignina pode ser dividida em duas etapas, a enzimática e a semi-enzimática. No primeiro caso a fenilalanina amônio liase (FAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), e ácido cafeico O-metiltransferase (COMT), assim como enzimas específicas como cinamoil-CoA redutase (CCR) e cinamil ál-

cool desidrogenase (CAD) (Ramos et al., 2001) são enzimas do caminho fenilpropanoíde.

A biossíntese das ligninas envolve uma adequação coordenada de três fases biossintéticas: a fase pré-corísmica, a fase fenilpropanoídica e a fase da polimerização da lignina. A fase pré-corísmica é a via responsável pela formação dos ácidos chiquímico e corísmico, os quais são importantes em uma variedade de produtos essenciais (Herrmann, 1995).

A via geral dos fenilpropanoídes começa com a formação a partir da presença de fenilalanina e envolve sucessivas reações de hidroxilação de anéis aromáticos, seguidas de O-metilação fenólica e conversão do grupo carboxílico a álcool (Boerjan, et al., 2003) resultando no ácido cinâmico (Barber & Mitchell, 1997). O primeiro passo dessa via inicia-se com uma reação catalisada pela enzima fenilalanina amônio-liase (FAL) pela eliminação do grupo NH₃ da fenilalanina ou do ácido orogênico (Ramos, et al., 2001; Lewis & Sarkanen, 1998) para resultar em monolignóis. Nas plantas esta enzima está localizada tanto no citoplasma quanto nas organelas. O metabolismo dos fenilpropanoídes é definido como a seqüência de reações envolvendo a conversão da fenilalanina para ativar o ácido cinâmico (Hahlbrock & Grisebach, 1975).

A reação de formação do ácido cinâmico também pode ser catalisada por outra enzima, a tirosina amônio-liase (TAL), ou seja, quando ocorre eliminação do grupo NH₃ do ácido aminado tirosina. Estas enzimas catalisam a trans-eliminação da amônia da fenilalanina ou da tirosina para formar o ácido trans cinâmico e o *p-trans* cinâmico (Whetten et al., 1998). Essa transaminação, troca da carbonila pelo grupo NH₂, ocorre no ácido orogênico. Há interesse em formar grupos NH₂, os quais fazem parte dos ácidos aminados fenilalanina e tirosina, substâncias iniciais no processo de formação da lignina. Essas enzimas são enzimas regulatórias “chaves” e um dos principais pontos de controle do metabolismo secundário dos vegetais (Bell, 1981). A FAL é uma enzima tetramérica, com dois sítios ativos por molécula (Bolwell, 1988). Aparentemente, as isoenzimas isoladas individualmente apresentam cinética de

Michaelis-Menten, mas em conjunto apresentariam cooperatividade negativa (Whetten & Sederoff, 1995). Sua atividade é influenciada por vários fatores externos e internos, como: hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por patógenos e ferimentos. A invasão de fungos, por exemplo, induz a transcrição do RNAm que codifica para essa enzima, aumentando assim sua síntese “de novo” e, conseqüentemente, estimulando a produção de substância fenólica (Jones, 1984).

A partir do ácido cinâmico são produzidos diversos fenilpropanóides simples, via uma série de reações de hidroxilação, metilação e desidratação, tais como os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e as cumarinas simples, além dos ácidos salicílico, benzóico e *p*-hidroxibenzóico que, embora tenham perdido uma cadeia lateral de carbono, também se originam do cinamato e *p*-cumarato (Dixon & Paiva, 1995).

O ácido *p*-cumárico sofre uma hidroxilação na posição 3 pela *p*-cumarato-3- hidroxilase e forma o ácido cafeico. Enzimas que podem atuar nesta reação de hidroxilação *in vitro* têm sido purificadas, mas não existem evidências que suportam a via fisiológica destas enzimas na biossíntese de monolignóis *in vivo* (Whetten & Sederoff, 1995).

Através da enzima O-metiltransferase (OMT) o ácido cafeico sofre uma metilação na hidroxila de posição 3 para produzir o ácido ferúlico.

O ácido ferúlico pode ser ativado pelo 4-cumarato-CoA ligase (4CL) através da conjugação com a coenzima A e os tioésteres CoA são presumidos como intermediários da síntese do álcool coniferílico e do álcool *p*-cumarílico, respectivamente. Um destino alternativo para o ácido ferúlico, é a hidroxilação na posição 5 por outra enzima hidroxilase (P450), a ferulato-5-hidroxilase. O ácido 5-hidroxiferúlico pode ser metilado pela enzima O-metiltransferase produzindo, dessa maneira, o ácido sinápico. Em muitos casos o ácido sinápico, no entanto, tem sido mostrado como um substrato pobre para purificar enzimas *in vitro* (Gross et al., 1975; Kutsuki et al., 1982; Lüderitz et al., 1982; VOO et al.,

1995).

Tanto os ácidos *p*-cumárico, ferúlico quanto o sinápico são transformados em álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente, os quais na parede celular sofrem oxidação e depois polimerizam resultando na lignina.

Neste processo de polimerização atuam as enzimas lacases ou peroxidases e isoenzimas correspondentes. A participação destas enzimas na formação da lignina foi também estimada por Harking & Obst em 1973. A fase final de formação da lignina ocorre na parede celular através de uma oxidação desidrogenativa dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Boudet et al., 1995; Whetten et al., 1998; Freudenberg, 1959).

A deposição da lignina se inicia na parede primária e na lamela média, se estendendo através da parede secundária em direção ao lúmen (Donaldson, 2001). O fenômeno da lignificação também pode ser decorrente de uma resposta ativa das plantas à invasão por patógenos (Hammerschmidt & KUC, 1982; Busam et al., 1997-b; Sticher et al., 1997). Acumulam-se evidências também de que se constitui em importante mecanismo de defesa (Vance et al., 1980; Hammerschmidt & Kuc, 1982; Agrios, 1997; Busam et al., 1997-a; Sticher et al., 1997;).

A lignina pode ser diferente entre espécies, tecidos, estádios de desenvolvimento e localização celular. Essas variações podem resultar das diferenças das atividades enzimáticas com o substrato específico das angiospermas e gimnospermas (Lewis & Yamamoto, 1990). Assim a lignina possui composição diferente para pteridófitas, gimnospermas, angiospermas (monocotiledôneas e dicotiledôneas). Corresponde a um total de cerca de 30% para coníferas e cerca de 25 % para dicotiledôneas de zona temperada (Mendes & Alves, 1986). A lignina é detectada em maior quantidade na camada S2 da parede secundária, sobretudo nas fibras, vasos e traqueídeos do xilema, dotando-os de rigidez, suporte mecânico, impermeabilidade, permitindo o transporte de água e solutos. Ela também é encontrada, em menor quantidade, na periderme associada à suberina onde age como uma barreira contra patógenos (Higuchi,

1984; Studart-Guimarães et al, 2003).

O papel dos fitorreguladores em meio de cultura

A adição de fitorreguladores tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. Ao mesmo tempo a adição de fitorreguladores estimula certas respostas como o alongamento ou multiplicação da parte aérea. Essa resposta depende do estado fisiológico dos explantes, o que está relacionado com a época do ano e com o estado geral da planta-matriz (Altman & Goren, 1977).

Segundo Xu & Bewley (1992), as auxinas, em particular o ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) são extremamente importantes na indução da calogênese e células embriogênicas e na posterior remoção da auxina do meio de cultura. Estas células formam embriões somáticos. Além disso, o 2,4-D possui uma aplicação relevante no estudo da lignificação através de células em suspensão de várias espécies e com os mais variados objetivos (Eberhardt et al., 1993).

As auxinas são produzidas principalmente nas regiões apicais que, transportados para outros locais da planta, participam do seu crescimento e diferenciação. Esses fitorreguladores podem ser necessários para complementar o teor endógeno ou suprir as necessidades de meristemas isolados (Smith & Murashige, 1970). As zonas produtoras de auxina não são propriamente os meristemas, e sim os primórdios foliares e as folhas em expansão. Isto poderia explicar a razão pela qual a auxina não é tão necessária, quando gemas maiores são utilizadas para o cultivo.

As auxinas são usadas para reativar o ciclo da célula e iniciar a formação do embrião e são utilizadas em concentrações muito baixas. Porém, um outro regulador tem se mostrado muito eficiente, é o caso do TDZ [1-fenil-3-(1,2,3- tiadiazol-5-il)uréia], uma citocinina sintética que induz a acumulação de auxinas e citocininas endógenas no tecido (Murthy et al., 1995).

As concentrações influenciam na multiplicação

in vitro, onde normalmente a melhor faixa fica entre 0,5 e 5,0mg/L para ambos fitorreguladores (Morales et al., 1999).

Para o estabelecimento de um controle eficiente no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*, é necessário um balanço adequado entre auxinas e citocininas (Wagner Junior et al., 2003). Normalmente, as concentrações de auxinas são inferiores às das citocininas, mantendo o balanço auxina /citocinina menor que 1 (Pierik, 1990).

Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre a formação de raízes. Na situação oposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida (Krikorian, 1995).

Grattapaglia & Machado (1990) descreveram a indução da calogênese em meio com altas concentrações de auxinas, sendo 2,4-D um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos (Ammirato, 1983). Contudo, Huetteman & Preece (1993) citam o TDZ (tiadiazuron) como um excelente estimulante para a formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1,0 mM.

Alguns autores citam a influência do TDZ na formação de calos, como Wilhelm (1999), que mencionou o fato de que concentrações mais altas dessa citocinina proporcionaram a produção de calos mais volumosos.

Segundo Kaneda et al., (1997), a melhor performance do TDZ, aparentemente, pode estar relacionada à maior atividade citocinínica ou a forma de ação diferente de outras citocininas durante o processo de desdiferenciação e rediferenciação celular, como também ao fato de o TDZ induzir a acumulação de auxinas e citocininas endógenas no tecido (Murthy et al., 1995).

Assim como o TDZ, que apresenta respostas consideráveis para a formação de calos, o 2,4-D se mostrou eficiente ao permitir formação de calos em todos os tratamentos com concentrações variando de 0 a 15 µM em duas cultivares de morangueiro, exceto naqueles isentos das auxinas 2,4-D (Flores et al., 1998).

Embora o 2,4-D tenha se mostrado eficiente na produção de calos, Murthy et al. (1998) cita a melhor performance do TDZ em relação a outros reguladores de crescimento na proliferação de tecido calogênico.

Velho et al., (1988) e Ferreira et al., (2001) mostraram que o cupuaçu não tem apresentado dificuldades para gerar calos usando-se o meio MS com a adição de baixas concentrações de 2,4-D, sendo a eficiência na emissão de calos aumentada pela adição de ANA (ácido α -naftalenoacético).

De acordo com Venturieri & Venturieri (2004), o TDZ não produziu melhoras na indução de calos desejáveis para virem a ser aproveitados para a organogênese ou embriogênese somática do híbrido de *T. grandiflorum* x *T. obovatum* diferentemente do que foi observado para o cacau por LI et al., (1998).

No entanto, Alves et al., (2004) citam que os melhores resultados para calejamento foram constatados nos tratamentos com os reguladores de crescimento TDZ e ANA. A vantagem da utilização dos reguladores de crescimento TDZ e ANA foi citada por LU (1993), cujos estudos indicaram que o TDZ apresenta maior eficiência na presença de ANA. Contudo, esse autor citou que longas exposições ao TDZ não são recomendadas, pois podem causar hiper-hidricidade, crescimento anormal de gemas e dificuldade no enraizamento.

Segundo Luczkiewicz et al., (2002), modificações no tipo e na concentração da auxina no meio de cultura, provaram que o 2,4-D foi o regulador de crescimento que estimulou o crescimento de calos de *Rudbeckia hirta* L. de forma mais acentuada. Uma outra correlação direta entre crescimento de calos e concentração de auxina foi observada na presença de ANA e IBA (ácido indol-3-butírico).

Conforme Akita et al., (2000), as células dos calos provenientes dos segmentos de hipocótilos de *Beta vulgaris* tiveram um crescimento rápido e uniforme na presença de 10^{-7} M de 2,4-D, sendo esta auxina eficiente na produção de metabólitos secundários como a betacianina.

De acordo com Palú et al., (2004) houve uma

interação significativa para 2,4-D e cinetina na indução de calos para a cultivar Acaia Cerrado (uma cultivar de café - *Coffea arabica* L.), enquanto, para massa de calos frescos, somente houve efeito significativo dos fatores isolados. Conforme este mesmo autor, o aumento da produção de calos ocorreu até a concentração de 2 mg/L de 2,4-D, ponto a partir do qual o regulador de crescimento passou a inibir a produção de calos, provavelmente devido a um efeito fitotóxico promovido por concentrações superiores a essa. A melhor resposta para indução de calos foi promovida pela interação entre 2,4-D (2 mg/L) e cinetina (1,9 mg/L).

As concentrações dos fitorreguladores variam muito de espécie para espécie e em função do que se quer obter, em alguns casos a concentração de 0,5 mg/L de 2,4-D produz calos. Contudo HUAN et al., (2004), trabalhando com formação de calos e regeneração de plantas através de estruturas de embriões somáticos em *Cymbidium*, perceberam a morte de todos os explantes quando utilizou somente 2,4-D ou combinado com TDZ.

Níveis elevados de 2,4-D aumentaram consideravelmente a friabilidade de calos embriogênicos de *Cymbopogon martinii* (Patnaik et al., 1997), e segundo Baruah & Bordoloi (1989), suplementos orgânicos, como a caseína hidrolisada, não foram necessários para a produção de calos embriogênicos friáveis.

Calos formados em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,5 mg/L de cinetina foram capazes de atuar na biossíntese de lignina, ao receberem tratamentos com ácido sinápico e ferúlico (Hamada et al., 2003). Isso mostra que o 2,4-D é de grande importância na calogênese por ser capaz de produzir calos para os mais diversos objetivos.

Falco et al., (1996) trabalhando com cana de açúcar, tiveram respostas consideráveis ao inocular segmentos foliares no meio MS para calo suplementado com 1, 2 ou 3 mg/L de 2,4-D.

Calogênese e Células em suspensão

Um calo consiste de uma massa desorganizada

de células e parcialmente diferenciada que varia quanto ao tipo, tamanho, conteúdo e espessura da parede celular. Traqueídeos, células parenquimáticas, tecido cambial e periderme podem ser formadas durante a calogênese (Narayanaswamy, 1977). Frequentemente um calo é formado a partir de explante de raízes ou de caule. Embora, maior ênfase tenha sido dada para tecidos de angiospermas, a formação de calos tem sido observada também em Gimnospermas e Pteridófitas (Yeoman & Macleod, 1977).

Através de injúrias mecânicas, calos podem ser produzidos por tecidos de plantas contaminados por certos microrganismos (Braun, 1954). Ao utilizar a técnica de cultura de tecido, a formação de calos pode ser induzida em vários tecidos ou órgãos de plantas que não são usualmente responsáveis pelo desenvolvimento de calos (Street, 1969).

Em geral, o crescimento de calo envolve uma complexa relação entre o material utilizado como explante, a composição do meio e a condição propícia para simular o ambiente natural das plantas durante o período de incubação. O estabelecimento dos calos a partir dos explantes pode ser dividido em três fases: indução, divisão celular e diferenciação. Durante a fase de iniciação o metabolismo é estimulado e as células se preparam para a divisão. O tempo de duração desta fase depende principalmente do estado fisiológico do explante, assim como da condição do meio de cultura. Na seqüência, existe uma fase de ativação da divisão celular, na qual o explante celular é revertido para um estágio meristemático. A terceira fase envolve o aparecimento da diferenciação celular e a expressão da trajetória de metabólitos para a formação de produtos secundários (Aitchison, 1977). Certos aspectos da acumulação de produtos secundários como resposta da diferenciação da cultura de calos têm sido revisados (Yeoman et al., 1982).

Alguns calos são fortemente lignificados e passam a apresentar uma textura mais rígida, fazendo com que estes sejam “quebrados” com maior facilidade em pequenos fragmentos. Quando são facilmente separados são denominados calos friáveis. Podem apresentar colorações amareladas, brancas,

verdes ou pigmentadas com antocianina, essa pigmentação pode ser uniforme em toda a extensão do calo, ou algumas regiões podem permanecer sem pigmento (Dodds & Roberts, 1985).

Um dos grandes problemas que envolvem a cultura de calos é a oxidação, principalmente quando se trabalha com espécies lenhosas. Entretanto, várias substâncias podem ser usadas como antioxidante. O PVP, por exemplo, é uma poliamida utilizada em cromatografia de separação de ácidos aromáticos, aldeídos e fenóis pela sua função adsorvente por meio de ligações de ponte de hidrogênio, o que previne a oxidação e a polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica (Teixeira, 2001). Para prevenir a oxidação em explantes de oliveira, Rugini (1990) adicionou 200 mg/L de glutatona reduzida. Visando inibir a oxidação fenólica, Söndahl & Sharp (1977) adicionaram 10 a 50 mg/L de cisteína-HCl ao meio de cultura. Um outro antioxidante utilizado com menor frequência é o ditiotreitol (Ziv & Halevy, 1983).

Essa oxidação é observada pelo escurecimento que pode ocorrer antes mesmo dos calos serem formados, ainda na fase de explantes quando os tecidos são lesados, tornando-se um sério problema. Para reduzir o escurecimento, diversas técnicas são utilizadas durante o preparo do explante e do meio de cultura bem como na fase de incubação. Segundo Pasqual et al., (1997), a oxidação é menos severa em meio diluído do que em um outro com alta concentração de sais, como o meio MS. Substâncias antioxidantes, como o ácido cítrico e o ácido ascórbico, são também utilizadas para reduzir a oxidação em cultura in vitro. As substâncias antioxidantes agem pela remoção do oxigênio de outras moléculas (varredor de peróxido de hidrogênio) e também atuam por mecanismos alternativos. Provavelmente, o ácido cítrico atua como um agente quelante, retendo íons de metal, que são necessários para ativar enzimas oxidativas (Pasqual et al., 1997).

Para prevenir a ação polifenólica em *Musa AAB.*, Utino et al., (2001) adicionaram ácido cítrico, ácido ascórbico e carvão ativado, separadamente, ao meio. Dentre estes, o ácido ascórbico tem sido

o mais utilizado (Vuylsteke & De Langhe, 1985; Gupta, 1986; Lameira, 1987; Souza & Gonçalves, 1996). Gupta (1986) verificou que o ácido ascórbico foi mais efetivo do que o ácido cítrico e o carvão ativado, na concentração de 25 mg/L. O escurecimento de explantes é mais visível em meio sólido, pois as substâncias fenólicas exudadas para o meio acumulam-se ao redor do explante.

Assim, a técnica eficiente para evitar o escurecimento dos tecidos é transferir os explantes, frequentemente, para um novo meio. O intervalo entre transferências deve ser ajustado de acordo com o grau de oxidação, pois o escurecimento é particularmente mais intenso na fase inicial do estabelecimento e decresce com o tempo (Pasqual et al., 1997; Vuylsteke, 1989), porém pode levar tanto o explante como o calo à morte.

Landa et al., (2000) inocularam explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) tanto na presença quanto na ausência de luz e observaram que a formação de calos na presença de luz foi melhor que no escuro inicialmente, porém a partir do vigésimo dia de inoculação o desenvolvimento dos calos cultivados no escuro foi melhor até a avaliação final aos 60 dias. Porém, com intuito de obter a biotransformação de substâncias fenólicas a partir de células em suspensão de *Catharanthus roseus*, Shimoda et al., (2002), fizeram a indução de calos na presença de luz.

Para *Copaifera* sp, a formação de calos apresentou respostas em total ausência de luz num período de 45 dias (Oliveira et al., 2001). Já a espécie *Fragaria* sp teve seus explantes inoculados ao meio de indução de calos em um fotoperíodo de 16h (Flores et al., 1998).

A produção de metabólitos secundários de interesse comercial a partir de culturas bacterianas influenciou na cultura de células em suspensão, a partir de regiões das plantas onde esses metabólitos são produzidos (Berlin, 1988; Sakuta & Komamine, 1987). Embora esse trabalho tenha sido bem sucedido, existem muitos insucessos na produção de produtos secundários (Berlin, 1988). A principal razão para estes insucessos é a falta de conhecimento so-

bre os mecanismos reguladores da formação de metabólitos secundários (Sakuta & Komamine, 1987).

Quando a estabilidade genética é alcançada, é necessário abrigar as diferentes linhas de calos de acordo com as suas respostas para prover uma eficiente produção de metabólito. Portanto, cada calo deve ser analisado separadamente pela sua velocidade de crescimento assim como as concentrações dos metabólitos intra e extracelulares. Isso permite uma avaliação da produtividade de cada célula, logo somente as melhores serão levadas para a etapa de célula em suspensão (Bourgaud, et al., 2001).

Comparado ao crescimento cinético da célula, o qual é usualmente uma curva exponencial, muitos metabólitos secundários são produzidos durante a fase de platô. Esta falta de produção durante os estágios anteriores pode ser explicada pela alocação do carbono principalmente distribuído pelo metabolismo primário (construção das estruturas da célula e respiração) quando o crescimento é muito ativo. Por outro lado, quando o crescimento pára, o carbono não é mais requerido em grandes quantidades para o metabolismo primário e as substâncias especiais são mais ativamente sintetizadas. Isto pode ser frequentemente observado em novas atividades enzimáticas, aparecendo durante a fase de platô. Isto tem levado muitos autores a explicar a possível diferenciação bioquímica das células quando a fase de crescimento termina (Payne et al., 1991). No entanto, alguns produtos secundários são conhecidos por ter um crescimento associado com células indiferenciadas, como é o caso das betalainas e dos carotenóides.

Células em suspensão constituem um bom material biológico para o estudo das vias biossintéticas. Realmente, comparado com culturas de calos, a suspensão permite a recuperação de grandes quantidades de células a partir de enzimas que podem ser mais facilmente isoladas (Dougall, 1981). Muitas estratégias podem ser usadas para aumentar a produção de metabólitos secundários, mas a elicitação é usualmente uma das mais sucedidas: consiste em aplicar estresse físico ou químico na cultura de célula em suspensão que dará início a produção de

metabólitos secundários que não são produzidos normalmente. Isto é feito com ativadores bióticos (micélio de fungo patogênico, vários extratos de proteínas, entre outros) ou abióticos (temperatura, luz UV, metais pesados, pH, etc.) (Bourgaud, et al., 2001).

A suspensão celular vegetal tem sido também adotada como uma ferramenta no estudo da fisiologia de todos os tipos de outros processos celulares, por exemplo, divisão celular, respiração (Snape, et al., 1989; Hoefnagel, et al., 1993), sinalização hormonal (Leguay & Guern, 1975; Nishinari & Yamaki, 1976), armazenamento (Vogel & Brodelius, 1984), e transporte (Deus-Neuman & Zenk, 1986; Wink & Mende, 1987; Blom, et al., 1991).

Após serem formados, os calos são transferidos para o meio MS líquido (Murashige & Skoog, 1962) para iniciação de cultura em suspensão. Segundo Simola, et al., (1992), não é necessário adicionar nitrogênio orgânico ao meio líquido, e o pH tem que ser ajustado para 5,6 antes do meio ser autoclavado apresentando bons resultados.

Durante o processo de células em suspensão, os metabólitos primários e secundários são formados e muitas vezes são excretados ao meio de crescimento. Essa técnica permite o desenvolvimento de experimentos *in vitro* para sanar algumas questões relacionadas ao sistema de polimerização das ligninas e a participação das proteínas estruturais neste processo.

Independentemente da espécie a ser utilizada, é essencial que as células da suspensão se dividam e se multipliquem ativamente. A divisão celular é um componente do ciclo celular, e possui as seguintes fases: G1, S, G2, M e citocinese (Street & Opik, 1970).

Este processo é utilizado para a obtenção e proliferação de células em meio líquido, sob condição de agitação contínua, para evitar possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura, além de ser uma técnica eficiente de multiplicação rápida. As suspensões celulares têm uma grande aplicação para os estudos de bioquímica, genética, citologia, fisiologia vegetal e fitopatologia, também sendo um tipo de cultivo empregado na produção de metabóli-

tos secundários ou material clonal em escala comercial pela utilização de biorreatores (Pereira & Melo, 2004).

Inicialmente, considerava-se que células não diferenciadas como cultura de calos ou de células em suspensão, não eram eficazes para o estudo de qualquer tipo de metabólito secundário (Krikorian & Steward, 1969). No entanto, Zenk (1991) demonstrou que essa teoria estava errada, ao observar que cultura de células de *Morinda citrifolia* produziu 2,5 g de antraquinona por litro de meio de cultura.

A cultura de células em suspensão também tem sido usada não só para produção ou estudo de metabólitos secundários, mas também para estudos de resistência a bactérias em determinadas culturas, como é o caso de *Gossypium hirsutum* L. (Kobayashi & Vieira, 2000).

Para o estudo de embriogênese somática de *Cymbopogon martinii* a partir de células em suspensão, a concentração de 13,6 μ M de 2,4-D foi eficiente (Patnaik et al., 1997). Para induzir resistência a bactérias em *Gossypium hirsutum* L., a concentração de 0,5 mg/L de 2,4-D resultou em boas respostas. No entanto, para regeneração *in vitro* de *Arachis villosulicarpa* Hoehne, o meio líquido para suspensão foi suplementado com 1,0 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina) (Mansur et al., 1993).

A ausência de luz em cultura de células em suspensão de *Saccharum sp.* visando a regeneração de plantas para estudos histológicos foi também estudada (Falco et al., 1996).

Culturas em suspensão obtidas de calos subcultivados mostraram as mesmas características na produção de pigmentos que indicavam metabólitos secundários, como a betalaína, tendo a cultura em suspensão mantido suas propriedades por mais de 5 anos (Akita et al., 2000). Para a produção de bisfenol A (produto largamente usado para a produção de plásticos, poliéster, entre outros) a partir de células em suspensão de *Eucalyptus perriniana*, não foram mencionadas subculturas das células em suspensão (Hamada et al., 2002). No entanto, para a análise das respostas de *Mentha* em diferentes concentrações de 2,4-D, foram feitas subculturas a cada duas

semanas (YANG et al., 1999).

Segundo Falco et al., (1996), trabalhando com cana de açúcar, o período de três meses foi de uma forma geral, adequado para obter uma completa regeneração desta planta, em suspensão.

Tabata (1977) tem mencionado que metabólitos secundários em culturas de células vegetais foram acumulados durante a fase estacionária em muitos casos.

O uso de 2,4-D para a produção de substâncias fenólicas a partir de células em suspensão também foi citado com eficiência na resposta que esta auxina provoca em *Mentha* na descrição do processo de crescimento da célula (Yang et al., 1999).

Para a detecção da produção ou não de uma determinada substância produzida pela cultura de células em suspensão, muitas análises devem ser realizadas, como ressonância magnética de ^{13}C ou de ^1H , que foram usados para caracterizar substâncias derivadas de lignina produzidas em cultura (Eberhardt et al., 1993).

Lignificação e células em suspensão

O estudo do processo de lignificação através de cultura de calos e de células em suspensão pode estar relacionado a vários objetivos diferentes, um deles é a caracterização *in situ* da lignina de uma determinada espécie, como em *Pinus taeda* (Eberhardt et al., 1993).

Moller et al., (2006) utilizaram a técnica de suspensão celular para observar os aspectos enzimáticos e topográficos da lignificação.

Pesquisas sobre lignificação através da cultura de células em suspensão foi usado por Kärkönen et al., (2002) para mensurar a atividade de um número de enzimas relacionadas ao processo de formação da lignina, pois a cultura de células é um modelo atrativo para a estudar o processo de lignificação, por se tratar de um processo em que as células ficam soltas umas das outras no meio de cultura líquido.

A utilização de alguns fitorreguladores tem sido muito associada ao estudo da lignificação, como é o caso do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético) e do BA (6-benziladenina) no meio de cultura para

suspensão celular pelos efeitos destes hormônios na lignificação, os quais permitem que as células se formem em grandes agregados influenciando na formação da lignina (Kuboi & Yamada, 1978).

A lignificação também pode ser induzida em culturas de células pela combinação do ANA (ácido α -naftalenoacético) com o BAP (benzilaminopurina), sendo este sistema utilizado para investigar a relação entre atividades enzimáticas e a lignificação. Em cultura de células de *Petroselinum hortense* e de *Triticum aestivum* a atividade enzimática coincidiu com a lignificação, sendo possível observar a presença desse tipo de enzimas em todas as culturas de células lignificadas (Hosel et al., 1982).

Muitas pesquisas têm sido realizadas sobre a limitação da digestibilidade e a utilização de forrageiras devido às características da parede celular e os efeitos causados pela composição da lignina nos ruminantes. A partir deste fato, surgiu a idéia de alterar a estrutura da lignina por manipulações na via biossintética da mesma e com isso modificando a digestibilidade da parede celular. Essas alterações poderão ser realizadas através de técnicas de suspensões celulares para influenciar no processo de lignificação e com isso alterar as enzimas que estão associadas à formação da parede celular (RALPH et al., 2005).

Algumas substâncias são utilizadas para promover o processo de lignificação no meio de cultura, como é caso dos dilignóis que promoveram a lignificação nos traqueídeos de *Zinnia*, na qual a biossíntese de monolignol foi bloqueada por um inibidor da fenilalanina amônio liase (FAL), sugerindo que os dilignóis podem atuar diretamente na polimerização da lignina (TOKUNAGA et al., 2005).

Considerações Finais

As técnicas que a biotecnologia oferece, como a calogênese e a suspensão celular, permitem abrir novas portas sobre o estudo do processo de lignificação possibilitando um conhecimento mais aprofundado do processo.

A auxina sintética 2,4-D apresenta uma importância muito relevante, pois é capaz de atuar na rota

biossintética da lignina impedindo a formação desta e por isso é muito utilizada nos meios de cultura em que se visa estudar o processo de lignificação de diferentes espécies. O estudo sobre lignificação ainda é um campo aberto, e a biotecnologia a ferramenta mais indicada para dirimir dúvidas relacionadas à biossíntese, o controle da polimerização e as experiências genéticas que modificam as atividades de enzimas envolvidas no processo de lignificação.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPERJ pelo apoio financeiro ao Laboratório de Biotecnologia da Madeira do Instituto de Florestas da UFRRJ.

Referências Bibliográficas

- ABREU, H. S., MIGUEL, A. N.; MARIA, M. A. Lignin structure and wood properties, **Wood and Fiber Science**, 31 (4), 426-433. 1999.
- AITCHISON, P.A.; MACLEOD, A.J.; and YEOMAN, M.M. **Growth patterns in tissue (callus) cultures**. In: Plant tissue and cell culture. 2 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications ed.H. E. Street, p.267-306, 1977.
- AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. Production of Betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, V. 64, n. 9, p. 1807-1812, 2000.
- ALTMAN, A; GOREN, R. Horticultural and physiological aspects of Citrus bud culture. **Acta Horticulturae**, V. 78, p.51-60, 1977.
- ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, V. 39 n.5, p.421-430, 2004.
- 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, p. 82-123, 1983.
- BARBER, M.S.; MITCHELL, H.J. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. **Internacional Review of Cytology**, V. 172, p. 243-293, 1997.
- BARUAH, A.; BORDOLOI, D.N. High frequency plant regeneration of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats by somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell Reports.**, V. 8, n. 8, p.483-485, 1989.
- BELL, A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, v.32, p.21-81,1981.
- BERLIN, J. **Formation of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells and its Impact on Pharmacy**. In: BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in Agriculture and Forestry, V. 4. Springer-Verlag, Berlin. 1988.
- BLOM, T.J.M.; VAN VLIET, T.B.; SCHRIJPEMA, J.; VAL, J.; VAN IREN, F.; VERPOORTE, R.; LIBBENGA, K.R. Uptake and Accumulation of the Alkaloids Quinine and Cinchonamine in Cultured Cells of *Cinchona robusta* and *Catharantus roseus*. **Journal of Plant Physiology**, V. 138, p.436-442. 1991.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, V. 54, p. 519-546, 2003.
- BOLWELL, G.P. Synthesis of cell wall components: aspects of control. **Phytochemistry**, V. 27, p. 1235-1253, 1988.
- BOUDET, A.M.; LAPIERRE, C.; GRIMA-PETTENATI, J. Biochemistry and molecular biology of lignification. **New Phytologist**, V. 129, p. 203-236, 1995.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, V. 161 (5), p. 839-851, 2001.
- 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, 1997b.
- CAMPBELL, M. M. & ELLIS, B. F. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures, **Planta**, V. 186, p. 409-417, 1992.
- 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.
- DEUS-NEUMANN, B., ZENK, M.H. Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion trap mechanism. **Planta**, V. 167, 44-53, 1986.
- DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, V. 7, p.1085-1097, 1995.
- DODDS, J.H. ; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue Culture**. 2ed. Cambridge: Cambridge University Press, 232p., 1985.
- DONALDSON, L.A. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. **Phytochemistry**, V. 57, p.859-873, 2001.
- DOUGALL, D.K. **Tissue culture and the study of secondary (natural) products**. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. Editors, *The Biochemistry of Plants, A Comprehensive Treatise. Secondary Plant Products* 7, Academic Press, p. 21–34, 1981.
- 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, n. 28, p. 21088-21096, 1993.
- ERDTMAN, H. Dehydrierungen in der Coniferylreihe. II Dehydrodi-isoeugenol. **Annalen**, V. 503, p. 283-294, 1933.
- FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; NETO, A.T. Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, V.8, n.1, p.1-6, 1996.
- FERREIRA, M. G. R; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, V. 23, n.3, p. 473-476. 2001.
- FREUDENBERG, K. Biosynthesis and constitution of lignin. **Nature**, V. 183, p.1152-1155, 1959.
- 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-CNPq, Cap. 2. p.99-169, 1990.
- GRISEBACH, H. **Naturwissenschaften**, 64, p. 619-625, 1977.
- GROSS, G.G.; MANSELL, R.L.; ZENK, M.H. Hydroxycinnamate: Coenzyme A ligase from lignifying tissue of higher plants. **Biochemistry and Physiology Pflanzen**, V. 168, p.42-51, 1975.
- GUPTA, P.P. Erradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, V. 6, p-33-39, 1986.
- HAHLBROCK, K.; GRISEBACK, H. In: HARBONE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. **The Flavonoids**. Chapman & Hall, London, p. 866-915, 1975.
- HAHLBROCK, K. J.; SCHRODER, J.; VIEREGGE. Enzyme regulation in parsley and soybean cell cultures. **Advances in Biochemical Engineering**, V. 18, p. 39-60, 1980.
- HAMADA, K.; TOMI, R.; ASADA, Y.; FURUYIA, T. Phytoremediation of bisphenol A by cultured suspension cells of *Eucalyptus perriniana* – regioselective hydroxylation and glycosilation. **Tetrahedron**

letters, V. 43, p. 4087-4089, 2002.

HAMADA, K.; TSUTSUMI, Y.; YAMAUCHI, K.;
• FUKUSHIMA, K.; NISHIDA, T. Treatment of poplar callus with ferulic and sinapic acids I: incorporation and enhancement of lignin biosynthesis. **Wood Science**, V. 49, p.333-338. 2003.

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

HARKIN, J.M., OBST, J.R. Lignification in trees. Indication of exclusive peroxidases participation. *Science*, Washington, V. 180, p.296-298, 1973.

HERRMANN, K.M. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **Plant Cell**, V. 7, p. 907-919, 1995.

HIGUCHI, T. **Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components**. Academic Press, New York, pp 141-160, 1984.

HOEFNAGEL, M.H.N. VAN IREN, F., LIBBENGA, K.R. In suspension cultures of *Catharanthus roseus* the cyanide-resistant pathway is engaged in respiration by excess sugar in combination with phosphate or nitrogen starvation. **Physiologia Plantarum**, V. 87, n. 3, p. 297-304, 1993.

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.

HUAN, L.V.T.; TAKAMURA, T.; TANAKA, M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium orchid*. **Plant Science**, V. 166, p. 1443-1449, 2004.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, V. 33, n.2, p.105-119, 1993.

JONES, D.H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulations of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, V. 23, p. 1349-1359, 1984.

KARKONEN, 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, n.3, p. 343-353, 2002.

KANEDA, Y.; TABEL, Y.; NISHIMURA, S.; HARADA, K.; AKIHAMA, T.; KITAMURA, K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant Cell Reports**, V. 17, p.8-12, 1997.

KOBAYASHI, A.K.; VIEIRA, L.G.E. Establishment of an in vitro system for studies on the induced resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* PV. Malvacearum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 35, n. 4, p. 719-725, 2000.

KRIKORIAN, A.D.; STEWARD, F.C. **Biochemical differentiation: the biosynthetic potentialities of growing and quiescent tissue**. In: F.C. STEWARD, Editor, *Plant Physiology, A Treatise*, Academic Press, p. 227-326, 1969.

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

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

KUTSUKI, H.; SHIMADA, M.; HIGUSHI, T. Distribution and roles of p-hydroxycinnamate: CoA ligase in lignin biosynthesis. **Phytochemistry**, V. 21, p.67-71, 1982.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal **Eucalyptus grandis**. **Plant Cell Reports**, V. 13, p. 473-476,

1994.

LAMEIRA, O.A. **Propagação *in vitro* da bananeira *Musa sp.* através da cultura de ápices caulinares.** 1987. 39f. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura, Lavras, 1987.

LANDA, F.S.L.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; FILHO, J.S.S.B. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência agrotécnica**, Lavras, V. 24 (Edição Especial), p.56-63, 2000.

LEGUAY, J.; GUERN, J. Quantative effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension cultured *Acer pseudoplatanus* cells. **Plant Physiology**, V. 56, p.356-359. 1975.

LEWIS, N.G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, V. 41, p. 455-496, 1990.

LEWIS, N. G. & SARKANEN, S.. **Lignin and lignan biosynthesis**, American Chemical Society. Washington, DC, 436p. 1998.

LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, V. 29, p.92-96, 1993.

LUCZKIEWICZ, M.; ZARATE, R.; DEMBINSKA-MIGAS, W.; MIGAS, P.; VERPOORTE, R. Production of pulchelin E. in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L. **Plant Science**, V. 163, p. 91-100, 2002.

LÜDERITZ, T.; SCHATZ, G.; GRISEBACH, H.; Enzymics synthesis of lignin precursors-purification and properties of 4-coumarate: CoA ligase from cambial sap os spruce (*Picea abies* L.). **European Journal of Biochemistry**, V. 123, p. 583-86, 1982.

MANSUR, E.; LACORTE, C.; RABELLO, A.C.G.; CORDEIRO, A.R. *In vitro* regeneration of *Arachis villosulicarpa* Hoehne from cotyledon segments, leaves and cell suspension. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, V. 28, n.10, p., 1143-1146,

1993.

MENDES, A.S.; ALVES, M.V.S. **Manual de Preservação de Madeiras**. IPT. Vol. I e II, São Paulo, 708p., 1986.

MOLLER, R.; KOCH, G.; NANAYAKKARA, B.; SCHMITT, U. Lignification in cell cultures of *Pinus radiata*: activities of enzymes and lignin topochemistry. **Tree Physiology**, v.26, n.2, p. 201-210, 2006.

MORALES, C.F.G.; LOMBARDI, S.R.B.; SOARES, P.F.; FORTES, G.R.L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, V. 5, n.3, 174-177, 1999.

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

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuroninduced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiologia Plantarum**, V. 94, p.268-276, 1995.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis: **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, V. 34, p.267-275, 1998.

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, Cap.10. p. 179-206. 1977.

NIMZ, H.; EBEL, J.; GRISEBACH, H. **Zeitschrift für Naturforschung**, V. 30, p. 442-444, 1975.

NISHINARI, N.;YAMAKI, T. Relationship between cell division and endogenous auxin in synchronously-cultured tobacco cells. **Botanical Magazine Tokyo**, V. 89, p.73-81. 1976.

- OLIVEIRA, G. M. R.; VIEIRA, I. M. S.; BARBOSA, W. C.; SERRA, A.; G. P.; SOUZA, D. M. G.; MORAES, M. Indução de calogênese em segmentos radiculares de copaíba (*Copaifera* sp). http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/07/pdf/Sin%20registro6/Gustavo%20M.%20Resquie%20de%20Oliveira.pdf em 04/11/2006.
- PALÚ, E.G.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, V. 28, n. 4, p. 736-742, 2004.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, 159p., 1997.
- PATNAIK, J.; SAHOO, S.; DEBATA, B.K. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of FALmarosa grass (*Cymbopogon martinii*). **Plant Cell Reports**, V. 16, p.430-434, 1997.
- PAYNE, G. F.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULER, M. L. **Immobilized plant cells**. In: PAYNE, G. F.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULER, M. L. Editors, *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Hanser, p. 179-223, 1991.
- PEREIRA, C. D.; MELO, B. **Cultura de tecidos vegetais**. UFU / ICIAG, Uberlândia, 2004.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Ed. Mundi-Prensa. Madri. 295 p. 1990.
- 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=200511/01/2007 11: 33 a.m.
- RAMOS, R.L.B.; TOVAR, F.J.; JUNQUEIRA, R.M.; LINO, F.B.; SACHETTO-MARTINS, G. Sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. **Genetics and Molecular Biology**, V. 24, n.1-4, p. 235-241, 2001.
- RAMSDEN, L.; NORTHCOTE, D.H. **Journal of Cell Science**, V. 88, p. 467-474, 1987.
- ROBERT, D.; MOLLARD, A.; BARNOUD, F. **Plant Physiology Biochemistry**, V. 27, p. 297-304, 1989.
- RUGINI, E. *In vitro* culture of the olive: na overview of the present scientific status. **Acta Horticulturae**, V. 286, p.93-96, 1990.
- SAKUTA, M.; KOMAMINE, A. **Cell Growth and Accumulation of Secondary Metabolites**. In: K.I. Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. vol 4. Academic Press, San Diego. 1987.
- SHIMODA, K.; YAMANE, S.; HIRAKAWA, H.; OHTA, S.; HIRATA, T. Biotransformation of phenolic compounds by the cultured cells of *Catharanthus roseus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, V. 16, p. 275-281, 2002.
- SIMOLA, L.K.; LEMMETYINEN, J.; SANTANEN, A. Lignin release and photomixotropism in suspension cultures of *Picea abies*. **Physiology Plantarum**, n.84, p.374-379, 1992
- SMITH, R.H.; MURASHIGE, T. In vitro development of isolated shoot apical meristem of angiosperm. **American Journal Botany**, V. 57, p.562-568, 1970.
- SNAPE, J.B.; THOMAS, N.H.; CALLOW, J.A. How suspension cultures of *Catharanthus roseus* respond to oxygen limitation: small-scale tests with applications to large-scale cultures. **Biotechnology Bioengineering**, V. 34, p.1058-1062. 1989.
- SÖNDAHL, M. R. & SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, V. 81, p.395-408, 1977.
- SOUZA, G.M.; GONÇALVES, A. Otimização de meio de cultura para bananeira (*Musa cavendish* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, V. 53, n.1, p.51-59, 1996.

- STICHER, L.; MAUCHI MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopatology**, V. 35, p. 235-270, 1997.
- STREET, H.E. **Growth in organized and inorganic systems. Knowledge gained by culture of organs and tissue explants.** In Plant physiology. A treatise, v. VB, ed. F.C. Steward. New York: Academic, p.3-224, 1969.
- STREET, H.E.; OPIK, H. **Cell growth and differentiation.** In: STREET, H.E & OPIK, H. The physiology of flowering plants: their growth and development. London: E. Arnold, p. 150-160, 1970.
- STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, V. 13, n.1, p.167-178, 2003.
- TABATA, M. **Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures.** In: Plant tissue culture and its bio-technological application. Springer-Verlag, Berlin, p. 3-16, 1977.
- TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies enhosas. http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S6/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira.pdf em 13-11-2006.
- TOKUNAGA, N.; SAKAKIBARA, N.; UMEZAWA, T.; ITO, Y.; FUKUDA, H.; SATO, Y. Involvement of Extracellular Dilignols in Lignification During Tracheary Element Differentiation of Isolated Zinnia Mesophyll Cells. **Plant and Cell Physiology**, V. 46, n.1, p.224-232, 2005.
- TORRES, A.C. & CALDAS, L. **Técnicas e Aplicações de Cultura de Tecidos de Plantas.** 433p., 1990
- UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (Musa AAB) in vitro. iv. concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. Comunicação científica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, V. 23, n.2, 2001.
- VELHO, C. C.; WHIPKEY, A.; JANICK, J. **Cupuassu, a new beverage crop for Brazil.** In: Advances in New Crops. Proceeding of the First National Symposium, New Crops: Research, Development, Economics. Janick, J. Simon, J.E. eds. Indianapolis, Indiana, 23-26. 1988.
- VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. CALOGÊNESE DO HÍBRIDO *Theobroma grandiflorum* X *T. obovatum* (STERCULIACEAE). **Acta Amazonica**, V. 34 (4), p. 507-511, 2004.
- VOGEL, H.J., BRODELIUS, P. An in vivo ³¹P NMR comparison of freely suspended and immobilized *Catharantus roseus* plant cells. **Journal of Biotechnology**, V. 1, p.159-170. 1984.
- VOO, K.S.; WHETTEN, R.W.; O'MALLEY, D.M.; SEDEROFF, R.R. 4-coumarate; CoA ligase in xylem of loblolly pine. **Plant Physiology**, V. 108, p.85-97, 1995.
- VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Feasibility of in vitro propagation of banana and plantains. **Tropical Agriculture**, Trinidad, V. 62, n.4, p.323-328, 1985.
- VUYLSTEKE, D. **Shoot-tip culture for the propagation, conservation, and exchange of Musa germplasm.** Rome: IBPGR, 56p. (IBPGR. Practical manual for handling crop germplasm in vitro, 2), 1989.
- WAGNER JUNIOR, A.; COUTO, M.; QUEZADA, A.C. Multiplicação "in vitro" do porta-enxerto de ameixeira 'JULIOR'. **Revista Brasileira de Agrociência**, V. 9, n. 2, p. 121-124, 2003.
- WHETTEN, R.W.; MACKAY, J.J.; SEDEROFF, R.R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, V. 49, p.585-609, 1998.
- WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, 7: 1001-13, 1995.
- WILHELM, E. Micropropagation of juvenile syc-

more maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, V. 57, p.57-60, 1999.

WINK, M., MENDE, P. Uptake of Lupanine by Alkaloid-Storing Epidermal Cells of *Lupinus polyphyllus*. **Planta Médica**, V. 53, p.465-469. 1987.

XU, N.; BEWLEY, J.D. Contracting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfafa (*Medicago sativa* L.) as revealed by scanning electron microscopy. **Plant Cell Reports**, V. 11, p.279-284, 1992.

YANG, J.; MYAO, S.; UCHIYAMA, T. Responses of *Mentha* suspension cultured cells to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid accumulation of sterified phenolic acids in their cell walls. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, V. 63, n.9, p. 1522-1527, 1999.

YEOMAN, M.M.; MACLEOD, A.J. Tissue (callus) cultures- techniques. **In Plant tissue and cell culture**. 2 ed. H.E. Street. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.31-59. 1977.

YEOMAN, M.M.; LINDSEY, K.; MIEDZYBRODZKA, M.B.; McLAUCHLAN, W.R. Accumulation of secondary products as a facer of differentiation in plant cell and tissue cultures. **In Differentiation in vitro**. Ed. M.M. Yeoman and D.E.S. Truman. Cambridge: Cambridge University Press, p.65-82. 1982.

ZENK, M.H. Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cultures as a pot of gold. **Phytochemistry**, V. 30, p. 3861-3863, 1991.

ZIV, M. & HALEVY, A.H. Control of oxidative browning and in vitro propagation of *Strelitzia reginae*. **HortScience**, V. 18, p.434-436, 1983