

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

**DISSERTAÇÃO**

**ATENUAÇÃO DO PROCESSO DE LIGNIFICAÇÃO EM**  
***Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) POR GA<sub>3</sub> E BAP**

**Regina Paula Willemen Pereira**

**2005**



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

**ATENUAÇÃO DO PROCESSO DE LIGNIFICAÇÃO EM**  
***EUCALYPTUS GRANDIS* (HILL EX MAIDEN) POR GA<sub>3</sub> E BAP**

**REGINA PAULA WILLEMEN PEREIRA**

*Sob a Orientação do Professor*

**Heber dos Santos Abreu**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Ambientais e Florestais, Área de concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais

Seropédica, RJ

Março de 2005

634.9285

P436a

T

Pereira, Regina Paula Willemen.

Atenuação do processo de lignificação em *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) por GA3 e BAP / Regina Paula Willemen Pereira. – 2005.

90 f. : il.

Orientador: Heber dos Santos Abreu.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Florestas.

Bibliografia: f. 43-57.

1. *Eucalyptus grandis* - Crescimento – Teses. 2. *Eucalyptus grandis* – Composição - Teses. 3. Lignina – Teses. 4. Plantas - Reguladores – Efeito fisiológico - Teses. 5. Ácido giberélico – Teses. 6. Madeira – Química - Teses. I. Abreu, Heber dos Santos. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Florestas. III. Título.

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

REGINA PAULA WILLEMEN PEREIRA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais,  
Área de concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais, como requisito  
parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Ambientais e Florestais.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14/03/2005

---

Heber dos Santos Abreu. Dr. UFRRJ

(Orientador)

---

Graciela Inês Bolzon de Muniz. Dr<sup>a</sup>. UFPR

---

Selma Ribeiro Paiva. Dr<sup>a</sup>. UFF

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto de Agronomia por ceder espaço na casa de vegetação.

Ao Laboratório de Anatomia Estrutural do Centro de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, onde foi realizada a análises citológicas.

Ao Laboratório de Produtos Naturais de Far-Manguinhos (FIOCRUZ), onde foi realizada parte da análise química.

A EMBRAPA Agrobiologia pela análise de proteínas realizada.

Ao Laboratório de Produtos Florestais – IBAMA de Brasília – DF, onde foi realizada as ressonâncias magnéticas.

A CAPES pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

<b>1-INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2- REVISÃO DE LITERATURA</b>	2
2.1-Lignificação	2
2.2-Eucalipto	5
2.3-Hormônios vegetais e suas implicações fisiológicas e morfológicas nas plantas	6
2.4-Giberelinas	9
2.5-Citocininas	12
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b>	13
3.1-Implantação do experimento no viveiro	13
3.2-Casa de vegetação	13
3.3 - Preparação das soluções de reguladores de crescimento	15
3.4 – Aplicação	15
3.5 Coleta do material vegetal	15
3.5.1 Preparação do material para análise citológica	15
3.5.2 Teste de cor do reagente de Mäule	16
3.5.3 Teste de cor do reagente de Wiesner	16
3.5.4 Dissociação	17
3.6 Preparação do material para análise química	17
3.6.1 Obtenção do material lignocelulósico livre de extrativos	17
3.6.2 Obtenção da percentagem de proteína total	18
3.6.3 Obtenção do material livre de proteína	18
3.7 Lignina insolúvel de Klason	19
3.8 Lignina dioxano	19
3.8.1 Acetilação	20
3.9 Determinação do teor de metoxila por RMN	20
3.10 Espectroscopia no infravermelho	20
3.11. Delineamento estatístico	20
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	21
4.1. Diâmetro da fibra	21
4.2. Diâmetro do lúmen da fibra	22
4.3.Comprimento da fibra	23
4.4. Espessura da parede da fibra	25
4.5. Comprimento do vaso	26
4.6. Diâmetro do vaso	26
4.7.Espessura da parede do vaso	27
4.8. Lignina insolúvel (Klason)	28
4.9.Diâmetro na base do caule	28
4.10. Altura do <i>Eucalyptus grandis</i> na coleta	29
4.11. Resultado do teste de cor do reagente Mäule	31
4.12.Teste de cor do reagente Wiesner	32
4.13. Resultados do teor de metoxila por RMN	33
4.14. Resultados do infravermelho	34

4.15. Proteína total por tratamento	35
4.16. Correlações entre os dados anatômicos (fibra e vaso) com o teor de lignina insolúvel (Klason)	37
4.16.1. Tratamento $G_{[1]}$	37
4.16.2. Tratamento $G_{[2]}$	37
4.16.3. Tratamento $C_{[1]}$	37
4.16.4. Tratamento $C_{[2]}$	38
4.16.5. Tratamento $G_{[1]} C_{[1]}$	38
4.16.6. Tratamento $G_{[1]} C_{[2]}$	38
4.16.7. Tratamento $G_{[2]} C_{[1]}$	39
4.16.8. Tratamento $G_{[2]} C_{[2]}$	39
4.16.9. Tratamento $G_{[0]} C_{[0]}$ (testemunha)	40
<b>5. CONCLUSÕES</b>	41
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	42
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	43
<b>8. ANEXOS</b>	61
Anexo I – Médias das medidas microscópicas dos vasos	62
Anexo II – Médias das medidas microscópicas das fibras	62
Anexo III - Medidas com o coeficiente do microscópio (elementos de vaso)	63
Anexo IV - Medidas com o coeficiente do microscópio (fibras)	65
Anexo V – Extrativos	67
Anexo VI – Tabelas completas da análise de variância	67
Anexo VII – Gráficos dos tratamentos simples ( $GA_3$ , BAP e testemunha) para fibra, vaso, altura e diâmetro da planta	71
Anexo VIII – Gráficos dos efeitos sobre o teor de lignina insolúvel Klason causados pelos tratamentos utilizando os reguladores de crescimento isoladamente ( $GA_3$ e BAP) em relação à testemunha	79
Anexo IX – Espectros no infravermelho dos tratamentos ( $GA_3$ e BAP)	80
Anexo X – Espectros $^1H$ RMN dos tratamentos ( $GA_3$ e BAP)	85

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{M}$	Micro molar
$\mu\text{g}$	Micro grama
$C_{[1]}$	Solução com 111 $\mu\text{M}$ de BAP
$C_{[2]}$	Solução com 222 $\mu\text{M}$ de BAP
$G_{[1]}$	Solução com 49,13 $\mu\text{M}$ de $\text{GA}_3$
$G_{[2]}$	Solução com 98,26 $\mu\text{M}$ de $\text{GA}_3$
$G_{[0]}C_{[0]} (= T)$	Solução com 0 $\mu\text{M}$ de $\text{GA}_3$ e 0 $\mu\text{M}$ de BAP (Testemunha)
$G_{[1]}C_{[1]}$	Solução com 49,13 $\mu\text{M}$ de $\text{GA}_3$ e 111 $\mu\text{M}$ de BAP
$G_{[1]}C_{[2]}$	Solução com 49,13 $\mu\text{M}$ de $\text{GA}_3$ e 222 $\mu\text{M}$ de BAP
$G_{[2]}C_{[1]}$	Solução com 98,26 $\mu\text{M}$ de $\text{GA}_3$ e 111 $\mu\text{M}$ de BAP
$G_{[2]}C_{[2]}$	Solução com 98,26 $\mu\text{M}$ de $\text{GA}_3$ e 222 $\mu\text{M}$ de BAP
KOH	Hidróxido de potássio
M	Molar
HCl	Ácido Clorídrico
N	Normal
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Ácido Sulfúrico
KBr	Brometo de Potássio
IV	Infravermelho
KI	Iodeto de Potássio



## LISTA DE ABREVIÇÕES

BAP	6-Benzilaminopurina
GA <sub>3</sub>	Ácido Giberélico
G	Lignina Guaiacólica
S	Lignina Siringólica
H	Lignina Cumarólica
Cald5H	Coniferaldeído 5-hidroxilase
PAL	Fenilalanina Amônia-liase
C3H	4-hidróxicinamato 3-hidroxilase
F5H	Ferulato 5-hidroxilase
OMT	5-adenosil-metionina: cafeato/5-hidróxi
4CL	Hidroxicinamoil coenzima A ligase
CCR	Hidroxicinamoil coenzima A redutase
CAD	Cinamil álcool desidrogenase
C4H	Cinamato 4-hidroxilase
AIA	Ácido 3-indol-acético
GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , GA <sub>7</sub> , GA <sub>20</sub>	Giberelinas
BA	N <sup>6</sup> -benziladenina
IPEF	Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais
FAA	Formol, Álcool etílico e Ácido acético
THAM	Tri-hidróxi-amino-metano
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparações múltiplas entre as médias do diâmetro de fibra	22
<b>Tabela 2.</b> Comparações múltiplas entre as médias do diâmetro do lúmen de fibra	23
<b>Tabela 3.</b> Comparações múltiplas entre as médias do comprimento de fibra	24
<b>Tabela 4.</b> Comparações múltiplas entre as médias de espessura da parede de fibra	25
<b>Tabela 5.</b> Comparações múltiplas entre as médias do comprimento do vaso	26
<b>Tabela 6.</b> Comparações múltiplas entre as médias do diâmetro do vaso	27
<b>Tabela 7.</b> Comparações múltiplas entre as médias da espessura da parede do vaso	27
<b>Tabela 8.</b> Comparações múltiplas entre as médias do teor de lignina insolúvel Klason	28
<b>Tabela 9.</b> Comparações múltiplas entre as médias dos diâmetros na base dos caules das plantas aos 6 meses	29
<b>Tabela 10.</b> Comparações múltiplas entre as médias da altura das plantas aos 6 meses	30
<b>Tabela 11.</b> Teor de metoxila (%) obtidos por RMN	33
<b>Tabela 12.</b> Percentagem das unidades de lignina através de transmitância por infravermelho	35
<b>Tabela 13.</b> Percentagem de nitrogênio total por tratamento	36
<b>Tabela 14.</b> Médias das medidas dos elementos de vaso	62
<b>Tabela 15.</b> Médias das medidas das fibras	62
<b>Tabela 16.</b> Elementos de vaso do tratamento $G_{[1]}$	63
<b>Tabela 17.</b> Elementos de vaso do tratamento $G_{[2]}$	63
<b>Tabela 18.</b> Elementos de vaso do tratamento $C_{[1]}$	63
<b>Tabela 19.</b> Elementos de vaso do tratamento $C_{[2]}$	63
<b>Tabela 20.</b> Elementos de vaso do tratamento $G_{[1]}+C_{[1]}$	64
<b>Tabela 21.</b> Elementos de vaso do tratamento $G_{[1]}+C_{[2]}$	64
<b>Tabela 22.</b> Elementos de vaso do tratamento $G_{[2]}+C_{[1]}$	64
<b>Tabela 23.</b> Elementos de vaso do tratamento $G_{[2]}+C_{[2]}$	64
<b>Tabela 24.</b> Elementos de vaso do tratamento T	64
<b>Tabela 25.</b> Fibras do tratamento $G_{[1]}$	65
<b>Tabela 26.</b> Fibras do tratamento $G_{[2]}$	65
<b>Tabela 27.</b> Fibras do tratamento $C_{[1]}$	65
<b>Tabela 28.</b> Fibras do tratamento $C_{[2]}$	65
<b>Tabela 29.</b> Fibras do tratamento $G_{[1]}+C_{[1]}$	65
<b>Tabela 30.</b> Fibras do tratamento $G_{[1]}+C_{[2]}$	66
<b>Tabela 31.</b> Fibras do tratamento $G_{[2]}+C_{[1]}$	66
<b>Tabela 32.</b> Fibras do tratamento $G_{[2]}+C_{[2]}$	66
<b>Tabela 33.</b> Fibras do tratamento T	66
<b>Tabela 34.</b> Extrativos de todos os tratamentos	67
<b>Tabela 35.</b> Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do	

ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o diâmetro de fibras de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 6 meses de idade	67
<b>Tabela 36.</b> Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o lúmen de fibras de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 6 meses de idade	67
<b>Tabela 37.</b> Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o comprimento de fibras de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 6 meses de idade	68
<b>Tabela 38.</b> Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a parede de fibras de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 6 meses de idade	68
<b>Tabela 39.</b> Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o comprimento do vaso de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 6 meses de idade	68
<b>Tabela 40.</b> Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o diâmetro do vaso de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 6 meses de idade	69
<b>Tabela 41.</b> Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o espessura do vaso de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 6 meses de idade	69
<b>Tabela 42.</b> Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a lignina de Klason de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 6 meses de idade	69
<b>Tabela 43.</b> Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a altura das plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 6 meses de idade	70
<b>Tabela 44.</b> Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o diâmetro das plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 6 meses de idade	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formação biossintética dos precursores da lignina	4
<b>Figura 2.</b> Sistema de aplicação do hormônio por capacete de atomização sobre as plantas em casa de vegetação	14
<b>Figura 3.</b> Reação do teste de Maüle	16
<b>Figura 4.</b> Reação do teste de Wiesner	17
<b>Figura 5.</b> Fibras do tratamento $C_{[1]}$ (111 $\mu$ M de BAP)	21
<b>Figura 6.</b> Interações dos tratamentos para o diâmetro da fibra	22
<b>Figura 7.</b> Interações dos tratamentos para o diâmetro do lúmen da fibra	23
<b>Figura 8.</b> Interações dos tratamentos para o comprimento da fibra	24
<b>Figura 9.</b> Interações com destaque para $G_{[2]}$ em relação aos outros tratamentos	25
<b>Figura 10.</b> Mostra vasos dos tratamentos $G_{[1]}$ (a), $G_{[0]}C_{[0]}$ (b) e $C_{[1]}$ (c) em corte transversal	28
<b>Figura 11.</b> Um representante de cada tratamento da esquerda para a direita ( $G_{[1]}$ , $G_{[2]}$ , $C_{[1]}$ , $C_{[2]}$ , $G_{[1]}C_{[1]}$ , $G_{[1]}C_{[2]}$ , $G_{[2]}C_{[1]}$ , $G_{[2]}C_{[2]}$ , T) um dia antes da coleta, mostrando o efeito sobre a altura	30
<b>Figura 12 a 20.</b> Correlações fotomicrográficas dos cortes transversais de cada tratamento com indicações positivas de presença lignina siringila (teste de Mäule)	31
<b>Figura 21 a 29.</b> Correlações fotomicrográficas dos cortes transversais de cada tratamento com indicações da presença lignina (teste de Wiesner)	32
<b>Figura 30.</b> Resultados do teor de metoxila de cada tratamento	34
<b>Figura 31.</b> Correlação de proteína total com teor de lignina	36
<b>Figura 32.</b> Efeito do BAP sobre o diâmetro da fibra	68
<b>Figura 33.</b> Efeito das duas concentrações de $GA_3$ sobre o diâmetro de fibra	68
<b>Figura 34.</b> Efeito das duas concentrações de $GA_3$ sobre o diâmetro do lúmen de fibra	69
<b>Figura 35.</b> Efeito das duas concentrações de BAP sobre o diâmetro do lúmen fibra de fibra	69
<b>Figura 36.</b> Efeito das duas concentrações de $GA_3$ sobre o comprimento de fibra	70
<b>Figura 37.</b> Efeito das duas concentrações de BAP sobre o comprimento de fibra	70
<b>Figura 38.</b> Efeito das duas concentrações de $GA_3$ sobre a espessura de fibra	71
<b>Figura 39.</b> Efeito das duas concentrações de BAP sobre a espessura de fibra	71
<b>Figura 40.</b> Efeito das duas concentrações de $GA_3$ sobre o comprimento do vaso	72
<b>Figura 41.</b> Efeito das duas concentrações de BAP sobre o comprimento do vaso	72
<b>Figura 42.</b> Efeito das duas concentrações de $GA_3$ sobre a espessura do vaso	73

<b>Figura 43.</b> Efeito das duas concentrações de BAP sobre a espessura do vaso	73
<b>Figura 44.</b> Efeito das duas concentrações de GA <sub>3</sub> sobre a altura da planta	74
<b>Figura 45.</b> Efeito das duas concentrações de BAP sobre a altura da planta	74
<b>Figura 46.</b> Efeito das duas concentrações de BAP sobre o diâmetro na base do caule	75
<b>Figura 47.</b> Lignina insolúvel (Klason) dos tratamentos (T, G <sub>[1]</sub> e G <sub>[2]</sub> )	76
<b>Figura 48.</b> Lignina insolúvel (Klason) dos tratamentos (T, C <sub>[1]</sub> e C <sub>[2]</sub> )	76
<b>Figura 49.</b> Espectro no infravermelho do tratamento G <sub>[1]</sub>	77
<b>Figura 50.</b> Espectro no infravermelho do tratamento G <sub>[2]</sub>	77
<b>Figura 51.</b> Espectro no infravermelho do tratamento C <sub>[1]</sub>	78
<b>Figura 52.</b> Espectro no infravermelho do tratamento C <sub>[2]</sub>	78
<b>Figura 53.</b> Espectro no infravermelho do tratamento G <sub>[1]</sub> C <sub>[1]</sub>	79
<b>Figura 54.</b> Espectro no infravermelho do tratamento G <sub>[1]</sub> C <sub>[2]</sub>	79
<b>Figura 55.</b> Espectro no infravermelho do tratamento G <sub>[2]</sub> C <sub>[1]</sub>	80
<b>Figura 56.</b> Espectro no infravermelho do tratamento G <sub>[2]</sub> C <sub>[2]</sub>	80
<b>Figura 57.</b> Espectro no infravermelho do tratamento G <sub>[0]</sub> C <sub>[0]</sub>	81
<b>Figura 58.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN do tratamento G <sub>[1]</sub>	82
<b>Figura 59.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN do tratamento G <sub>[2]</sub>	83
<b>Figura 60.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN do tratamento C <sub>[1]</sub>	84
<b>Figura 61.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN do tratamento C <sub>[2]</sub>	85
<b>Figura 62.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN do tratamento G <sub>[1]</sub> C <sub>[1]</sub>	86
<b>Figura 63.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN do tratamento G <sub>[1]</sub> C <sub>[2]</sub>	87
<b>Figura 64.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN do tratamento G <sub>[2]</sub> C <sub>[1]</sub>	88
<b>Figura 65.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN do tratamento G <sub>[2]</sub> C <sub>[2]</sub>	89
<b>Figura 66.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN do tratamento G <sub>[0]</sub> C <sub>[0]</sub> (Testemunha)	90

## RESUMO

PEREIRA, Regina Paula Willemen. **Atenuação do processo de lignificação em *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) por GA<sub>3</sub> e BAP.** Seropédica; UFRRJ, 2005. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2005.

Esta pesquisa foi realizada com o intuito de entender a atuação dos reguladores de crescimento ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o sistema de lignificação de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden). Após aplicação dos reguladores, foram realizadas análises das plantas tratadas com GA<sub>3</sub> e BAP combinados e isolados. Esses reguladores foram aplicados por um sistema de atomização em diferentes níveis de concentrações. Foram realizadas análises anatômicas, incluindo testes de cor como Mäule e Wiesner, análises químicas tal como a obtenção de lignina insolúvel (Klason) e lignina dioxano. Análises utilizando a espectrometria de infravermelho, teor de metoxila (Método de Seizel) e proteína total (Método Kjeldahl) foram também realizadas. Através da determinação do teor de lignina, pode-se estimar a existência de sinergismo do tratamento G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub> cujas concentrações foram de 49,13 µM e 111 µM de GA<sub>3</sub> e BAP respectivamente. Esse tratamento reduziu o teor de lignina em aproximadamente 20%. Apesar de mantida a relação G/S (unidades básicas de lignina – Guaiacila/Siringila), de acordo com os espectros no infravermelho, a análise de metoxila revelou que as ligninas presentes nas plantas tratadas são dos tipos GS, HG, o que significou a participação dos reguladores na formação dos precursores da lignina induzindo alteração na estrutura molecular da lignina. O teste de cor de Mäule e Wiesner corrobora com os resultados positivos para a presença de unidades siringila e presença de lignina respectivamente. Os tratamentos não alteraram significativamente os valores de proteínas totais.

**Palavras chave:** Lignificação, *Eucalyptus grandis*, ácido giberélico, 6-benzilaminopurina

## ABSTRACT

PEREIRA, Regina Paula Willemen. **Attenuation of ligninification process in *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) by GA<sub>3</sub> and BAP**. Seropédica; UFRRJ, 2005. 90p. Dissertation (Máster Science in Environmental and Forest Sciences). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2005

This research was carried out to understand the behavior of growth regulators (giberelic acid (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurin (BAP) on lignification system of *Eucalyptus grandis* (FORMER Hill Maiden). After GA<sub>3</sub> (alone) and BAP (combined) applications, analyses were carried out. These regulators were applied by a atomization system at different concentrations levels. Anatomical analysis, including Mäule and Wiesner test as well as chemical analysis such as insoluble (Klason) and dioxane lignin were carried out as well. Infrared spectroscopy, methoxyl determination (Seizel Method) and total protein (kjedahl Method) were performed. Synergism was suggested for G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub> treatment, at following concentrations: 49,13 µM e 111 µM. These treatments decreasing around 20% of lignin. In spite of infrared spectra that showed G/S composition, lignin GS, HG were confirmed by methoxyl content, suggesting regulators action on lignin biosynthesis and lignin structural modification. Positive Mäule and Wiesner test were observed, while protein did not modified significantly.

**Key words:** Growth regulators, *Eucalyptus grandis*, giberelic acid, 6-benzilaminopurin

## 1. INTRODUÇÃO

A madeira está cada vez mais presente em uma variedade de produtos finais que requerem qualidade e menos desprendimento na sua obtenção por parte da indústria. Um possível caminho para atingir esses objetivos está na experimentação e na manipulação da matéria-prima. Os resultados dessas manipulações podem servir de ferramentas, como, por exemplo, as proporcionadas pela bioquímica, anatomia da madeira, engenharia genética, entre outras.

A madeira devido suas diversas utilizações e finalidades interfere na economia dos países industrializados, então estudos que adicionem informações intencionando melhorar e facilitar o seu uso é cada vez mais exigido (LEWIS & SARKANEN, 1998).

O conhecimento das propriedades químicas, físicas e de bioquímicas da lignificação é importante pela sua função e por estar altamente associada à produção de celulose de plantas lenhosas, principalmente aquelas economicamente utilizadas (HATFIELD & RALPH, 1999; MICIC et al, 2002).

A caracterização de enzimas e genes envolvidos na rota metabólica da lignina contribui para o melhor entendimento dos mecanismos de regulação envolvidos na biossíntese da lignina (FUKUDA, 1996). Essas investigações permitem verificar as alterações do processo de lignificação por modulação da atividade enzimática (LAUVERGEAT et al., 1995) ou pela expressão dos genes em orientação reversa ou anti-senso (HALPIN et al., 1994; HIBINO et al., 1995; BAUCHER et al., 1996). O entendimento e a manipulação dos elementos envolvidos na regulação desses genes possibilitará a obtenção de plantas (arbóreas e forrageiras) com teores de ligninas mais adequados aos diversos fins industrial e pecuário (LEWIS & SARKANEN, 1998). Nesse sentido, os estudos anatômicos, bioquímicos e genéticos (ALONI, 1987; ROBERTS, 1988; FUKUDA et al., 1985, FUKUDA, 1992; FLECK & HARBERD, 2002) relacionando a aplicabilidade exógena de reguladores de crescimento com as fases de desenvolvimento, diferenciação (YE, 2002; MAUSETH, 1988) e genes envolvidos nos processos enzimáticos da biossíntese da lignina (BIEMELT et al., 2004), têm sido cada vez mais enfatizados. Alguns destes estudos têm obtido avanço no que se refere à interação dos hormônios vegetais no processo de lignificação.

O uso de dois reguladores de crescimento ácido giberélico ( $GA_3$ ) e 6-benzilaminopurina (BAP), isolados ou em combinação, de duas das importantes classes de hormônios vegetais (giberelinas e citocininas) já foi pronunciado em alguns experimentos com diversas finalidades como: ativação de gene envolvido na regulação da floração em *Sinapis Alba* (FOSTER et al., 1997; BONHOMME et al., 2000); na conservação do maracujá doce (*Passiflora alata* Dryander) pós-colheita (SILVA et al., 1999); no aumento do comprimento dos cachos de uva de mesa 'Centennial Seedless', que só foi significativo pela aplicação de  $GA_3$  (PIRES & BOTELHO, 2000), aplicação de  $GA_3$  em banana pós-colheita, retardando a degradação da clorofila e conseqüentemente do amadurecimento (MCDONALD et al., 1997). No entanto são poucas as informações relacionando esses reguladores de crescimento com plantas cuja utilidade seja a madeira, principalmente as de valor econômico.

Para diminuir essa falta de informações, esse trabalho teve como objetivo geral compreender o processo de lignificação do *Eucalyptus grandis* com perspectiva de formação de lenho alterado e sua aplicabilidade como ferramenta para melhoria da qualidade de produtos florestais. Os objetivos específicos foram: criar modelo de estudos



com a possibilidade de aplicações; analisar o mecanismo hormonal na formação da lignina com a interferência das aplicações exógenas de ácido giberélico e 6- benzilaminopurina e comparar as alterações químicas e anatômicas das plantas tratadas com a testemunha.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Lignificação

A lignina consiste de macromoléculas complexas que contém unidades básicas quimicamente distintas, todos os quais são os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico majoritariamente (HIGUCHI, 1997). O ácido cumárico é modificado então por hidroxilação, metilação e reduções para formar os monolignóis (BAO et al., 1993), derivados dos ácidos ferúlico, e 5-hidroxiferúlico (SATO et al., 1993, 1995). Todas estas reações bioquímicas ocorrem no compartimento citoplasmático, enquanto a polimerização ocorre na parede celular (ABREU et al., 2001).

Durante crescimento e desenvolvimento normal as paredes das células, de espécies lenhosas são modificadas para realizar funções específicas, tornando-as lignificadas para promover condições necessárias para transporte axial de água e um crescimento verticalizado (BERNARDS & RAZEM, 2001).

Segundo BOSÍSIO (1995) a participação da lignina na fisiologia dos vegetais superiores teve início a partir das traqueófitas pteridófitas (licopodiales) e perpetua até hoje entre as Gimnospermas e Angiospermas. As substâncias derivadas da rota do ácido chiquímico, principalmente as ligninas, são mais exigentes, devido ao diferencial de oxidação ocorrido durante milhões de anos atrás sobre plantas primitivas (GOTTLIEB, 1989; GOTTLIEB et al., 1995).

Atualmente, a maior aplicação da engenharia genética em árvores cuja utilidade principal é a qualidade da madeira, tem sido a alteração da biossíntese de lignina, resultando em plantas com menor teor de lignina ou com modificações em sua composição (VAN DOORSSELAERE, 1995; HU, 1999).

A complexa especificidade das ligações na formação da lignina tem exigido cada vez mais estudos, dessa forma, recentes experimentos *in vitro*, entre eles o realizado por HATFIELD & VERMERRIS (2001), reproduziram a distribuição dessas ligações em lignina nativa, tendo como resultado a afirmação com plantas mutantes e transgênicas que há plasticidade metabólica na biossíntese de lignina.

LI et al., (2003) usaram *Agrobacterium* para co-transferir os genes antisense 4CL e senso CAld5H em álamo tremedor (*Populus tremuloides*) para confirmar a hipótese que a quantidade e reatividade da lignina são reguladas por genes distintos da biossíntese de monolignóis, e os resultados constataram uma redução de até 40% de lignina com um aumento de 14% de celulose em plantas antisense 4CL, e em plantas senso CAld5H houve um aumento três vezes maior da relação S/G sem alterar o teor de lignina; constataram também que estes efeitos foram independentes, mas aditivos com plantas que expressam ambos os transgenes, têm até 52% menos lignina, uma relação de S/G mais alta 64% e 30% mais celulose, e, ainda, que um aumento da relação S/G também acelerou a maturação da célula em caule de xilema secundário, apontando um papel para porções de lignina siringílica em coordenação com a biossíntese da parede secundária do xilema.

Em muitos experimentos, YE, et al., (1994) mostraram que várias enzimas e genes envolvidos no caminho dos fenilpropanóides foram identificados e caracterizados.

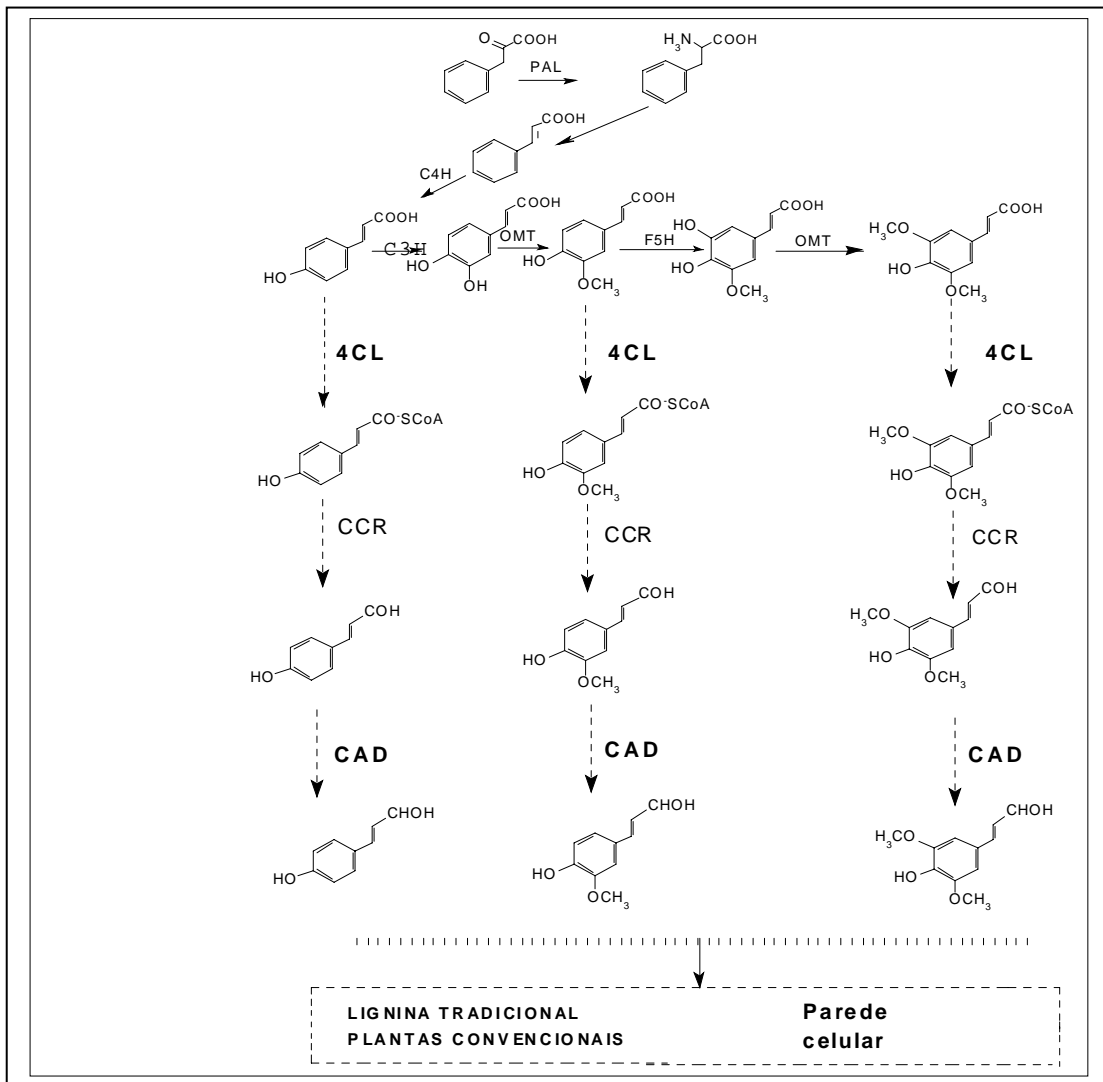
Modificações significantes na biossíntese da lignina foram descobertas, como, cafeoil CoA O-metiltransferase é essencial para biossíntese de lignina e o ácido cafeico O-metiltransferase controla a síntese de unidades siringila em lignina (LI, et al., 2000).

As substâncias das unidades cumarila e siringila, respectivamente, são depositadas na fase inicial de lignificação a princípio na parede primária e lamela média e em seguida na parede secundária de células do xilema, dessa forma, a composição da lignina envolve processos de desenvolvimento e de espaço (BOERJAN et al., 2003). A relação de unidades guaiacila e siringila foi modificada nas células do xilema e do floema do *Coleus spp* por auxina e ácido giberélico (ALONI et al., 1990).

A constituição, assim como a arquitetura molecular da lignina, é definida por um sistema enzimático complexo responsável pela formação biossintética dos precursores intermediários e finais (Fig.1), enquanto as peroxidases têm sido quase especificamente responsáveis pela fase determinante da polimerização na parede celular (LAUVERGEAT et al., 1995). As peroxidases são enzimas glicosiladas distribuídas em plantas, microorganismos e animais, ocorrendo também como isoenzimas e podem ter sua atividade afetada por processos externos como mudanças no fotoperíodo, ataque de patógenos, etc (ELFSTRAND et al., 2002). No caso da lignina, a peroxidase catalisa reações de oxiredução levando a redução do peróxido de hidrogênio (CHEN et al., 2002). A atividade da peroxidase está presente principalmente na parede celular de tecidos propícios à lignificação (KHINDARIA & AUST, 1996). Outras oxidases também já foram descritas no processo de polimerização da lignina

ABREU et al. (2001) propõe duas etapas durante a formação da lignina, oxidação horizontal (mediadas totalmente por enzimas) que ocorrem dentro do compartimento citoplasmático e a oxidação vertical (parcialmente mediada por enzimas) que ocorre na parede celular, respectivamente. Através de um processo de oxiredução forma-se o radical fenóxicos e, estruturas de ressonância que em seguida sofrem reações de acoplamento, cujo processo dirigente ainda não está claramente definido (LEWIS & SARKANEN, 1998). Portanto, todos esses detalhes sobre a organização estrutural devem contribuir extensivamente com as propriedades físicas e mecânicas da madeira. De acordo com esta visão a presença de ligações do tipo  $\beta$ -O-4 tem papel importante nas propriedades da madeira (ABREU et al., 1999).

Especialistas em bioquímica da madeira têm interesse pelo controle da biossíntese de lignina e sua deposição nas camadas da parede celular, então, o conhecimento da distribuição de lignina contribui para a produção de pasta química de polpa celulósica, onde a lignina é o principal entrave operacional (WHETTEN, & SEDEROFF, 1995). A progressiva taxa de crescimento das árvores, o volume dos troncos e o encurtamento no tempo de rotação são fatores observados com o objetivo de obter árvores produzindo mais biomassa por unidade de área para a utilização da madeira com a finalidade estrutural (ERIKSSON & MORITZ, 2002).



**PAL**- Fenilalanina Amônia- Liase  
**C3H**- 4-Hidroxicinamato 3-Hidroxilase  
**F5H**- Ferulato-5-Hidroxilase  
**OMT**-5-Adenosil-metionine: cafeato/5-Hidroxi  
**4CL**- Hidroxicinamoil COA Ligase  
**CCR**- Hidroxicinamoil COA Redutase  
**CAD**- Cinamil Álcool Desidrogenase  
**C4H**- Cinamato-4-Hidroxilase

### **Figura 1.** Formação biossintética dos precursores da lignina.

Entretanto, o teor de lignina e seu perfil estrutural, têm sido considerados como fatores determinantes na utilização de madeira para diversos fins, neste sentido foi mostrado que o gene regulador na biossíntese do hormônio vegetal giberelina, no álamo híbrido (*Populus tremula* x *Populus tremuloide*) tem papel importante na taxa de crescimento e biomassa (ERIKSSON & MORITZ, 2002). As árvores transgênicas têm maior número de fibras no xilema que as espécies do tipo selvagem, sendo que, as fibras longas são desejáveis na produção de papel mais resistente, no entanto, não há, até o momento, comprovação da possível influência das técnicas silviculturais tradicionais de produção influenciando nesta característica (CHELIAK & ROGERS, 1990). Então, o conhecimento e a manipulação dos elementos envolvidos na regulação desses genes possibilitará a obtenção de plantas com teores de ligninas mais adequados aos diversos fins industriais (VAN DOORSSELAERE, 1995; HU et al., 1999).

A lignina confere rigidez e proteção às plantas, sendo atuante nas paredes das células dos vegetais lenhosos e quando depositada no estágio inicial de lignificação é rica em unidade guaiacila com estruturas condensadas, ao passo que a lignina depositada posteriormente se torna rica em unidade siringila (LEWIS & SARKANEN, 1998). Há a possibilidade de que, com os tratamentos hormonais, haja uma interferência no sistema genômico gerando expressões enzimáticas que medem a formação da lignina na parede celular (HIGUCHI, 1997). As características da lignina atuando como agente de defesa é importante principalmente na planta jovem, pois, nessa fase, a planta está mais suscetível a interferências bióticas e abióticas que podem afetar o seu pleno desenvolvimento (ABREU, 1994). A composição é consequência da rota biossintética do ácido chiquímico até os precursores intermediários para a formação das ligninas, no entanto, a relação da composição da lignina e as suas respectivas estruturas químicas adquiridas e seus efeitos sobre a madeira têm sido pouco pesquisados (WHETTEN et al., 1998; ABREU, 1994; LEWIS & YAMAMOTO, 1990).

A atuação dos hormônios intrínseca à diferenciação celular altera o processo de lignificação, nestes termos, os passos inerentes à formação da lignina são afetados, de modo que plantas podem produzir certas quantidades e tipos diferentes de lignina, se o ciclo dos hormônios forem alterados (FUKUDA & KOMAMINE, 1982).

## **2.2 Eucalipto**

Como é citado em MOURA & GUIMARÃES (2003), o gênero *Eucalyptus* tem mais de 500 espécies e é o mais plantado no mundo. A produção de polpa de papel tem destaque na demanda de madeira nos países industrializados, incluindo o Brasil

(BARREIROS et al., 2002).

Uma grande proporção da variação nas propriedades químicas e físicas da madeira é controlada por genes expressados durante diferenciação do xilema, e o acesso ao gene receptor para o estudo da base molecular das propriedades da madeira requer o isolamento, caracterização e mapeamento deste gene expressado no xilema, um tecido que forma a base da madeira, que é transformado em milhões de dólares pela indústria de polpa celulósica (KIRST et al., 2001). Em relação ao *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden), CROMER et al., (1993), afirma que é uma importante espécie comercial que pode alcançar alta taxa de crescimento se a nutrição e água não forem limitados.

### **2.3 Hormônio vegetal e suas implicações fisiológicas e morfológicas nas plantas**

O conceito clássico de hormônio envolve três elementos fundamentais: síntese de influência química em um organismo; transporte e a ação da atividade química em um segundo organismo para controlar um processo fisiológico específico (WEYERS et al., 1987).

Os hormônios vegetais controlam o processo de xilogênese (ZIMMERMANN & BROWN, 1971). Análises de alta resolução de distribuição de auxina em tecidos da região cambial, combinado com a análise de plantas transgênicas com distribuição de auxina marcada, sugerem que auxina provê informação de localização para a morte de células do meristema e provavelmente também para a duração de expansão de células. Para HINOJOSA (2000) os hormônios vegetais, ou fitormônios, são substâncias orgânicas naturais, não são vitaminas nem nutrientes e em pequenas concentrações são biologicamente ativas, possuem a capacidade de promover, inibir e modificar, causando alterações fisiológicas e/ou morfológicas (CASTRO, 1988; VIEIRA & MONTEIRO, 2002). Depois da descoberta da auxina, algumas investigações conduziram à descoberta de outros hormônios: pesquisas em patógenos de plantas conduziram a giberelina; esforços para cultivar tecidos conduziram a citocininas; o controle de abscisão e dormência conduziram ao ácido abscísico; e os efeitos do gás iluminação e fumaça conduziram ao etileno (DAVIES, 1995). Toda espécie viva (vegetal e animal), possui substâncias elaboradas que são transportadas para diferentes órgãos, e produzem efeitos fisiológicos tais como ativação do desenvolvimento geral e a diferenciação de determinados tecidos, ou mesmo a regulação das reações metabólicas, e, recentemente, substâncias como poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico, brassinosteróides e o peptídeo de sistemina foram somados a esta lista de substâncias que agem como hormônios vegetais (DAVIES, 1995). Hormônios vegetais têm um papel ativo essencial, controlando o crescimento e desenvolvimento de plantas e é geralmente descrito como uma substância orgânica sintetizada em uma determinada parte da planta (FUKUDA, 1996). Os hormônios vegetais são distinguidos por terem importantes papéis na diferenciação do xilema e floema (ROBERTS et al., 1988). Segundo ROBERTS (1988), muitos, se não todos os processos fisiológicos parecem ser regulados por duas ou mais dessas classes de hormônios (auxina, etileno, citocinina, giberelina) simultaneamente ou em alguma ordem seqüencial. Os hormônios atuam sobre proteínas chamadas de receptoras e os sinais hormonais são freqüentemente amplificados e avançam por rotas bioquímicas através de substâncias intermediárias chamadas de

mensageiros secundários (NAGATA, 1995). Muitas das respostas a hormônios vegetais são mediadas através de mudanças na expressão gênica dentro do núcleo, sendo os genes específicos ativados ou desativados como resultado da ação hormonal. Finalmente, os hormônios afetam o crescimento celular ao causar mudanças na arquitetura e nas propriedades químicas da parede celular (FUKUDA, 1996). Este fenômeno é influenciado pelo hormônio auxina, assim como o aumento da síntese protéica, respiração para fornecer a energia necessária, e a entrada de água na célula (DAVIES, 1995). Há a possibilidade de que com tratamentos hormonais, haja uma interferência no sistema genômico gerando expressões enzimáticas que medeiam a formação da lignina dentro da parede celular (HIGUCHI, 1997).

O ácido 3-indol-acético é a única auxina de ocorrência natural conhecida e dependendo do tecido envolvido e outras circunstâncias, a auxina pode estimular a divisão de células, alongamento e a diferenciação celular (BANDURSKI & NONHEBEL, 1984).

A auxina é indubitavelmente o principal hormônio na diferenciação do floema e do xilema (THOMPSON & JACOBS 1966, ALONI, 1980; SACHS, 1984; WARREN & WARREN, 1984). A auxina é definida como um regulador do crescimento das plantas, o qual estimula o alongamento das células do broto e assemelha-se ao ácido 3-indol-acético no espectro da atividade fisiológica (DAVIES, 1995). A base molecular para a ação da auxina em qualquer processo fisiológico, ainda permanece desconhecida, mas, em experimentos com células isoladas do mesófilo de *Zinnia spp* foram obtidos os primeiros sinais do espessamento da parede secundária em 77 horas de cultura em cinetina, porém, não é precisamente conhecido em que duração de tempo, a auxina atua neste mesmo período (FUKUDA & KOMAMINE, 1980). A auxina pode ter funções reguladoras também no RNA e na síntese de proteína entre 24 e 60 horas em cultura de tecido, e isto envolve possivelmente a síntese de enzimas ou tubulinas durante a citodiferenciação (FUKUDA & KOMAMINE, 1983). Depois de 77 horas, mudanças nas peroxidases (MASSUDA & FUKUDA, 1983) e enzimas ligadas à lignificação (FUKUDA & KOMAMINE, 1982), não são detectadas durante a xilogênese. Porque a inibição da atividade da enzima PAL (fenilalanina amônia-liase) e lignificação, não impedem a formação da parede secundária durante a xilogênese, e a lignificação não parece essencial para a iniciação da xilogênese (SMART & ARMHEIM, 1985).

É discutido há muito tempo que auxina representa um papel essencial na atividade cambial em plantas lenhosas, e sua atuação promove pequena divisão celular, mas as derivadas do câmbio formadas sofrem uma diferenciação normal e espessamento da parede da célula (WAREING, 1958; BRUCK & PAOLILLO, 1984). A auxina é indubitavelmente o hormônio mais importante para a diferenciação do floema e do xilema (THOMPSON & JACOBS 1966, ALONI 1980, SACHS, 1984; WARREN & WARREN, 1984).

As paredes celulares crescem tanto em espessura quanto em área, e sua extensão é um processo complexo sobre o controle bioquímico do protoplasto, sendo um processo de afrouxamento da estrutura da parede, assim como o aumento da síntese protéica, respiração para fornecer a energia necessária e a entrada de água na célula são comandados pela auxina (ROBERTS et al., 1988).

O AIA (Ácido indol acético) exógeno demonstrou, através de raízes isoladas de *Raphanus sativus* ser necessário à iniciação e crescimento cambial (TORREY & LOOMIS, 1967). O crescimento do câmbio vascular é inibido quando os fornecimentos de AIA endógenos para a região do câmbio são diminuídos pelo arrancamento de brotos, desfolhamento ou pela aplicação de um inibidor de AIA (LITTLE & SADVIGE, 1987;

SUNDBERG et al., 1990). A ocorrência do AIA (Ácido indol acético) na zona cambial tem sido confirmada em muitas espécies de coníferas (LITTLE et al. 1978; FUNADA ET AL. 1987; SAVIDGE, 1990). Em *Pinus sylvestris*, o AIA está principalmente, presente na zona cambial (SUNDBERG et al., 1990). Enquanto em *Pinus contora* este mesmo hormônio mantia papel importante na diferenciação do xilema (SAVIDGE et al., 1982). A quantidade de AIA na zona cambial difere também em relação ao peso da copa da árvore, quando um conjunto de células vasculares do caule do *Coleus spp* foi excisado, percebeu-se que as células do parênquima e dos elementos de traqueóides diferenciaram-se perceptivelmente (FUNADA et al, 1987).

O inibidor endógeno que foi mais examinado com relação à diferenciação vascular é o ácido abscísico, e as opiniões são divididas em relação às propriedades regulatórias em citodiferenciação (ROBERTS, 1988). De acordo com WODZICKI & WODZICKI (1980) há uma acumulação gradual de ácido de abscísico na zona cambial e no floema mais jovem na região basal de caule de *Pinus silvestre*, próxima do fim da estação de crescimento. Aumentos em ácido de abscísico podem inibir o transporte polar de auxina e, como resultado, tarda o colapso da autólise dos protoplastos durante a fase final de diferenciação de traqueóides (ROBERTS, 1988). Uma demora na citodiferenciação retarda a fase de maturação e resulta na formação de traqueóides espessos característicos de lenho tardio de conífera (ROBERTS, 1988). A aplicação apical de ácido abscísico reduziu a amplitude de transporte morfogênico de auxina de acordo com WODZICKI et al. (1979). JENKINS (1974) demonstrou que o ácido abscísico injetado no caule de muda de *Pinus radiata* durante formação de lenho juvenil produz uma redução no diâmetro radial de traqueóides e diminui a atividade mitótica das células do câmbio vascular.

O etileno é um hormônio vegetal que afeta vários aspectos da formação da madeira, inclusive crescimento em diâmetro, lignificação e formação de lenho de reação (YAMAMOTO & KOZLOWSKI, 1987a). Para o entendimento do papel do etileno na formação do lenho, foi escolhido o álamo como modelo, e neste experimento foi focada a formação do lenho de reação (ANDERSSON et al., 1987). Para ROBERTS (1976) em seus experimentos, o etileno foi um hormônio oculto na iniciação da diferenciação de elemento de traqueóide. No entanto, evidências, ligam o etileno à diferenciação de elementos dos traqueóides, inclusive efeitos na citodiferenciação durante cultura de tecidos de plantas, ele também promove a diferenciação de floema em mudas de *Ulmus spp* (YAMAMOTO et al., 1987a), *Pinus spp* (YAMAMOTO & KOZLOWISK, 1987b) e *Thuja spp* (YAMAMOTO & KOZLOWSKI, 1987).

Há dados que apóiam a hipótese de que o etileno tem um efeito sinérgico sobre a xilogênese na presença de auxina e citocinina, controlando a lignificação nas células de xilema diferenciado pela regulação da atividade da peroxidase na parede (MILLER et al., 1985). Em relação aos caminhos ligados a biossíntese de polifenóis, como a lignina, procedem de observações que durante a gomose no *Prunus spp* e o kino no *Eucalyptus*, são caminhos mediados pelo etileno (NELSON & HILLIS, 1978 OLIE & BUKOVAC, 1982). Dessa forma, os principais papéis do etileno, estariam ligados a regulação da PAL (fenilalanina-amônia-liase) e da peroxidase que são enzimas participativas da biossíntese de lignina (GASPAR et al., 1982). Os papéis do etileno na diferenciação do xilema são desconhecidos, uma hipótese é que o etileno controla a lignificação diferenciando células de xilema pela regulação de atividade da peroxidase na parede celular (MILLER et al., 1985).

Xiloglucam é um polissacarídeo importante na parede das células vegetais em

crescimento (TAKEDA, et al., 2002). Em experimento, o xiloglucam foi incorporado à parede de células de segmentos de caule de ervilha e induziu o rearranjo dos microtúbulos corticais de transversal para longitudinal, entretanto, o oligossacarídeo da parede solubilizou xiloglucam que foi adsorvido pela parede da célula e manteve os microtúbulos na orientação transversal, isto propõe que o metabolismo do xiloglucam controla o alongamento das células vegetais (HAYASHI et al., 1994). Xiloglucam ocorre amplamente nas paredes primárias de plantas superiores, possui uma cadeia principal 1,4-β-glucam com ramificações de 1,6-α-xilosil. A cadeia principal de 1,4-β-glucam pode ligar-se, especificamente, à celulose das microfibrilas através de ligações de ponte de hidrogênio (HAYASHI et al., 1994). O xiloglucam provavelmente contribui para a rigidez da parede da célula formando ligação cruzadas como as microfibrilas adjacentes (HAYASHI, 1989).

O brassinolídeo, lactona esteroidal promove o crescimento do vegetal quando aplicado às plantas em concentrações abaixo de  $10^{-4}$  µg/ml, o produto da *Brassica*, nome latim da planta a qual foi isolada, e o sufixo “olide” é característico das lactonas (MARUMO et al., 1968). Depois do isolamento e identificação do brassinolídeo, vários esteróides relacionados estruturalmente foram isolados. Brassinolídeo é o primeiro e o mais ativo componente da família dos brassinosteróides (BROSA et al., 1996).

As poliaminas por PHILLIPS et al. (1987) tem um papel na indução da divisão e alongamento de células (DAYKIN, et al., 1997) e xilogênese em explantes excisados de tubérculo de alcachofra dormente (*Helianthus tuberosus*). As poliaminas em presença de auxina e citocinina promovem uma seqüência de processos que se inicia com uma fase de ativação (0-24h); atividade mitótica (24-48h) e diferenciação de xilema (depois de 48h) (FRIEDMAN et al., 1986; PHILLIPS et al., 1987).

Alguns estudos apontam que as poliaminas estão envolvidas nos sistemas dos protoplastos de muitas plantas (HUHTINEN, et al., 1982); e que também há um aumento nos níveis desse hormônio depois de aplicação de giberelina em ervilhas anãs crescidas sob luz (KAUR-SAWHNEY, et al., 1986).

A diamina-oxidase e a poliamina-oxidase que estão relacionadas com as poliaminas, ocorrem esporadicamente no reino vegetal e têm sido enfatizadas por estarem presentes no grão de cevada (*Hordeum vulgare* L.) em desenvolvimento e também por terem um possível papel na produção de peróxido de hidrogênio requerido pela peroxidase envolvida na formação da lignina (ASTHIR, et al., 2002).

Nas plantas superiores distingue-se o meristema apical e o lateral, enquanto os meristemas apicais são responsáveis pelo crescimento primário por gerar raízes e brotos, os meristemas laterais promovem o crescimento secundário freqüentemente associado com a formação da madeira (MAUSETH, 1988) *Populus* por exemplo apresenta um sistema modelo para o estudo de xilogênese, sendo a formação da madeira (xilema secundário) um processo ordenado de desenvolvimento que envolve divisão, expansão, deposição de parede secundária, lignificação e morte programada das células (KOZLOWSKI et al., 1991). Devido o lenho ser formado em um ambiente variável e sujeito ao controle de desenvolvimento, as células de xilema são produzidas em diferentes tamanhos, formas, estrutura de parede, textura e composição (MAUSETH, 1988).

O meristema cambial parece ser impossibilitado de disponibilizar suas reais necessidades dos hormônios vegetais auxina e giberelina, e, sendo o broto o principal local da síntese de auxina, fica evidente a relação entre a atividade cambial e o crescimento axial (LITTLE & SAVIDGE, 1987).

Em um estudo detalhado da transição do lenho juvenil para lenho tardio em



coníferas LARSON (1962), enfocou que variações nas características dos traqueóides podem estar relacionadas às mudanças no nível de auxina produzida pelas acículas, em resposta ao fotoperíodo entre outros fatores ambientais.

As informações advindas da anatomia e da fisiologia contribuíram para o conhecimento de que as classes de hormônios até então conhecidas apresentam uma importante contribuição na xilogênese (RICHARDSON, 1960). A expressiva interferência hormonal na xilogênese, que atua diretamente nos processos bioquímicos e estruturais do lenho, pode ser controlada de acordo com o objetivo a que se destina a utilização da madeira (HIGUCHI, 1997).

## 2.4 Giberelinas

As giberelinas se originam de uma ramificação da rota dos diterpenóides (HEDDEN & KAMIYA, 1997; BIEMELT, et al., 2004), e sua biossíntese (OLSZEWSKI et al., 2002; IWASAKI et al., 2003), de acordo com a localização e natureza da enzima envolvida (AACH et al., 1997), pode ser dividida em três maiores estádios (HEDDEN & PHILLIPS, 2000). A formação da GA é iniciada pela ciclização de geranyl-geranyl difosfato no plastídio (LICHTENTHALER et al., 1997). Logo, a GA<sub>12</sub>-aldeído é formada pela ação de citocromo P450-dependente mono-oxigenase sobre o exterior do retículo endoplasmático (HELLIWELL et al., 2001). A GA<sub>12</sub>-aldeído é a primeira GA produzida, é, portanto, o precursor de todas as outras giberelinas, são formadas no citosol em um sistema metabólico complexo, variando entre espécies, fase de desenvolvimento e tecido específico (KOBAYASHI, et al., 1996).

Em experimento realizado com segmentos tirados de caules de plantas de erva mate, com 22 anos de idade, usando as giberelinas GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub> em meio de cultura sólido com concentração de (0,1- 1- 10 mg.l<sup>-1</sup>) SANSBERRO et al., (2000) chegaram aos seguintes resultados: as giberelinas GA<sub>1</sub> e GA<sub>4</sub> promoveram significativamente a produção de brotos maiores que 5 mm comparado com o controle quando as doses foram de 5 mg .l<sup>-1</sup> e 1-5 mg .l<sup>-1</sup> respectivamente; GA<sub>3</sub> e GA<sub>7</sub> não tiveram efeitos ou foram inibidores nas diferentes concentrações.

Já em um experimento realizado por SARKAR et al., (2004) foram usadas mudas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) com o intuito de relacionar os níveis de giberelinas, altura e tolerância ao estresse; para isso as plantas foram expostas a uma temperatura de 50°C por três horas e frio intenso e as mudas que ficaram em casa de vegetação foram tratadas com inibidores de giberelina. A análise destas plantas revelou uma correlação negativa entre a altura e a tolerância ao estresse, e também que as mudas mais baixas com menores níveis de giberelinas ativas para o crescimento são mais tolerantes ao estresse.

Outra característica relacionada aos efeitos das giberelina especialmente a GA<sub>3</sub> foi observada por MOTA et al., (2002) quando trabalhavam em um experimento com banana. Eles observaram que esta giberelina afetou o começo da degradação do amido e mudou o padrão das atividades da amido-fosforilase.

As pesquisas não se restringem somente às frutíferas; segundo DUNBERG & ODÉN (1983) vários relatórios têm relacionado as giberelina com os processos de desenvolvimento e diferenciação sexual em espécies de coníferas. Neste sentido FERNÁNDEZ et al., (2003) realizaram um experimento quantificando as giberelina GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>9</sub>, e GA<sub>20</sub> em cones masculinos de árvores jovens e maduras de *Pinus*

*radiata* através da combinação da espectrometria, cromatografia e o monitoramento de íons selecionados; e tiveram como resultados níveis mais altos de GA<sub>7</sub> e GA<sub>9</sub> e níveis mais baixos de GA<sub>4</sub> em brotos vegetativos juvenis comparados com os brotos mais maduros, e não houve nenhuma diferença em relação à idade para as giberelinas GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> e GA<sub>20</sub>. A giberelina também está envolvida na atividade cambial e é sabido que existe forte sinergismo com a auxina no desenvolvimento normal do câmbio (WANG et al., 1992). Com a atuação somente da giberelina o câmbio sofre uma divisão, mas sem diferenciação celular (WAREING, 1958; DENNE & WILSON, 1977).

No experimento realizado com entrenós de segmentos de caule de arroz alagado (*Oryza sativa* L.) AZUMA et al., (2003) examinaram os efeitos interativos do etileno, giberelina e ácido abscísico a uma baixa umidade relativa, embora o etileno sozinho dificilmente promoveu o alongamento de entrenó de seções do caule, a uma umidade relativa de 30%, ele intensificou o alongamento de entrenó induzido por GA<sub>3</sub>; já com o ácido abscísico este efeito promotor não foi encontrado nos entrenós tratados com etileno ou com GA<sub>3</sub> a 30% de umidade relativa ou nos entrenós tratados com etileno e/ou giberelina a 100% de umidade relativa.

ASTHIR, et al., (2004) relacionaram o aumento de giberelina induzida com os níveis de poliamina e amina-oxidases em epicótilo, raiz e folha de mudas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) e concluíram que houve um significativo aumento na taxa de alongamento do epicótilo e folha em mudas de cevada da cultivar Maythorpe tratadas com ácido giberélico comparada com a cultivar Golden Promise e que as poliaminas podem representar um papel em giberelina induzida no alongamento de epicótilo e folha de cevada.

MICHAELS, et al., (1999) realizaram um experimento onde o mutante de *Arabidopsis* (ga 1-3) que contem um supressor em uma enzima que catalisa um passo prematuro na síntese de ácido giberélico.

Ao contrário da citocinina, a qual estimula a atividade mitótica na presença da auxina nas culturas de tecido, as giberelinas não têm forte efeito no progressivo número de células em suspensão das culturas em que a biossíntese da giberelina endógena tem sido bloqueada (RAPPAPORT, 1980). As giberelinas ativas mostram muitos efeitos fisiológicos, cada um depende do tipo de giberelina presente bem como a espécie de planta e entre os vários processos fisiológicos induzidos pelas giberelinas, está o estímulo ao alongamento do caule (HEDDEN & PROEBSTING, 1999), estimulando a divisão e alongamento de célula (DAVIES, 1995; KENDE & ZEEVAART, 1997). O crescimento longitudinal envolve o alongamento de unidades funcionais do caule como folha, broto axilar, entrenó subjacente depois de um período de dormência (crescimento fixo) ou a iniciação simultânea e extensão de novas células do caule (crescimento livre), ou alguma combinação destes dois processos (LANNER, 1976). Com relação à estimulação do crescimento longitudinal (WANG et al., 1995) sabe-se que as giberelinas afetam tanto a plasticidade das paredes celulares como também o componente osmótico do potencial hídrico responsável pela entrada de água nas células vegetais (PHARIS et al., 1991). Ao promoverem a biossíntese de enzimas que hidrolisam o amido, a sacarose e a frutose, as giberelinas contribuem para o aumento da concentração de solutos e conseqüentemente para a redução do potencial hídrico no interior das células (CASTRO, 1988).

As fibras são células longas e estreitas, com paredes secundárias espessas que são normalmente lignificadas, sua principal função é o suporte e são encontradas no xilema e no floema e surgem de iniciais axiais que se alongam muito durante sua maturação (ALONI

et al., 1990). Um tipo novo de diferenciação, em que células de parênquima entre a rediferenciação de elementos vasculares longitudinais para formarem fibras de floema regenerativas, foram induzidas em torno de feridas em entrenós jovem de *Coleus* (ALONI, 1976). As fibras regenerativas são relativamente lentas para diferenciar e podem ser observadas em 3 semanas ou mais depois de feridas. Elas alongam-se principalmente pelo crescimento intrusivo de seus fins basais e apicais (ALONI, 1976). Borrifando as folhas de plantas intactas com GA<sub>3</sub> aumentou o número de fibras em juta (SIRCAR & CHAKRAVERTY, 1960), aumentou a duração de fibras em linho (ATAL, 1961), e aumentou o número e tamanho de fibras em outros gêneros (STANT, 1963).

SACHS (1972) estudou a diferenciação de fibras de floema primário nos elementos de ervilha (ALONI & GAD, 1982) e achou que a diferenciação destes elementos depende de incentivos que originam nos primórdios de folhas muito jovens, logo, a remoção deste primórdio impediu a formação dos elementos de fibra.

Estudos de diferenciação de fibra de floema primário em *Coleus* tem mostrado que a diferenciação de fibras é induzida por estímulos que originam em folhas jovens (ALONI, 1978) bem como em folhas maduras (ALONI, 1976, 1978). O uso da excisão combinada com partes injuriadas do caule em *Coleus* tem mostrado que os sinais de diferenciação de fibras originam nas folhas e no fluxo da seiva em uma forma estritamente polar das folhas para as raízes. Experimentos que realizaram injúrias em plantas de ervilha revelaram que os estímulos indutivos translocam-se polarmente ao longo do eixo da planta, e induzem fibras ao longo do seu caminho em caule e raiz (GAD & ALONI, 1984).

Seguindo o enfoque da relação das folhas com as fibras, ALONI (1979) mostrou que o papel das folhas na diferenciação de fibras de floema primário em *Coleus* pode ser substituído por aplicações exógenas de combinação de AIA e GA<sub>3</sub>, considerando que o GA<sub>3</sub> sozinho não mostrou efeito visível sobre a formação da fibra. Evidentemente a GA<sub>3</sub> só pode afetar a diferenciação da fibra de floema na presença de auxina, portanto, combinações de AIA com GA<sub>3</sub> substituem completamente o papel das folhas em diferenciação de fibra de floema, qualitativamente e quantitativamente (ALONI, 1979). O efeito dos reguladores de crescimento, concluiu ALONI (1979), sobre a diferenciação de fibras, porém, diminuiu consideravelmente com distância a crescente da fonte de aplicação. Estas conclusões explicam a diminuição provavelmente no número de fibras e o seu aumento no tamanho ao longo do eixo da planta desde as folhas aos ápices das raízes (DENNE & WHITBREAD, 1978; ALONI & GAD, 1982; DODD, 1985).

Quando várias combinações de ambos os reguladores de crescimento eram aplicadas com lanolina em caules decapitados, concentrações altas de AIA estimularam a diferenciação rápida de fibras com paredes secundárias espessas, considerando que níveis altos de GA<sub>3</sub> produziram fibras longas com paredes delgadas (ALONI, 1979). A indução de fibras longas pela GA<sub>3</sub> é compatível com os constatados em estudos recentes no efeito de GA<sub>3</sub> aplicado por pulverização em folhas de plantas intactas (ATAL, 1961; STANT, 1963). A presença combinada de ambos os reguladores de crescimento (auxina e giberelina) é exigência para a diferenciação de fibras de xilema secundário em *Populus* (DIGBY & WAREING, 1966) e em *Phaseolus* (HESS & SACHS, 1972). Concluiu-se em experimentos realizados com aplicação AIA e GA<sub>3</sub>, que tanto a diferenciação de fibras quanto a condução de elementos nos filamentos vasculares resultam de uma dependência comum sobre o movimento polar de AIA, a diferença, porém, está na diferenciação de elementos de condução e fibras, é que esse necessita de um estímulo adicional, isto é, GA<sub>3</sub> (ALONI, 1979; RIDOUTT et al., 1996). As giberelinas são hormônios vegetais que

induzem o alongamento de células do xilema assim como a diferenciação do floema e combinada à auxina aumenta a diferenciação das fibras floemáticas (FUKUDA & KOMAMINE, 1982) e promovem o crescimento de caule e folha (SUN & GUBLER, 2004).

## 2.5 Citocininas

Citocininas são um grupo de hormônios vegetais que promovem divisão de célula e exercem um importante papel na regulação de vários processos biológicos relacionados ao crescimento ativado, aumento da atividade metabólica e no desenvolvimento de plantas (LARA, et al., 2004).

Baseada em evidências experimentais KAPCHINA-TOTEVA & YAKIMOVA (1997), após subculturarem nós isolados de um tipo de roseira (*Rosa hybrida* L.) cultivados *in vitro*, testaram dois tipos de citocininas com três concentrações diferentes e concluíram que 1.0  $\mu\text{M}$  de N<sup>6</sup>-benziladenina (BA) acelerou a atividade da peroxidase (enzima ligada à biossíntese de lignificação).

Vários processos morfo genéticos (divisão celular, ampliação e diferenciação, desenvolvimento de flores e fruto, crescimento de gema, dominância apical e senescência) são controlados por sistemas complexos desenvolvidos pelo metabolismo e regulação das citocininas em plantas superiores (AUER, 1997).

Os reguladores de crescimento da classe das citocininas são muitos empregados em experimentos biotecnológicos, devido sua atuação na célula (FUKUDA & KOMAMINE, 1985; SAKS et al., 1984; ALONI, 1982).

As citocininas são reguladores de crescimento de plantas que estimulam a divisão celular, e quando são adicionadas exógenamente ao tronco da árvore, estimulam a atividade cambial e a indução de auxina (FUKUDA & KOMAMINE, 1985; MORK & MORK, 2001). Os estudos descrevem sobre o efeito sinérgico da cinetina e auxina sobre a xilogênese envolvida em segmentos excisados de caules de ervilha (SOROKIN et al., 1962; SOROKIN & THIMANN, 1964) e em cultura de tecidos de tabaco (BERGMANN, 1988). No entanto, a presença de cinetina teve o objetivo de bloquear a xilogênese durante a cultura de segmentos de caule excisado de *Coleus* (FOSKET & ROBERTS, 1964). Em experimentos com cultura de tecido, a citocinina foi reconhecida por estimular a divisão celular e por controlar a diferenciação de elementos de traqueóides (DALESSANDRO & ROBERTS, 1971) e fibras de xilema secundário (ALONI, 1982). O papel da citocinina foi estudado durante a diferenciação em plantas de *Helianthus annuus* (SAKS et al., 1984). ALONI (1982) mostrou que a citocinina é requerida durante as fases iniciais de diferenciação da fibra, embora as mais recentes fases de maturação da fibra podem acontecer na ausência de citocinina e também que a correlação entre o desenvolvimento do corpo da planta e a diferenciação de seus tecidos suportes podem surgir de uma dependência comum nos mesmos sinais de controle de retroalimentação broto/raiz. Realmente, experimentos com plantas intactas de *Helianthus* apoiaram esta visão e indicaram que a diferenciação do xilema secundário é dependente de um sinal que origina nos ápices das raízes, isto é, sobre a citocinina (SAKS et al., 1984). A citocinina aplicada ao caule de *Coleus* aumentou a sensibilidade para a auxina sendo que uma pequena quantidade de auxina induziu a formação de vasos condutores (FUKUDA & KOMAMINE, 1982; FUKUDA 1989).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Implantação do experimento no viveiro

A primeira fase do experimento ocorreu no viveiro do Instituto de Florestas da UFRRJ, onde as sementes foram germinadas em tubetes com capacidade de 53cm<sup>3</sup>, preenchidos com o substrato (60% de composto orgânico, 20% de argila, 10% de areia e 10% de vermiculita). Foram utilizadas sementes certificadas do IPEF de procedência conhecida de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden). No viveiro foram feitas três adubações e tratos silviculturais normais para a formação de plantas saudáveis (raleio, limpeza, irrigação). Após 80 dias foi feita repicagem para 45 tubetes com capacidade de 3,8L, tendo uma planta por tubete.

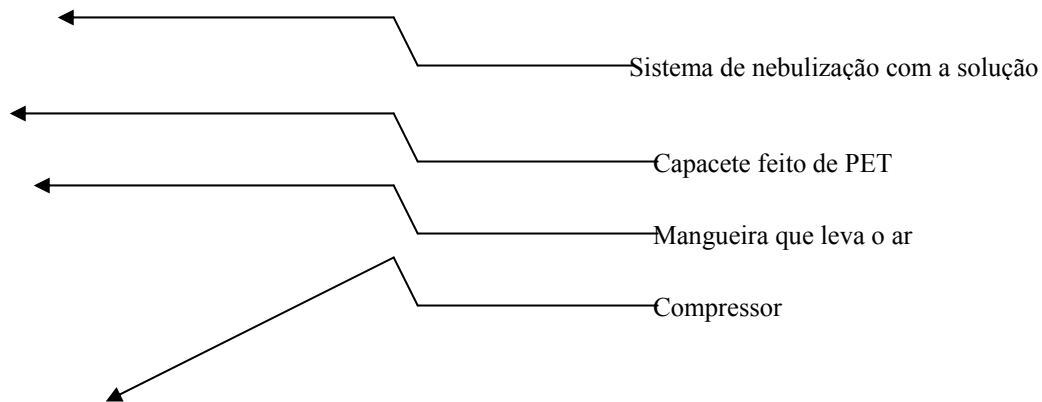
#### 3.2 Casa de vegetação

A segunda fase ocorreu na casa de vegetação do Departamento de Solos do Instituto de Agronomia da UFRRJ. Fase onde foram realizadas as aplicações dos reguladores de crescimento.

A primeira aplicação foi feita aos 90 dias (segunda quinzena do mês de Junho). Nas aplicações hormonais cada uma das quarenta e cinco (45) plantas recebeu através do uso da técnica por capacete de atomização (Fig.2) – sistema constituído por uma câmara (garrafa PET) e usando um sistema próprio para nebulização, onde foram colocadas as soluções de reguladores de crescimento, e um compressor - os 09 tratamentos com as respectivas concentrações: GA<sub>3</sub> (49,13 µM e 98,26 µM); BAP (111 µM e 222 µM). Soluções aquosas dos reguladores de crescimento do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 6-benzilaminopurina (BAP) e testemunha (G<sub>[0]</sub>C<sub>[0]</sub>) utilizou-se as seguintes simbologias para posteriores combinações: G<sub>[1]</sub> (49,13 µM), G<sub>[2]</sub> (98,26 µM); C<sub>[1]</sub> (111 µM), C<sub>[2]</sub> (222 µM) e água bideionizada para as testemunhas. O experimento foi estabelecido da seguinte maneira: G<sub>[1]</sub>; G<sub>[2]</sub>; C<sub>[1]</sub>; C<sub>[2]</sub>; G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub>; G<sub>[1]</sub>C<sub>[2]</sub>; G<sub>[2]</sub>C<sub>[1]</sub>; G<sub>[2]</sub>C<sub>[2]</sub> e G<sub>[0]</sub>C<sub>[0]</sub> (testemunha) utilizando as respectivas concentrações, com cinco repetições cada tratamento e delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Cada vaso recebeu 350 mL de água somente sobre o substrato durante toda a segunda fase do experimento, sendo que nos dias mais quentes foram feitas duas irrigações. Também nesta fase foram feitas medidas diárias de temperatura e luz. As aplicações eram iniciadas sempre às 5 horas da manhã.





**Figura 2.** Sistema de aplicação do hormônio por capacete de atomização sobre as plantas em casa de vegetação.

### 3.3 Preparação das soluções de reguladores de crescimento

Para preparar as soluções de GA<sub>3</sub>, 49,13 µM desse regulador de crescimento foram preparadas solubilizando 17 mg deste produto em água com algumas gotas de KOH 1M, colocado em um balão volumétrico de 1000 mL. O mesmo foi feito para 98,26 µM de GA<sub>3</sub>, solubilizando 34 mg.

Para preparar as soluções de BAP, foi utilizado 25 mg desse regulador de crescimento para solubilizar em água + gotas de HCl 1M e colocado em um balão volumétrico de 1000 mL e completado com água bideionizada até 1L. O mesmo foi feito para 50 mg de BAP.

Antes das aplicações foi adicionado às soluções dos reguladores de crescimento 3 µg de uma solução aquosa concentrada do tensoativo (classe de espalhante adesivo; grupo químico alquil fenol etoxilado e composição alquil fenol poliglicoléter de concentração de 250 g/L) para cada 15 mL de solução de reguladores de crescimento inclusive na água bideionizada da testemunha. Este produto tem a capacidade de diminuir a superfície de tensão de líquidos nas folhas para facilitar a penetração da solução, garantindo a eficiência de absorção.

Todas as soluções foram acondicionadas sob refrigeração.

### **3.4 Aplicação**

Um recipiente confeccionado com uma garrafa PET revestiu a parte aérea das plantas durante as aplicações. O tempo de aplicação por planta foi de 2 minutos/planta, começando sempre às 5 horas da manhã nas mesmas condições de fluxo e pressão. Foram feitos sete aplicações com um intervalo de 10 dias entre as aplicações. No término dos tratamentos foi dado um intervalo de 10 dias para coletar as plantas tratadas para o começo das análises. Este intervalo foi definido para melhor visualizar o efeito da última aplicação.

### **3.5 Coleta do material vegetal**

A coleta do material foi realizada separando as partes do caule, determinando cada uma para um tipo de análise e acondicionando-as devidamente em local apropriado (refrigerado): a parte próxima à base foi utilizada para estudos de anatomia e até antes do terceiro entrenó para análise química.

Os cortes anatômicos, montagem de lâminas, captura de imagens, medições de fibras e vasos foram realizados no Laboratório de Anatomia Estrutural do Centro de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. As análises químicas foram realizadas nos Laboratórios de Química e de Biotecnologia da Madeira do DPF do Instituto de Florestas da UFRRJ, e no Laboratório de Produtos Naturais de Far-Manguinhos, FIOCRUZ.

#### **3.5.1 Preparação do material para análise citológica**

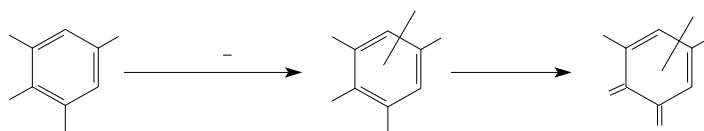
O primeiro segmento das bases dos caules (a partir de 1 cm) – usados para os cortes transversais - foram coletadas de todos os tratamentos e colocados imersos imediatamente em frascos contendo solução conservadora (FAA): 5 mL de formol, 90 mL de álcool etílico e 5 mL de ácido acético (JOHANSEN, 1940).

O segundo segmento foi retirado dos caules – para a dissociação – foram coletados e imersos em frascos contendo solução conservante: 150 mL de glicerina, 300 mL de álcool e 400 mL de água. As mensurações microscópicas foram feitas determinando a espessura da parede do vaso, diâmetro do vaso (corte transversal), comprimento de vaso, espessura da parede de fibra, comprimento de fibra, diâmetro de fibras, diâmetro do lúmen de fibra (macerado).

#### **3.5.2 Teste de cor do reagente de Mäule**

O procedimento para este teste (LIN & DENCE, 1992) foi realizado em três etapas: com permanganato de potássio 1%; ácido clorídrico 3% e hidróxido de amônio concentrado. Foram feitos vários cortes citológicos transversais em micrótomo com espessura de 20  $\mu$  retirados do segmento do caule a uma mesma altura para todos os tratamentos (acima de 1 cm a partir da base do caule). Esses cortes foram colocados em

uma placa de Petri (uma para cada tratamento) e imersos em solução de permanganato de potássio a 1% por 5 min a temperatura ambiente. A solução foi descartada e a amostra lavada duas vezes com água bideionizada e então tratada com uma solução de ácido clorídrico a 3% até a cor passar de marrom escuro à marrom claro. Quando necessário, adicionou-se ácido clorídrico 3% para facilitar a descarga da cor escura. A solução de ácido clorídrico foi descartada, e a amostra lavada duas vezes com água. O passo seguinte foi o tratamento com o hidróxido de amônio concentrado. O teste de Mäule é um procedimento analítico de reação de cor sobre o tecido ou lignina para verificação da presença de unidades siringila. Na reação de Mäule, o permanganato de potássio é reduzido pela madeira a dióxido de manganês, que é depositado sobre a fibra; o posterior reage com ácido clorídrico, formando cloro que reage com a lignina (NAKANO & MESHITSUKA, 1992). Este teste compreende a seguinte reação (Fig. 3) (IIYAMA & PANT, 1988):

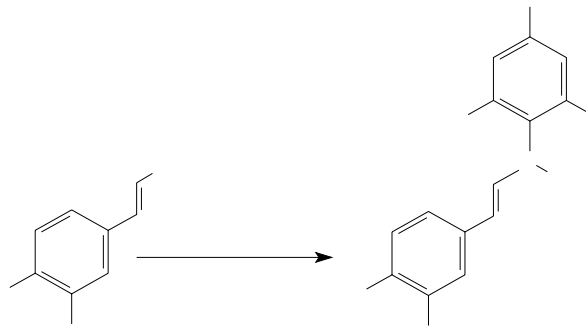


**Figura 3.** Reação de Mäule

### 3.5.3 Teste de cor do reagente de Wiesner

O reagente foi preparado por uma combinação de 50 mL de uma solução de floroglucinol 2% em etanol 95% e 25 mL de ácido clorídrico concentrado. O reagente não é muito estável, logo a solução de floroglucinol foi armazenada em um vidro âmbar (com rolha de vidro) e misturado com o ácido clorídrico imediatamente antes do uso. Quando o reagente foi aplicado em forma de gota sobre o corte de tecido lenhoso, apareceu instantaneamente uma cor violácea avermelhada (ADLER et al., 1948). Este teste compreende a seguinte reação (Fig. 4):





**Figura 4.** Reação do teste de Wiesner

### 3.5.4 Dissociação

A dissociação foi feita com o segmento do caule retirado logo acima do segmento utilizado para os cortes transversais. A dissociação foi feita com o objetivo de mensurar os elementos anatômicos e observar os elementos de vasos e de fibras isoladamente. Os segmentos de caule selecionados para a maceração foram cortados longitudinalmente (reduzidos a filetes) e a amostra de cada tratamento foi submersa em solução (1:1) de água oxigenada e ácido acético, ficando por 48 horas na estufa à 60° C, para a dissociação do material. Depois de dissociado o material foi lavado com água bideionizada e corado com safranina alcoólica 1%.

## 3.6 Preparação do material para análise química

A parte do caule utilizada para a análise química foi a retirada da parte superior dos segmentos usados para os estudos anatômicos até antes do terceiro entrenó. Esses segmentos de caule reservados para a análise química (cinco repetições de cada tratamento) foram descascados e acondicionados em câmara fria e depois moídos.

### 3.6.1 Obtenção do material lignocelulósico livre de extrativos

Uma certa quantidade de material moído e seco passou por um conjunto de peneiras, para ser homogeneizado. Essas amostras passaram por uma extração contínua de vinte e quatro horas (para cada solvente) em um extrator do tipo Soxhlet utilizando os solventes segundo a série elutropica: ciclo hexano, acetato de etila, metanol e por fim uma extração com água (BROWNING, 1967).

Após o término da extração o material solúvel foi concentrado em um evaporador

rotatório, armazenado em um dessecador até ficar completamente seco e pesado (para quantificar os extrativos).

### 3.6.2 Obtenção da percentagem de proteína total

Esta análise foi realizada na EMBRAPA Agrobiologia. Para obtenção da proteína total de cada tratamento, foi usado o material livre de extrativos. Foi quantificado o teor de Nitrogênio total através do método kjedahl (BODDEY, et al., 1983; BREMMER, 1965b; LOUREIRO & BODDEY, 1986).

O material necessário foi: tubos de digestão de 80 mL; erlenmeyer de 125 mL; Kjeltex auto analyzer; balança com precisão de 1 mg; ácido sulfúrico P.A.; solução de hidróxido de sódio 44,4%; solução indicadora de ácido bórico 1% e solução de THAM (Tri hidroxí amino metano) 0,03N.

#### Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 44,4% - foram pesados 444 g de hidróxido de sódio e dissolveu de 0,8 L de água, transferiu para um balão de 1 L e aferiu o balão. Solução indicadora de ácido bórico 2%.

Solução de THAM (Tri hidroxí amino metano) 0,03N - foram pesados 3,5 g de Tri hidroxí amino metano e dissolvido em um balão volumétrico de 1 L. Foi aferido o balão.

#### Procedimento

A solução de ácido sulfúrico usada no aparelho Kjeltex auto analyzer foi padronizada, com um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 10mL de solução indicadora de ácido bórico 2% e 5 mL de solução de THAM 0,03N, titulou-se com ácido sulfúrico, e efetuou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Normalidade do ácido} = \frac{\text{N do THAM} \times \text{Volume THAM}}{\text{Tit. Versus THAM}}$$

Com a normalidade do ácido, colocou-se o tubo de digestão com amostra no Kjeltex auto analyzer.

### 3.6.3 Obtenção do material livre de proteína

Devido a utilização de tecido jovem – onde a quantidade de proteína é proeminente – foi feito um tratamento para solubilizar a proteína total.

Um grama material livre de extrativos foi colocado em erlenmeyer de 250mL (um erlenmeyer por tratamento) com 40 mL de solução de pepsina (1% em ácido clorídrico 0.1 N) que ficaram em banho-maria a 40°C (13 horas para padronizar todas as amostras).

Após este período as amostras foram filtradas em um funil de placa sintetizada sob vácuo: foram lavadas duas vezes com 48 mL (para cada lavagem) com água quente; 12,8mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (5%). Em seguida a amostra foi transferida para um balão de vidro com 240 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5%) e colocada em refluxo por uma hora.

Novamente foi transferida para um filtro e sob vácuo: a amostra foi lavada três

vezes com 48 mL de água bideionizada quente (para cada lavagem); duas vezes com 32 mL de etanol (para cada lavagem) e duas vezes com 24 mL de éter (para cada lavagem).

### **3.7 Lignina insolúvel de Klason**

Trezentos miligramas de amostra seca (livre de extrativos e proteína) foram transferidas para um tubo de ensaio, adicionando-se 3mL de ácido sulfúrico 72%. Foram maceradas com um homogeneizador mecânico de tecidos (Potters – B. Braun Biotech Internacional) por 3 minutos e maceração manual contínua durante 1 hora. Os tubos de ensaio durante a maceração foram mantidos a uma temperatura entre 25 a 30<sup>0</sup>C em banho-maria. O material foi transferido para um balão (um para cada tratamento) de 250mL e diluído a solução de ácido sulfúrico, adicionando 84mL de água bideionizada. O material ficou em refluxo por 4h seguidas e deixado em repouso para sedimentação da lignina. A solução de lignina ácida foi filtrada em um cadinho de porcelana tarado e colocado em estufa a 105<sup>0</sup>C. Por último os filtros contendo as amostras foram pesados calculando-se a porcentagem de lignina na madeira (EFFLAND, 1977).

Cálculo para a porcentagem de lignina:

$$\% \text{ lignina} = [\text{peso seco(mg)}/\text{peso da amostra em mg (300mg)}] * 100$$

### **3.8 Lignina dioxano**

Adicionou-se lentamente, em um balão de 500ml com duas saídas e contendo amostra de madeira, uma solução de dioxano e H<sub>2</sub>O 9:1 + HCl. A mistura reacional adquirida diretamente com a amostra de madeira foi aquecida em manta de aquecimento a 90-95<sup>0</sup>C, em atmosfera de nitrogênio, por um período de 4 horas. Em seguida, deixou-se esfriar a mistura reacional ainda em atmosfera de N<sub>2</sub>, depois foi filtrada e lavada em um funil de Büchner com 12 mL da mesma solução. O extrato (solução ácida) foi concentrado, em um evaporador rotatório, até o momento em que um material de natureza viscosa apareceu no balão. Precipitou-se este material em um grande volume de H<sub>2</sub>O bideionizada sob agitação permanente. O precipitado foi separado por centrifugação, decantação e, em seguida, lavado totalmente com H<sub>2</sub>O, por três vezes, usando centrifugação. A amostra, em seguida, foi seca em um dessecador com hidróxido de sódio e sílica sob vácuo (LIN & DANCE, 1992).

### **3.8.1 Acetilação**

Inicialmente, foi dissolvido 50mg de lignina em 5ml de piridina, em seguida, adicionado 5ml de anidrido acético, na proporção (1:1) durante 48 horas. Depois, a lignina foi recuperada, da mistura reacional em éter etílico por precipitação e lavada cuidadosamente com este mesmo solvente. Posteriormente, foi seca a frio no dessecador de vidro, com KOH sob vácuo durante três dias (ABREU, et al., 2002).

### **3.9 Determinação do teor de metoxila por RMN**

A determinação do teor de metoxila foi realizada por espectroscopia de RMN<sup>1</sup>H em um aparelho Bruker AMX-360. Os espectros foram registrados em clorofórmio deuterado com as ligninas Dioxano acetiladas de cada tratamento. A determinação foi realizada pelo método descrito por (Abreu & Freire1995).

### **3.10 Espectroscopia no infravermelho**

Os espectros da madeira livre de extrativos foram registrados com as amostras moídas em um moinho gitorio de bolas em aço inoxidável, durante 24 horas. Por se tratar de espectros de madeira, as atribuições foram feitas segundo um padrão (lignina de Björkman *Gallesia gorazema*) por onde as séries correspondentes às ligninas foram atribuídas. Os espectros foram registrados em aparelho de espectrometria no IV por transformada de Fourier, Perkin-Elmer. Para essa análise foi usada 2 mg de amostra de material lignocelulósico e 200 mg de KBr.

### **3.11 Delineamento estatístico**

O experimento implantado é fatorial completo com delineamento inteiramente casualizado, sendo composto de três fatores e cada fator com três níveis. Para as análises anatômicas (diâmetro, lúmen, espessura de parede e comprimento de fibra; diâmetro, comprimento e espessura do vaso) foram usadas 25 repetições, para a lignina de Klason 3 repetições e para a altura e diâmetro da planta foram usadas 5 repetições. Foram feitos testes de normalidade (5% de probabilidade), análises de variância, teste de Tukey (5% de probabilidade), testes de homogeneidade de variâncias (Hartley, Cochran e Bartlett) para todos os tratamentos.

Segundo STORK et al. (2000), os tratamentos que compõem cada fator são os níveis do fator e as combinações entre os níveis dos fatores formam os tratamentos do

experimento fatorial.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os dados analisados tiveram distribuição normal, quando submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, ao nível de significância de 5% para teor de lignina, altura final, diâmetro final, diâmetro da fibra, lúmen da fibra, comprimento da fibra, espessura da parede da fibra, comprimento do vaso, diâmetro do vaso e espessura da parede do vaso. Foi também verificada a homogeneidade das variâncias, pelo teste de Bartlett com a mesma significância.

##### 4.1 Diâmetro da fibra

Através da análise de variância e pelo teste de Tukey, realizados para o diâmetro da fibra foi possível perceber que em presença de ambas concentrações de  $GA_3$  ( $G_{[1]}$  e  $G_{[2]}$ ) houve um aumento no diâmetro da fibra, além de uma diferença significativa em relação à testemunha (Tab. 1). Resultado semelhante se confirmou em *Pinus radiata*, quando um pequeno teor de giberelina é adicionado ao caule dessa planta, além da formação de xilema no caule, houve também um aumento no diâmetro do traqueídeo (PHARIS, et al., 1981).

Em presença dos tratamentos  $C_{[1]}$  e  $C_{[2]}$  que usaram BAP também aumentaram o diâmetro da fibra (15,88  $\mu\text{m}$  e 16,22  $\mu\text{m}$ ) (Fig.5) em relação à testemunha, porém o aumento do diâmetro das fibras proporcionados pela presença dos tratamentos com o  $GA_3$  foram maiores.



**Figura 5.** Fibras do tratamento  $C_{[1]}$  (111  $\mu\text{M}$  de BAP).

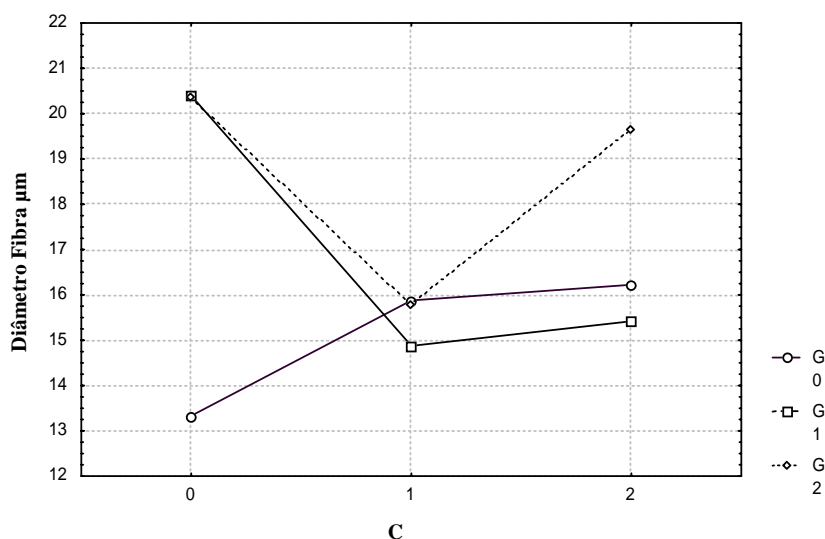
As combinações (Fig. 6) entre o  $GA_3$  e BAP ( $G_{[1]}C_{[1]}$  e  $G_{[1]}C_{[2]}$ ) não apresentaram diferenças significativas entre si. Já os tratamentos  $G_{[2]}C_{[1]}$  e  $G_{[2]}C_{[2]}$  apresentaram diferença entre si, sendo que em presença do tratamento  $G_{[2]}C_{[2]}$ , os diâmetros das fibras foram

compatíveis com os tratamentos  $G_{[1]}$  e  $G_{[2]}$ , isto é, aumentaram.

**Tabela 1.** Comparações múltiplas entre as médias do **diâmetro de fibra** ( $\mu\text{m}$ )

		$GA_3$		
		$G_{[0]}$	$G_{[1]}$	$G_{[2]}$
<b>BAP</b>	$C_{[0]}$	13,33aA	20,39bB	20,37bA
	$C_{[1]}$	15,88aB	14,87aB	15,78aB
	$C_{[2]}$	16,22aB	15,42aB	19,64bAC

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância;  $GA_3$  (ácido giberélico),  $G_{[0]}$  (ausência de  $GA_3$ ),  $G_{[1]}$  (presença de  $49,13 \mu\text{M}$  de  $GA_3$ ),  $G_{[2]}$  (presença de  $98,26 \mu\text{M}$  de  $GA_3$ ),  $C_{[0]}$  (ausência de BAP),  $C_{[1]}$  (presença de  $111 \mu\text{M}$  de BAP),  $C_{[2]}$  (presença de  $222 \mu\text{M}$  de BAP).



**Figura 6.** Interações dos tratamentos para o diâmetro da fibra.

#### 4.2. Diâmetro do lúmen da fibra

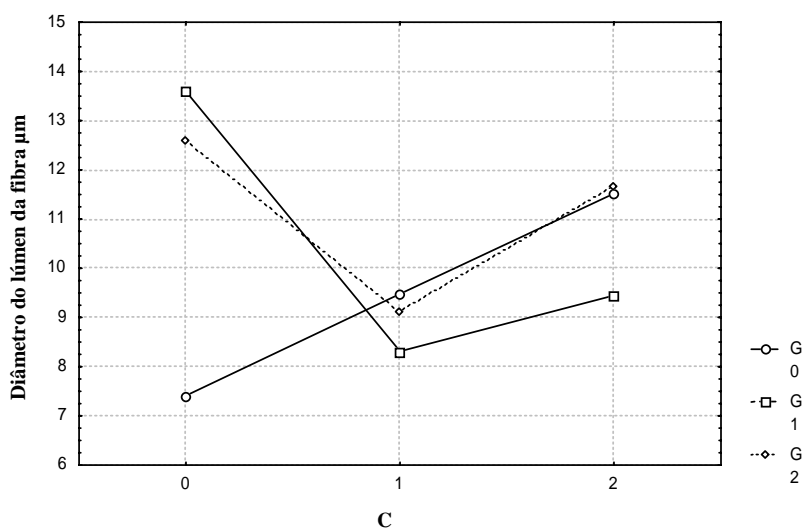
As comparações entre as médias (Tab. 2) mostraram que em presença dos tratamentos  $C_{[2]}$ ,  $G_{[1]}$ ,  $G_{[2]}$  e  $G_{[2]}C_{[2]}$ , os diâmetro do lúmen da fibra aumentaram, diferindo significativamente da testemunha ( $7,41 \mu\text{m}$ ).

A Figura 7 mostra as variações no diâmetro do lúmen da fibra de acordo com os diferentes tratamentos.

**Tabela 2.** Comparações múltiplas entre as médias do **diâmetro do lúmen de fibra** ( $\mu\text{m}$ )

		<b>GA<sub>3</sub></b>		
		<b>G<sub>[0]</sub></b>	<b>G<sub>[1]</sub></b>	<b>G<sub>[2]</sub></b>
<b>BAP</b>	<b>C<sub>[0]</sub></b>	7,41aA	13,59bA	12,61bA
	<b>C<sub>[1]</sub></b>	9,48aA	8,31aB	9,10aB
	<b>C<sub>[2]</sub></b>	11,52aB	9,44bB	11,66aA

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância; GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), G<sub>[0]</sub> (ausência de GA<sub>3</sub>), G<sub>[1]</sub> (presença de 49,13  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>), G<sub>[2]</sub> (presença de 98,26  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>), C<sub>[0]</sub> (ausência de BAP), C<sub>[1]</sub> (presença de 111  $\mu\text{M}$  de BAP), C<sub>[2]</sub> (presença de 222  $\mu\text{M}$  de BAP).



**Figura 7.** Interações dos tratamentos para o diâmetro do lúmen da fibra.

Na ausência de GA<sub>3</sub>, o tratamento com a maior concentração de BAP (C<sub>[2]</sub>) diferiu significativamente da testemunha e aumentou o diâmetro do lúmen da fibra. O tratamento C<sub>[1]</sub> não diferiu significativamente dos tratamentos que usaram a combinação de GA<sub>3</sub> e BAP como G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub>, G<sub>[2]</sub>C<sub>[1]</sub>, G<sub>[1]</sub>C<sub>[2]</sub> e G<sub>[0]</sub>C<sub>[0]</sub> (testemunha).

### 4.3.Comprimento da fibra

Os tratamentos  $G_{[1]}$  e  $G_{[2]}$  que usaram as duas concentrações isoladamente de  $GA_3$  não tiveram diferença significativa entre si, porém, em relação à testemunha, a presença desses tratamentos diminuíram o **comprimento da fibra** de *Eucalyptus grandis* (Tab.3). No entanto, não foi esse o resultado para o comprimento de fibra do xilema em plantas de *Populus robusta* (DIGBY & WAREING, 1966) quando o  $GA_3$  foi aplicado em presença de AIA e também para plantas têxteis como o cânhamo quando o mesmo foi aplicado às folhas desta planta (ATAL, 1961); pois em ambos os casos o comprimento das fibras foram aumentados. ALONI (1979) constatou que altos níveis de  $GA_3$  produziu fibras mais longas em *Coleus* e aumentou não só o tamanho, mas também o número de fibras em vários outros gêneros (STANT, 1963).

Uma redução significativa no comprimento da fibra em relação à testemunha foi percebido com a presença do tratamento  $C_{[1]}$ . No entanto, em presença da maior concentração de BAP ( $C_{[2]}$ ), não houve diferença significativa em relação à testemunha.

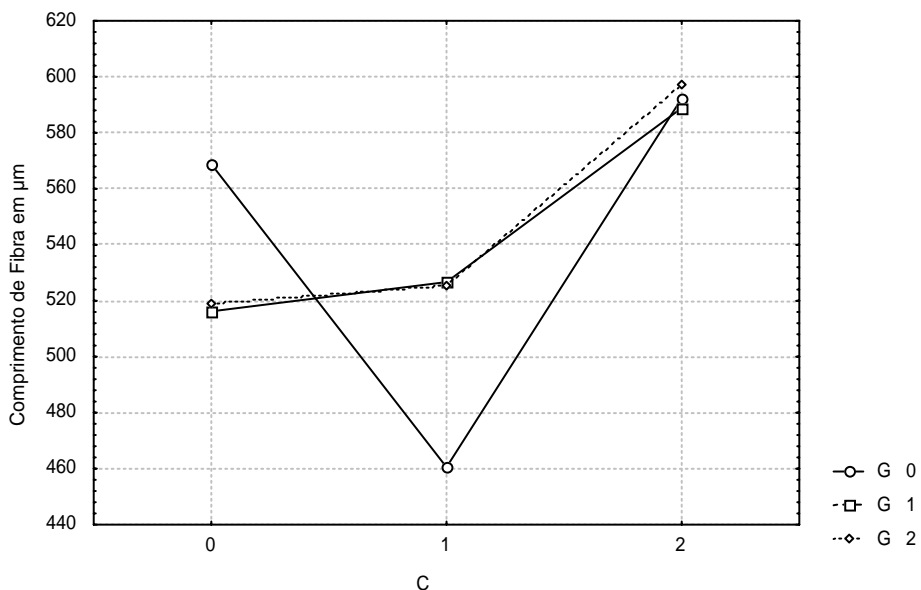
Os tratamentos que usaram a combinação de  $GA_3$  e BAP ( $G_{[1]}C_{[1]}$  e  $G_{[2]}C_{[1]}$ ) não diferiram-se significativamente entre si em relação ao comprimento da fibra. O mesmo ocorreu com os tratamentos  $G_{[1]}C_{[2]}$  e  $G_{[2]}C_{[2]}$ , porém ambos aumentaram significativamente o comprimento da fibra (Fig 8).

**Tabela 3** Comparações múltiplas entre as médias do **comprimento de fibra** ( $\mu\text{m}$ )

		$GA_3$		
		$G_{[0]}$	$G_{[1]}$	$G_{[2]}$
BAP	$C_{[0]}$	568,83aA	516,21bA	518,67bA
	$C_{[1]}$	460,52aB	526,66aA	525,47aA
	$C_{[2]}$	592,27aA	588,88aB	597,23aB

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância;  $GA_3$  (ácido giberélico),  $G_{[0]}$  (ausência de  $GA_3$ ),  $G_{[1]}$  (presença de 49,13  $\mu\text{M}$  de  $GA_3$ ),  $G_{[2]}$  (presença de 98,26  $\mu\text{M}$  de  $GA_3$ ),  $C_{[0]}$  (ausência de BAP),  $C_{[1]}$  (presença de 111  $\mu\text{M}$  de BAP),  $C_{[2]}$  (presença de 222  $\mu\text{M}$  de BAP).





**Figura 8.** Interações dos tratamentos para o comprimento da fibra.

#### 4.4. Espessura da parede da fibra

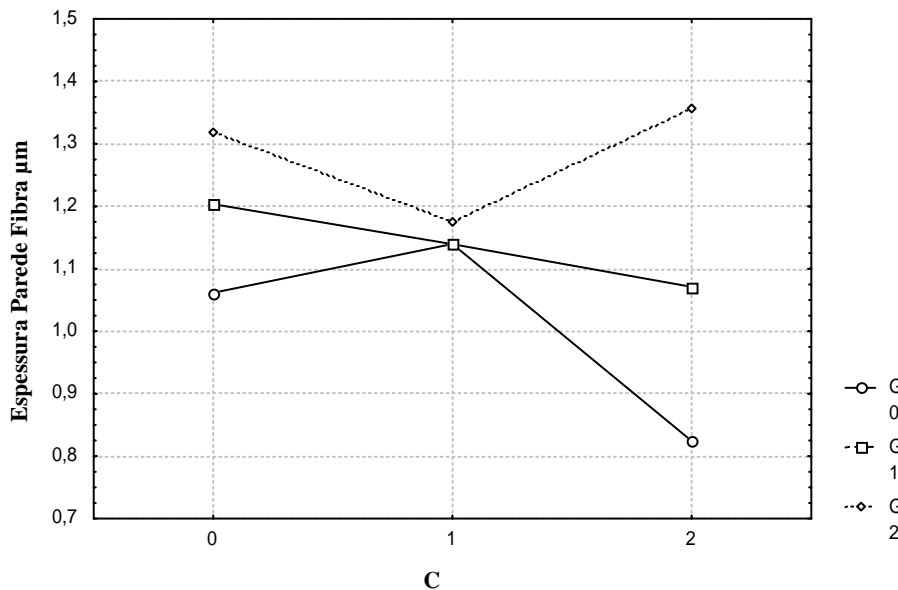
Na ausência de  $GA_3$ , o tratamento  $C_{[2]}$  destacou-se por reduzir a espessura da parede da fibra, diferenciando-se significativamente da testemunha e do  $C_{[1]}$ . Entretanto, o  $C_{[2]}$  quando combinado com a maior concentração de  $GA_3$ , aumentou a espessura da parede ( $G_{[2]}C_{[2]}$ ).

Em presença do tratamento  $G_{[1]}$  e  $G_{[2]}$ , aumentou a espessura da parede da fibra (Tab. 4) de plantas de *Eucalyptus grandis* se comparada a testemunha, já os tratamentos  $G_{[2]}$  e  $G_{[2]}C_{[2]}$  não diferenciaram-se significativamente entre si (Fig. 9).

**Tabela 4.** Comparações múltiplas entre as médias de espessura da parede de fibra ( $\mu\text{m}$ )

		$GA_3$		
		$G_{[0]}$	$G_{[1]}$	$G_{[2]}$
<b>BAP</b>	$C_{[0]}$	1,06aA	1,20bA	1,31bA
	$C_{[1]}$	1,13aA	1,13aA	1,17aA
	$C_{[2]}$	0,82aB	1,07bA	1,35cA

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância; GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), G<sub>[0]</sub> (ausência de GA<sub>3</sub>), G<sub>[1]</sub> (presença de 49,13 μM de GA<sub>3</sub>), G<sub>[2]</sub> (presença de 98,26 μM de GA<sub>3</sub>), C<sub>[0]</sub> (ausência de BAP), C<sub>[1]</sub> (presença de 111 μM de BAP), C<sub>[2]</sub> (presença de 222 μM de BAP).



**Figura 9.** Interações com destaque para G<sub>[2]</sub> em relação aos outros tratamentos.

#### 4.5 Comprimento do vaso

As comparações entre as médias para o comprimento do vaso mostraram (Tab. 5) que em presença dos tratamentos G<sub>[1]</sub> e G<sub>[2]</sub> não houve diferença significativamente entre si e em relação à testemunha.

Na ausência de GA<sub>3</sub>, o tratamento C<sub>[1]</sub> diferenciou-se significativamente entre a testemunha e o C<sub>[2]</sub> diminuindo o comprimento do vaso.

A citocinina induz indiretamente a formação de vaso em *Coleus*, pois quando é adicionada ao caule dessa planta, aumenta a sensibilidade para a auxina que em pequeno teor induz a formação de vasos (HIGUCHI, 1997), porém no estudo relacionando aplicação exógena, este hormônio representado nesse experimento pelo regulador de crescimento BAP (citocinina sintética), não pareceu relevante no que se refere ao comprimento de vaso em *Eucalyptus grandis* com 6 meses de idade.

As interações giberelina com citocinina dos tratamentos G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub> e G<sub>[2]</sub>C<sub>[1]</sub> não diferenciaram significativamente para o comprimento do vaso (Tab. 5) em relação ao tratamento C<sub>[1]</sub> que usou somente a citocinina (BAP) na concentração 111 μM. O mesmo aconteceu com a segunda concentração de BAP (C<sub>[2]</sub>) que não diferiu significativamente dos tratamentos G<sub>[1]</sub>C<sub>[2]</sub> e G<sub>[2]</sub>C<sub>[2]</sub>.

No que se refere ao comprimento do vaso, os tratamentos C<sub>[1]</sub> e C<sub>[2]</sub> foram os únicos que se diferenciaram significativamente um do outro.

**Tabela 5** Comparações múltiplas entre as médias do **comprimento do vaso** ( $\mu\text{m}$ )

		<b>GA<sub>3</sub></b>		
		<b>G<sub>[0]</sub></b>	<b>G<sub>[1]</sub></b>	<b>G<sub>[2]</sub></b>
<b>BAP</b>	<b>C<sub>[0]</sub></b>	324,56aA	299,64aA	328,88aA
	<b>C<sub>[1]</sub></b>	271,24aB	298,08aA	321,80aA
	<b>C<sub>[2]</sub></b>	333,68aA	308,76aA	328,36aA

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância; GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), G<sub>[0]</sub> (ausência de GA<sub>3</sub>), G<sub>[1]</sub> (presença de 49,13  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>), G<sub>[2]</sub> (presença de 98,26  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>), C<sub>[0]</sub> (ausência de BAP), C<sub>[1]</sub> (presença de 111  $\mu\text{M}$  de BAP), C<sub>[2]</sub> (presença de 222  $\mu\text{M}$  de BAP).

#### 4.6. Diâmetro do vaso

Na ausência de GA<sub>3</sub> para o diâmetro do vaso (Tab. 6), o tratamento C<sub>[2]</sub> aumentou significativamente diâmetro do vaso em relação à testemunha e também em relação aos tratamentos C<sub>[1]</sub>, G<sub>[1]</sub>C<sub>[2]</sub>, G<sub>[2]</sub>C<sub>[2]</sub> e G<sub>[2]</sub>C<sub>[1]</sub>.

Os tratamentos que usaram as duas concentrações isoladamente de GA<sub>3</sub> (G<sub>[1]</sub> e G<sub>[2]</sub>) tiveram diferença significativa, aumentando o diâmetro do vaso em relação à testemunha, mas não diferenciaram-se entre si. Os tratamentos que combinaram o GA<sub>3</sub> com a menor concentração de BAP, que foram G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub> e G<sub>[2]</sub>C<sub>[1]</sub> não diferenciaram entre si, mas tiveram diferença significativa em relação ao tratamento C<sub>[1]</sub>.

Todos os tratamentos diferenciaram-se significativamente da testemunha, aumentando o diâmetro do vaso, sendo o mais expressivo o tratamento C<sub>[2]</sub>.

**Tabela 6** Comparações múltiplas entre as médias do **diâmetro do vaso** ( $\mu\text{m}$ )

		<b>GA<sub>3</sub></b>		
		<b>G<sub>[0]</sub></b>	<b>G<sub>[1]</sub></b>	<b>G<sub>[2]</sub></b>
<b>BAP</b>	<b>C<sub>[0]</sub></b>	39,02aA	55,16bA	55,04bA
	<b>C<sub>[1]</sub></b>	45,92aB	54,79bA	53,23bA
	<b>C<sub>[2]</sub></b>	59,41aC	50,08bA	50,14bA

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância; GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), G<sub>[0]</sub> (ausência de GA<sub>3</sub>), G<sub>[1]</sub> (presença de 49,13  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>), G<sub>[2]</sub> (presença de 98,26  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>), C<sub>[0]</sub> (ausência de BAP), C<sub>[1]</sub> (presença de 111  $\mu\text{M}$  de BAP), C<sub>[2]</sub> (presença de 222  $\mu\text{M}$  de BAP).

#### 4.7 Espessura da parede do vaso

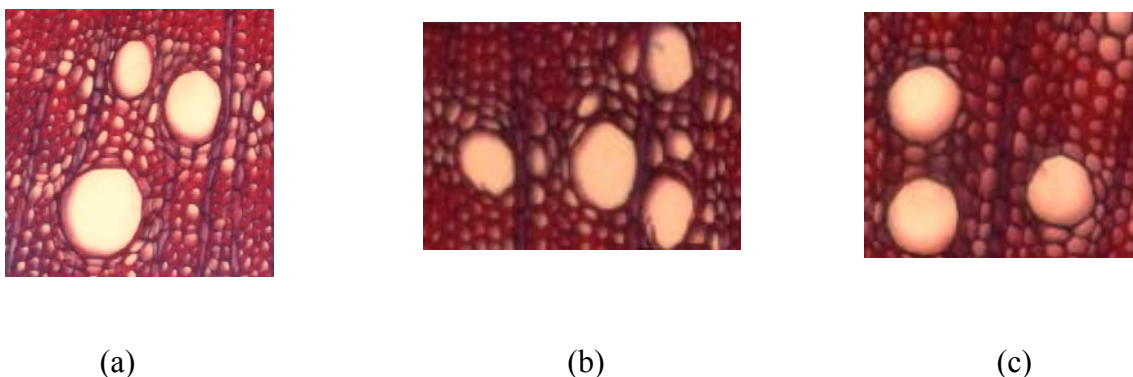
Na ausência de BAP, o tratamento  $G_{[2]}$  aumentou significativamente a espessura da parede do vaso (Tab. 7). No entanto, na presença da menor concentração de  $GA_3$  ( $G_{[1]}$ ), não houve diferença significativa em relação à testemunha (Fig. 10).

ZAKRZEWSKI (1983) cita que em várias angiospermas lenhosas, a aplicação de  $GA_3$  estimulou a atividade cambial sem induzir a diferenciação de vasos.

**Tabela 7.** Comparações múltiplas entre as médias da **espessura da parede do vaso** ( $\mu\text{m}$ )

		$GA_3$		
		$G_{[0]}$	$G_{[1]}$	$G_{[2]}$
<b>BAP</b>	$C_{[0]}$	1,29aA	1,27aA	1,57bA
	$C_{[1]}$	1,41aB	1,40aB	1,41aA
	$C_{[2]}$	1,48aB	1,51aB	1,43aA

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância;  $GA_3$  (ácido giberélico),  $G_{[0]}$  (ausência de  $GA_3$ ),  $G_{[1]}$  (presença de 49,13  $\mu\text{M}$  de  $GA_3$ ),  $G_{[2]}$  (presença de 98,26  $\mu\text{M}$  de  $GA_3$ ),  $C_{[0]}$  (ausência de BAP),  $C_{[1]}$  (presença de 111  $\mu\text{M}$  de BAP),  $C_{[2]}$  (presença de 222  $\mu\text{M}$  de BAP).



**Figura 10.** Mostra vasos dos tratamentos  $G_{[1]}$  (a),  $G_{[0]}C_{[0]}$  (b) e  $C_{[1]}$  (c) em corte transversal.

#### 4.8. Lignina insolúvel (Klason)

A determinação do teor de lignina mostrou que houve diminuição em todos os tratamentos em relação à testemunha (Tab. 8).

Na ausência de BAP, o tratamento  $G_{[2]}$  teve um teor de lignina mais reduzido que o tratamento  $G_{[1]}$  e  $G_{[0]}C_{[0]}$ . E na ausência de  $GA_3$ , o tratamento que mais reduziu o teor de lignina foi o  $C_{[1]}$ .

Os tratamentos  $G_{[1]}C_{[1]}$  e  $G_{[2]}$  não diferenciaram-se entre si e foram as reduções mais expressivas em relação à testemunha.

O  $GA_3$  sozinho estimulou a produção de lignificação em hipocótilos de *Prunus spachiana* (NAKAMURA, et al., 1994).

O tratamento  $G_{[2]}C_{[2]}$  foi o único tratamento que não diferenciou-se em relação à testemunha.

**Tabela 8.** Comparações múltiplas entre as médias do teor de **lignina insolúvel Klason (%)**

		$GA_3$		
		$G_{[0]}$	$G_{[1]}$	$G_{[2]}$
<b>BAP</b>	$C_{[0]}$	29,64aA	27,74bA	23,42cA
	$C_{[1]}$	25,36aB	23,37bB	25,35aB
	$C_{[2]}$	27,64aC	28,57bC	29,57cC

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância;  $GA_3$  (ácido giberélico),  $G_{[0]}$  (ausência de  $GA_3$ ),  $G_{[1]}$  (presença de 49,13  $\mu M$  de  $GA_3$ ),  $G_{[2]}$  (presença de 98,26  $\mu M$  de  $GA_3$ ),  $C_{[0]}$  (ausência de BAP),  $C_{[1]}$  (presença de 111  $\mu M$  de BAP),  $C_{[2]}$  (presença de 222  $\mu M$  de BAP).

#### 4.9. Diâmetro na base do caule

Na ausência de BAP, o tratamento que se destacou por aumentar o diâmetro na base do caule foi o  $G_{[2]}$ . Como pode ser constatado, os outros tratamentos usados (Tab. 9) não tiveram diferença significativa em relação à testemunha e também entre eles, no que se refere ao diâmetro na base do caule das plantas de *Eucalyptus grandis* aos seis meses de idade.

**Tabela 9.** Comparações múltiplas entre as médias dos **diâmetros (cm)** na base dos caules das plantas aos 6 meses

		$GA_3$		
		$G_{[0]}$	$G_{[1]}$	$G_{[2]}$
<b>BAP</b>	$C_{[0]}$	0,73aA	0,81aA	0,90bB
	$C_{[1]}$	0,75aA	0,81aA	0,80aA
	$C_{[2]}$	0,78aA	0,82aA	0,87aA

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância;  $GA_3$  (ácido giberélico),  $G_{[0]}$  (ausência de  $GA_3$ ),  $G_{[1]}$  (presença de 49,13  $\mu M$  de  $GA_3$ ),  $G_{[2]}$  (presença de 98,26  $\mu M$  de  $GA_3$ ),  $C_{[0]}$  (ausência de BAP),  $C_{[1]}$  (presença de 111  $\mu M$  de BAP),  $C_{[2]}$  (presença de 222  $\mu M$  de BAP).

#### 4.10 Altura do *Eucalyptus grandis* na coleta

Entre os vários processos fisiológicos promovidos pelas giberelinas ativas, está o alongamento do caule (Fig. 11). Isso pode ser comprovado (Tab. 10) principalmente nos

tratamentos ( $G_{[2]}$ ,  $G_{[2]}C_{[1]}$  e  $G_{[2]}C_{[2]}$ ) onde a maior concentração do  $GA_3$  foi usado. Porém, o aumento na altura proporcionado pelo tratamento  $G_{[1]}$  também foi significativo em relação à testemunha.

Já os tratamentos  $C_{[1]}$  e  $C_{[2]}$  não promoveram efeito sobre a altura, sem diferença significativa em relação à testemunha. Na ausência de BAP, o  $G_{[2]}$  foi o único que além de ter se diferenciado significativamente em relação à testemunha, diferenciou-se em relação a todos os outros tratamentos. Esse destaque para o tratamento  $G_{[2]}$  foi devido ao expressivo aumento em altura proporcionado pela maior concentração de  $GA_3$ .

Os tratamentos  $G_{[1]}C_{[2]}$ ,  $G_{[1]}C_{[1]}$  e  $G_{[1]}$  não diferenciaram-se significativamente entre si.



**Figura 11.** Um representante de cada tratamento da esquerda para a direita ( $G_{[1]}$ ,  $G_{[2]}$ ,  $C_{[1]}$ ,  $C_{[2]}$ ,  $G_{[1]}C_{[1]}$ ,  $G_{[1]}C_{[2]}$ ,  $G_{[2]}C_{[1]}$ ,  $G_{[2]}C_{[2]}$ , T) um dia antes da coleta, mostrando o efeito sobre a altura.

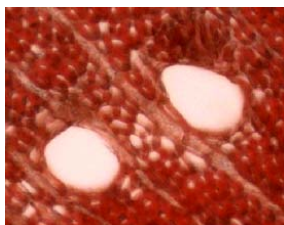
**Tabela 10.** Comparações múltiplas entre as médias da **altura** (cm) das plantas aos 6 meses

		$GA_3$		
		$G_{[0]}$	$G_{[1]}$	$G_{[2]}$
<b>BAP</b>	$C_{[0]}$	64,00aA	88,80bA	132,40cA
	$C_{[1]}$	67,00aA	83,80bA	111,40cB
	$C_{[2]}$	71,40aA	83,20bA	111,40cB

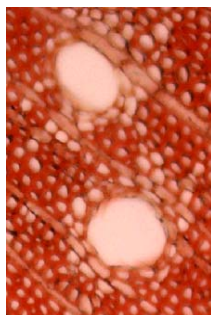
Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre colunas e letras maiúsculas entre linhas, a 5% de significância;  $GA_3$  (ácido giberélico),  $G_{[0]}$  (ausência de  $GA_3$ ),  $G_{[1]}$  (presença de 49,13  $\mu M$  de  $GA_3$ ),  $G_{[2]}$  (presença de 98,26  $\mu M$  de  $GA_3$ ),  $C_{[0]}$  (ausência de BAP),  $C_{[1]}$  (presença de 111  $\mu M$  de BAP),  $C_{[2]}$  (presença de 222  $\mu M$  de BAP).

#### 4.11. Resultado do teste de cor do reagente Mäule

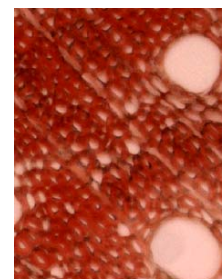
O resultado do teste de cor do reagente Mäule confirma a presença de unidades siringila.



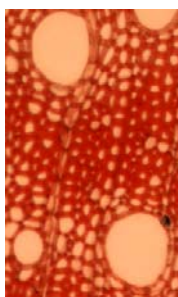
**Fig. 12 -  $G_{[1]}$**



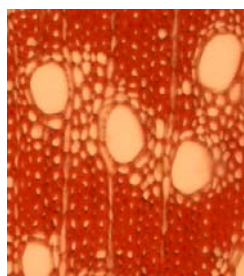
**Fig. 13 -  $G_{[2]}$**



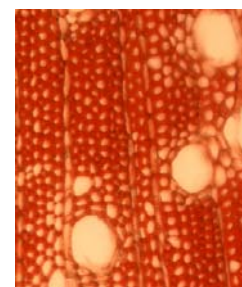
**Fig. 14 -  $C_{[1]}$**



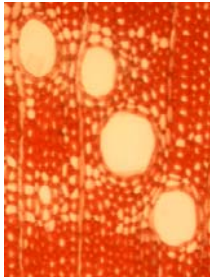
**Fig. 15 -  $C_{[2]}$**



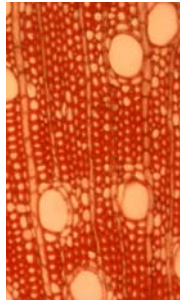
**Fig. 16 -  $G_{[1]}C_{[1]}$**



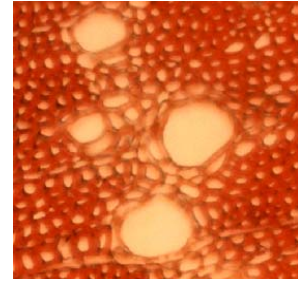
**Fig. 17 -  $G_{[1]}C_{[2]}$**



**Fig. 18 - G<sub>[2]</sub>C<sub>[1]</sub>**



**Fig. 19 - G<sub>[2]</sub>C<sub>[2]</sub>**



**Fig. 20- G<sub>[0]</sub>C<sub>[0]</sub>**

**Figuras 12 à 20.** Correlações fotomicrográficas dos cortes transversais de cada tratamento com indicações positivas de presença lignina siringila (teste de Mäule)

#### **4.12. Teste de cor do reagente Wiesner**

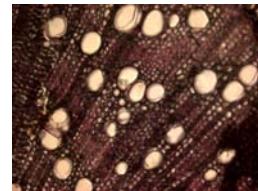
A cor vermelho violáceo que aparece nos cortes depois de aplicado o método Wiesner, mostrou um resultado positivo para a presença de lignina (Figs. 21-29).



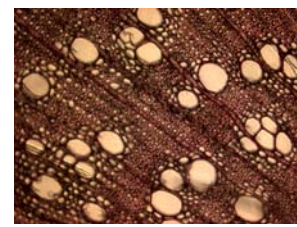
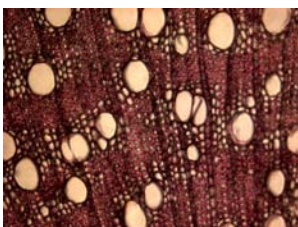
**Figura 21 - G<sub>[1]</sub>**



**Figura 22 - G<sub>[2]</sub>**



**Figura 23 - C<sub>[1]</sub>**

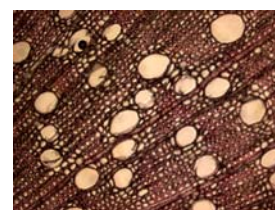
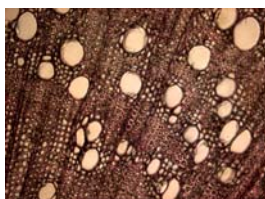




**Figura 24 - C<sub>[2]</sub>**

**Figura 25 - G<sub>[1]</sub> C<sub>[1]</sub>**

**Figura 26 - G<sub>[1]</sub> C<sub>[2]</sub>**



**Figura 27- G<sub>[2]</sub> C<sub>[1]</sub>**

**Figura 28 – Testemunha (T)**

**Figura 29 - G<sub>[2]</sub> C<sub>[2]</sub>**

**Figuras 21 à 29.** Correlações fotomicrográficas dos cortes transversais de cada tratamento com indicações da presença lignina (teste de Wiesner)

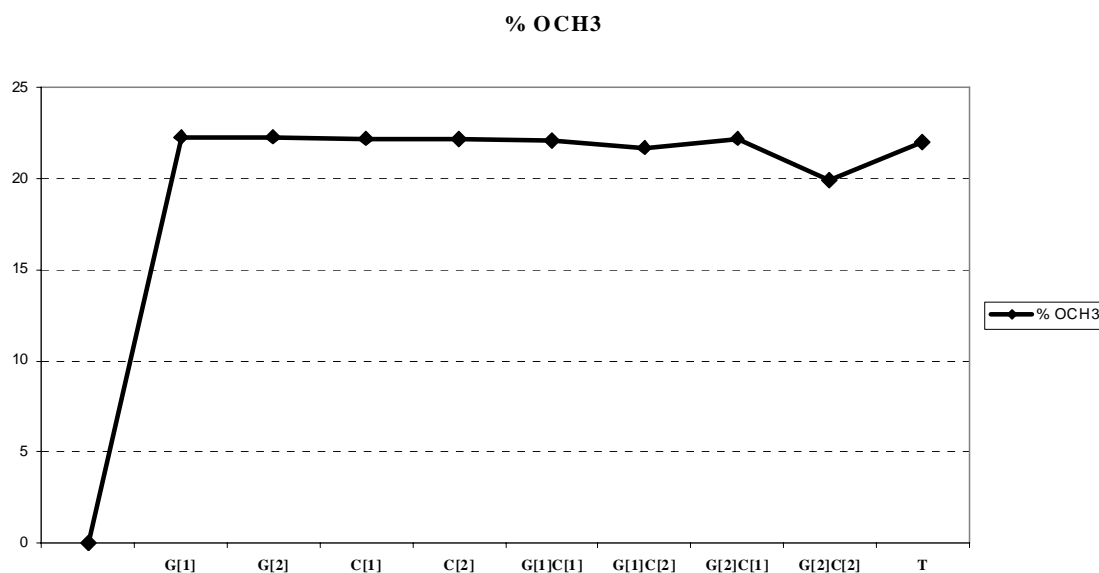
#### **4.13 Resultados do teor de metoxila por RMN**

A espectroscopia por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma importante ferramenta analítica que caracteriza as estruturas moleculares dos componentes da parede celular Ralph, (1998); sendo empregada no estudo das ligninas extraídas (Lu & Ralph, 1995) e sintetizadas em laboratório (Ralph, 1995). Para obtenção dos resultados do teor de metoxila foi usada amostra da lignina dioxano de cada tratamento (Tab. 11).

Como a RMN foi utilizada como ferramenta de diagnóstico, não foi realizada a comparação estatística (Fukushima & Hatfield, 2003). A redução dos teores de carboidratos contaminantes foi reduzida com a utilização de solução ácida de dioxano para a obtenção de lignina. Os resultados que podem ser observados no gráfico (Fig. 30) realizados a partir dos espectros no (Anexo X). O tratamento G<sub>[2]</sub>C<sub>[2]</sub> foi o menor teor de metoxila, sendo que os tratamentos G<sub>[1]</sub> e G<sub>[2]</sub> obtiveram o mesmo valor em metoxila e também a maior percentagem em relação aos outros tratamentos inclusive a testemunha. As pequenas diferenças proporcionadas pelos tratamentos com GA3 e/ou BAP não foram suficientes para alterar a composição das ligninas. As análises dos espectros de RMN (Anexo X) indicou a presença de grupos metoxílicos com lignina guaiacólica e siringólica.

**Tabela 11. Teor de metoxila (%) obtidos por RMN**

Tratamentos	% OCH <sub>3</sub>
G <sub>[1]</sub>	22,30
G <sub>[2]</sub>	22,30
C <sub>[1]</sub>	22,22
C <sub>[2]</sub>	22,19
G <sub>[1]</sub> C <sub>[1]</sub>	22,10
G <sub>[1]</sub> C <sub>[2]</sub>	21,70
G <sub>[2]</sub> C <sub>[1]</sub>	22,20
G <sub>[2]</sub> C <sub>[2]</sub>	19,90
T	22,0



**Figura 30.** Resultados do teor de metoxila de cada tratamento

#### 4.14 Resultados do infravermelho

A espectrometria do infravermelho é uma técnica analítica indispensável ao estudo da lignina. Esse método foi utilizado para determinar a composição das subunidades de lignina em plantas de tabaco modificadas por transgenia em comparação com as não modificadas (OGRAS, et al., 2000).

As ligninas de angiospermas dicotiledôneas contêm dois tipos majoritários de unidades constitucionais nomeadas de guaiacila e siringila, em geral a razão G/S supera 2-1, sendo que alterações nesta razão podem alterar as propriedades da madeira (DIXON, et al., 2001).

Dessa forma podemos analisar empiricamente a proporção das unidades guaiacila e siringila (Tab 11).

Foram observados os principais sinais: 3500  $\text{cm}^{-1}$ , 3000-2980  $\text{cm}^{-1}$ , 1740  $\text{cm}^{-1}$ , 1690  $\text{cm}^{-1}$ , 1670  $\text{cm}^{-1}$ , 1600  $\text{cm}^{-1}$ , 1500  $\text{cm}^{-1}$ , 1460  $\text{cm}^{-1}$ , 1328  $\text{cm}^{-1}$  e 1268  $\text{cm}^{-1}$  (BROWNING, 1967).

E é interessante perceber que mesmo com uma relação de 2,57-1 (G/S), o tratamento  $G_{[1]}C_{[1]}$  não aumentou o teor de lignina em comparação com a testemunha (Tab. 8). O mesmo é válido para todos os tratamentos, pois tiveram diferença significativa entre si e com a testemunha, tendo a última o maior teor de lignina, o que leva a afirmar que há atividade desses reguladores na deposição de lignina (Tab 8).

A citocinina (BAP), principalmente em sua maior concentração (222 $\mu\text{M}$ ) representada pelo tratamento  $C_{[2]}$ , proporcionou um sensível aumento na relação G/S, e quando foi combinada com ambas concentrações de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) nos tratamentos ( $G_{[1]}C_{[2]}$  e  $G_{[2]}C_{[2]}$ ), mas esse pequeno aumento também pode ser percebido no tratamento  $C_{[1]}$  (111  $\mu\text{M}$ ), onde foi usado exatamente a metade da concentração de  $C_{[2]}$  (Tab. 11).

O ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) (para videiras), em uma cultivar (Sultana) de uva de mesa com poucas sementes, estimulou a atividade da peroxidase solúvel de pedicelos pós-floração (PÉREZ & MORALES, 1999). O que leva a afirmar a atividade deste hormônio na deposição de lignina.

**Tabela 12.** Percentagem das unidades de lignina através de transmitância por infravermelho

Tratamentos	G (%)	S (%)	G/S
$G_{[1]}$	71,43	28,57	2,50
$G_{[2]}$	71,95	28,05	2,56
$C_{[1]}$	73,04	26,96	2,71
$C_{[2]}$	71,98	28,02	2,57
$G_{[1]}C_{[1]}$	72,04	27,96	2,57
$G_{[1]}C_{[2]}$	73,27	26,73	2,74
$G_{[2]}C_{[1]}$	72,46	27,54	2,63
$G_{[2]}C_{[2]}$	73,17	26,83	2,72
T	71,70	28,30	2,53

Nota:  $\text{GA}_3$  (ácido giberélico),  $G_{[0]}$  (ausência de  $\text{GA}_3$ ),  $G_{[1]}$  (presença de 49,13  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$ ),  $G_{[2]}$  (presença de 98,26  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$ ),  $C_{[0]}$  (ausência de BAP),  $C_{[1]}$  (presença de 111  $\mu\text{M}$  de BAP),  $C_{[2]}$  (presença de 222  $\mu\text{M}$  de BAP).

#### 4.15 Proteína total por tratamento

Os resultados da proteína total foram obtidos de material livre de extrativos, portanto a percentagem de nitrogênio adquirida pelo método kjedahl foi das proteínas. O tratamento  $G_{[1]}$  provavelmente restringiu ou desativou a formação de precursores do álcool sinapílico, entre as enzimas que poderiam ser afetadas, supõe a F5H, CL4 e OMTS, entretanto, para o tratamento  $G_{[1]}C_{[2]}$  que indicou maior teor de unidade siringila, a atuação desse tratamento que combinou  $\text{GA}_3$  e BAP pode ter ativado as enzimas acima citadas.

Dessa forma, a ação sinérgica do GA<sub>3</sub> e BAP nas concentrações (49,13 µM e 222 µM), pode estar relacionando os sistemas enzimáticos do citoplasma. Os outros tratamentos também tiveram alterações, mas pouco significativas, isto coaduna com a hipótese acima levantada, sobre a desativação enzimática, já que nos tratamentos G<sub>[1]</sub> houve diminuição sensível em alguma atividade enzimática. Assim como a redução do teor de lignina em G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub>.

A natureza dos vestígios das proteínas sintetizadas é desconhecida, no entanto, parece que elas podem ser isoperoxidases associadas à lignificação (MASSUDA & FUKUDA, 1983) ou enzimas envolvidas na biossíntese dos componentes da parede celular (NORTHCOTE, 1985). Com presença de isoperoxidases como a extensina e outras proteínas estruturais.

A percentagem de proteína (Tab. 12) dos tratamentos contendo qualquer das duas concentrações de giberelina (G<sub>[1]</sub>, G<sub>[2]</sub>, G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub>, G<sub>[1]</sub>C<sub>[2]</sub>, G<sub>[2]</sub>C<sub>[1]</sub>, G<sub>[2]</sub>C<sub>[2]</sub>), houve uma sensível redução, enquanto que os tratamentos contendo somente a citocinina (C<sub>[1]</sub> e C<sub>[2]</sub>) em ambas concentrações, não diferiram da testemunha, sendo os únicos tratamentos que não reduziram o teor de nitrogênio (Fig. 31). Talvez porque as concentrações usadas de citocininas não permitiram maiores mudanças quantitativas e/ou qualitativas, porém, os tratamentos C<sub>[1]</sub> e C<sub>[2]</sub> conseguiram manter a percentagem de nitrogênio e provavelmente a mesma atividade enzimática.

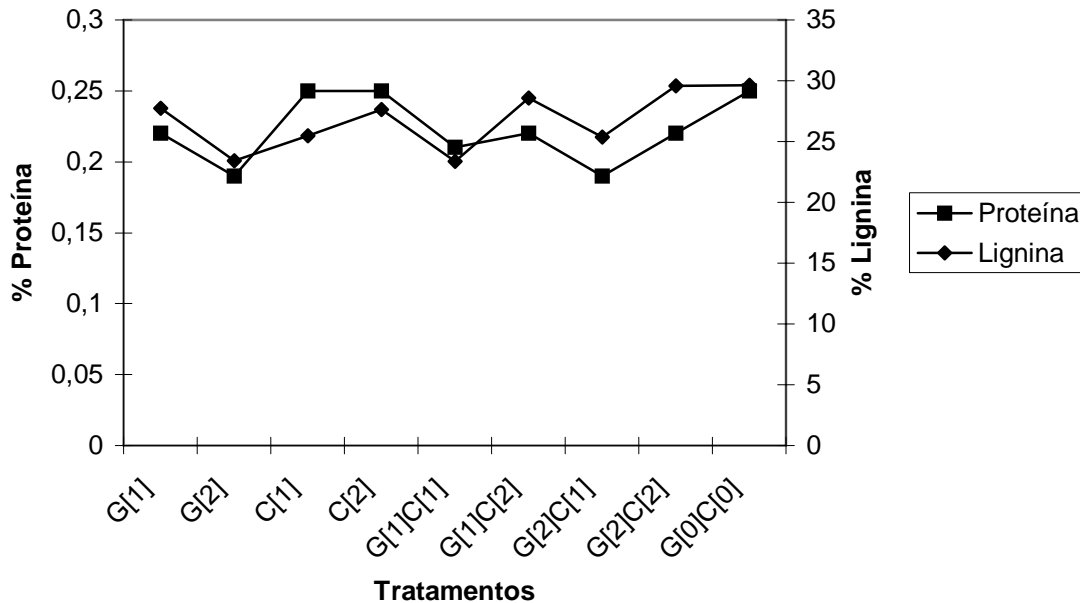
FOSKET & TEPFER, (1978) relataram que a citocininas efetua mudanças qualitativas e quantitativas em síntese de proteínas. A síntese de RNA e proteína ocorrendo entre 24 e 60 horas tem relação com a xilogênese e a citocinina pode ser funcional durante estes processos de síntese (FUKUDA & KOMAMINE, 1985).

E mais recentemente, ANANIEV, et al., (1987) conduziram um estudo sobre o efeito de duas citocininas sobre a síntese de RNA em núcleo isolado removido de cotilédones de abóbora-moranga (*Curcubita pepo*) e verificaram que entre 4-6 horas, as duas citocininas resultaram em um aumento de atividade da RNA-polimerase I, e esta enzima é responsável pela biossíntese de RNAr.

**Tabela 13** Percentagem de nitrogênio total por tratamento

Tratamentos	%Nitrogênio
G <sub>[1]</sub>	0,22
G <sub>[2]</sub>	0,19
C <sub>[1]</sub>	0,25
C <sub>[2]</sub>	0,25
G <sub>[1]</sub> C <sub>[1]</sub>	0,21
G <sub>[1]</sub> C <sub>[2]</sub>	0,22
G <sub>[2]</sub> C <sub>[1]</sub>	0,19
G <sub>[2]</sub> C <sub>[2]</sub>	0,22
T	0,25

Nota: GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), G<sub>[0]</sub> (ausência de GA<sub>3</sub>), G<sub>[1]</sub> (presença de 49,13 µM de GA<sub>3</sub>), G<sub>[2]</sub> (presença de 98,26 µM de GA<sub>3</sub>), C<sub>[0]</sub> (ausência de BAP), C<sub>[1]</sub> (presença de 111 µM de BAP), C<sub>[2]</sub> (presença de 222 µM de BAP).



**Figura 31.** Correlação de proteína total com teor de lignina.

#### 4.16 Correlações entre os dados anatômicos (fibra e vaso) com o teor de lignina insolúvel (Klason)

##### 4.16.1 Tratamento $G_{[1]}$

O tratamento  $G_{[1]}$  proporcionou uma redução significativa no teor de lignina em relação à testemunha, entretanto este mesmo tratamento conferiu um aumento significativo em relação à testemunha no diâmetro da fibra e no lúmen de fibra; já na espessura da parede da fibra, este tratamento não proporcionou diferença significativa em relação à testemunha e o comprimento da fibra diminuiu. Podemos considerar que este tratamento ao reduzir o teor de lignina teve uma relação importante no aumento do diâmetro do lúmen da fibra. Isto está de acordo com o fato de que células com baixo teor de lignina possuem paredes delgadas e lúmen com diâmetro aumentado.

Em relação ao vaso, este tratamento dif da fibra encerrou-se da testemunha aumentando o diâmetro do vaso, a espessura da parede do vaso não se diferenciou em relação à testemunha, o comprimento do vaso não diferenciou-se significativamente da testemunha. Dessa forma o aumento do diâmetro do vaso e a insignificância em relação à T do comprimento do vaso, não devem ter sido influenciados pelo teor de lignina, pois o mesmo reduziu com esse tratamento em relação à T.

#### **4.16.2.Tratamento G<sub>[2]</sub>**

O tratamento G<sub>[2]</sub> proporcionou uma redução significativa de lignina em relação à testemunha, entretanto, este tratamento teve uma diferença significativa em relação à testemunha aumentando o diâmetro, o diâmetro do lúmen, a espessura da parede da fibra; e diminuiu o comprimento da fibra.

O que leva a crer que o teor de lignina depositada na parede da fibra contribuiu para diferenciar os resultados anatômicos de espessura da parede e diâmetro da fibra.

Em relação ao vaso, este tratamento diferenciou-se da testemunha aumentando o diâmetro do vaso, da espessura da parede do vaso, o comprimento do vaso não diferenciou-se significativamente da testemunha. Dessa forma o aumento do diâmetro do vaso e a insignificância em relação à T do comprimento do vaso, não devem ter sido influenciados pelo teor de lignina, pois o mesmo reduziu com esse tratamento em relação à T.

#### **4.16.3.Tratamento C<sub>[1]</sub>**

O tratamento C<sub>[1]</sub> proporcionou uma redução significativa do teor de lignina em relação à testemunha, entretanto, este tratamento levou a um aumento significativo em relação à testemunha aumentando o diâmetro da fibra, não aumentou significativamente o diâmetro do lúmen da fibra e a espessura da parede da fibra.

O não aumento significativo do diâmetro do lúmen da fibra e a espessura da parede da fibra também podem ter sido atribuídos à redução na concentração de lignina.

Em relação ao vaso, este tratamento diferenciou-se da testemunha: aumentando o diâmetro do vaso; não diferiu na espessura da parede do vaso e quanto ao comprimento do vaso teve diferença significativamente em relação à testemunha. Dessa forma o aumento do diâmetro do vaso e a insignificância em relação à testemunha do comprimento do vaso, não devem ter sido influenciados pelo teor de lignina, pois o mesmo reduziu com esse tratamento em relação à testemunha.

#### **4.16.4.Tratamento C<sub>[2]</sub>**

Esse tratamento reduziu o teor de lignina em relação à testemunha, no entanto, houve um aumento no diâmetro da fibra em relação à testemunha, aumento também no diâmetro do lúmen da fibra, já em relação à espessura da parede da fibra, com este tratamento, houve uma significativa redução, sendo a menor medida em relação a todos os outros tratamentos. Dessa forma, o aumento no diâmetro da fibra deve ter sido por algum processo natural de expansão foram da parede ou mesmo proporcionada por outro componente da parede celular diferente da lignina, sendo que a mesma reduziu.

Em relação ao diâmetro do vaso, este tratamento proporcionou o maior diâmetro em relação à testemunha, na espessura do vaso, e em relação ao comprimento do vaso, este tratamento proporcionou o maior comprimento em relação à testemunha.

Dessa forma o aumento do diâmetro e comprimento do vaso, não devem ter sido influenciados pelo teor de lignina, pois a dimensão foi desses foi a maior proporcionada por

este tratamento em relação à testemunha, e, no entanto, o teor de lignina neste mesmo tratamento não aumentou. Considera-se então que as dimensões aumentadas foram influenciadas por outro componente da parede celular diferente da lignina.

#### **4.16.5. Tratamento $G_{[1]}C_{[1]}$**

O tratamento  $G_{[1]}C_{[1]}$  proporcionou uma redução significativa do teor de lignina em relação à testemunha. Neste tratamento o diâmetro da fibra e o diâmetro do lúmen da fibra com os menores valores em relação aos outros tratamentos, porém sem significativa diferença em relação à testemunha. Também, apesar de não ter mantido a menor espessura da parede da fibra, esse tratamento não alterou de forma significativa às relações entre o diâmetro da fibra, diâmetro do diâmetro do lúmen da fibra e espessura da parede da fibra, mantendo o equilíbrio proporcionado pela redução no teor de lignina.

Em relação ao vaso, este tratamento diferenciou-se da testemunha aumentando o diâmetro do vaso, mas, não diferiu na espessura da parede do vaso. Dessa forma o aumento do diâmetro do vaso e a insignificância em relação à testemunha do comprimento do vaso, não devem ter sido influenciados pelo teor de lignina, pois o mesmo reduziu com esse tratamento em relação à testemunha.

#### **4.16.6 Tratamento $G_{[1]}C_{[2]}$**

O tratamento  $G_{[1]}C_{[2]}$  proporcionou uma redução do teor de lignina significativa em relação à testemunha; em relação à testemunha, o menor valor. Esses tratamentos não diferenciaram-se em diâmetro da fibra, em do diâmetro do lúmen da fibra e também na espessura da parede da fibra.

A redução no teor de lignina proporcionada por este tratamento contribuiu para manter o diâmetro da fibra, o lúmen e espessura com os valores baixos, não tendo significativa diferença em relação à testemunha.

Em relação ao vaso, este tratamento diferenciou-se da testemunha aumentando o diâmetro do vaso e também a espessura da parede do vaso. Dessa forma o aumento do diâmetro do vaso e a insignificância em relação à testemunha do comprimento do vaso, não devem ter sido influenciados pelo teor de lignina, pois o mesmo reduziu com esse tratamento em relação à testemunha.

#### **4.16.7 Tratamento $G_{[2]}C_{[1]}$**

O tratamento  $G_{[2]}C_{[1]}$  proporcionou uma redução significativa do teor de lignina em relação à testemunha; aumentando o diâmetro da fibra, já o diâmetro do lúmen da fibra manteve-se sem diferença significativa em relação à testemunha que foi o menor valor, e na espessura da parede da fibra. Este tratamento não diferenciou-se da testemunha.

O diâmetro da fibra deve ter aumentado por expansão da parede primária ou com o aumento de outro componente diferente da lignina, pois a mesma foi reduzida em relação à testemunha. Essa redução é a provável causadora do equilíbrio entre o lúmen e a espessura

da parede da fibra que não aumentaram em relação à testemunha. Neste caso pode ter havido sinergismo.

Em relação ao vaso, este tratamento diferenciou-se da testemunha aumentando o diâmetro do vaso, não diferiu espessura da parede do vaso, o comprimento do vaso não diferenciou-se significativamente da testemunha. Dessa forma o aumento do diâmetro do vaso e a insignificância em relação à testemunha do comprimento do vaso, não devem ter sido influenciados pelo teor de lignina, pois o mesmo reduziu com esse tratamento em relação à testemunha.

#### **4.16.8 Tratamento $G_{[2]} C_{[2]}$**

O tratamento  $G_{[2]} C_{[2]}$  não proporcionou diferença significativa do teor de lignina em relação à testemunha, sendo que os mesmos foram os maiores valores. Este tratamento proporcionou aumento no diâmetro da fibra em relação à testemunha, o mesmo aconteceu com o diâmetro do lúmen da fibra e também com a espessura da parede.

As dimensões aumentadas do diâmetro da fibra e espessura da parede conduzem à idéia de que o tratamento  $G_{[2]} C_{[2]}$  contribuiu com essas modificações devido à quantidade de lignina pareada com a testemunha que foi o maior valor.

Em relação ao vaso, este tratamento diferenciou-se da testemunha aumentando o diâmetro do vaso, não diferiu espessura da parede do vaso, o comprimento do vaso não diferenciou-se significativamente da testemunha. Dessa forma o aumento do diâmetro do vaso e a insignificância em relação à testemunha do comprimento do vaso, não devem ter sido influenciados pelo teor de lignina, pois o mesmo reduziu com esse tratamento em relação à testemunha.

#### **4.16.9 Tratamento $G_{[0]} C_{[0]}$ (Testemunha)**

A testemunha teve a maior quantidade de lignina em relação aos tratamentos, exceto ao tratamento  $G_{[2]} C_{[2]}$ .

Em relação ao diâmetro da fibra, a testemunha teve o menor valor, exceto os que não se diferenciaram significativamente ( $G_{[1]} C_{[1]}$  e  $G_{[1]} C_{[2]}$ ). O menor valor também a testemunha manteve no lúmen, exceto os que não se diferenciaram significativamente que foram  $G_{[1]} C_{[1]}$ ,  $G_{[2]} C_{[1]}$ ,  $G_{[1]} C_{[2]}$  e  $C_{[1]}$ .

A espessura da parede das fibras da testemunha, não foi nem o menor e nem o maior valor e diferenciou-se significativamente dos tratamentos  $C_{[2]}$ ,  $G_{[2]}$  e  $G_{[2]} C_{[2]}$ .

É possível dizer que o teor de lignina na testemunha foi mais distribuída ao longo do comprimento da fibra, pois apesar de maior quantidade de lignina neste tratamento, a espessura da parede e o diâmetro da fibra não tiveram um aumento considerável, apesar do lúmen ter tido o menor valor.

Em relação ao diâmetro do vaso e espessura da parede, a testemunha diferenciou-se de todos os tratamentos. O que reforça a idéia de que todos tratamentos influenciaram de alguma forma no processo de lignificação e conseqüentemente nas dimensões anatômicas.



## 5.CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados, a aplicação exógena de ambos os reguladores de crescimento GA<sub>3</sub> e BAP interferem no teor de lignina e na morfologia anatômica do xilema do *Eucalyptus grandis*, no entanto, não modificaram a composição química das plantas - como pode ser observado pelos espectros de RMN - dessa forma, pode-se tratar de processo epigenético;
- Foram desenvolvidas plantas tratadas com os reguladores de crescimento (GA<sub>3</sub> e BAP), atenuando o teor de lignina, principalmente o tratamento G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub>;
- Esse trabalho serve na formulação de um modelo de estudo para as características químicas e anatômicas de plantas de *Eucalyptus grandis* com seis meses de idade como base para diversas pesquisas e aplicações;
- Foi possível de forma geral e eficiente analisar o mecanismo hormonal na formação da lignina;
- As alterações químicas e anatômicas foram comprovadas relacionando as plantas tratadas com a testemunha e
- As abordagens químicas e anatômicas garantem que o caminho da ligação lignina/reguladores de crescimento são abundantes em informações, descobertas e aplicabilidades, garantindo mais uma ferramenta na busca da flexibilização do processo de lignificação proporcionando plantas e produtos com características favoráveis.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados permitem considerar que mesmo tendo sido mantido uma maior percentagem para a unidade de lignina guaiacila (G>S), o que é normal em angiospermas, a pequena expressividade, porém considerável, diferença para alguns tratamentos, leva a crer na possibilidade de uma interferência, principalmente dos tratamentos ( $C_{[1]}$ ,  $G_{[1]}C_{[1]}$ ,  $G_{[1]}C_{[2]}$ ,  $G_{[2]}C_{[1]}$  e  $G_{[2]}C_{[2]}$ ), diminuindo a expressão das enzimas para a unidade siringila ou um aumento na expressão das enzimas para a unidade guaiacila para as concentrações utilizadas nesse trabalho. Em angiospermas os elementos de vaso do xilema secundário e as células do xilema primário têm a composição enfatizada em unidades guaiacílicas em lignina, e isso sugere uma pressão evolutiva das plantas na terra para que o caminho e a regulação de biossíntese dos álcoois coniferílicos sejam conservados (LI, et al., 2000). Dessa forma podemos considerar que com aplicações destes reguladores de crescimento ( $GA_3$  e BAP) com as mesmas ou diferentes concentrações ao longo do ciclo de vida da planta, pode haver respostas significativas concernentes à composição da lignina em angiospermas.

Quanto ao teor de lignina, podemos considerar que todos os tratamentos em relação à testemunha diminuiram o custo energético na lignificação, sendo o excedente, energias redistribuídas ou outras formas de produção metabólica, com uma taxa de carboidrato maior, isso devido à diminuição no conteúdo de lignina (AMTHOR, 2003) principalmente dos tratamentos  $G_{[2]}$  e  $G_{[1]}C_{[1]}$ .

O presente estudo confirma os vários aspectos interligados ao processo de lignificação, com a possibilidade de aplicação, pois a atenuação sobre a deposição de lignina, mesmo sem mudança composicional é um resultado que beneficia direta e/ou indiretamente uma gama de considerações sobre lignificação e o produto florestal. Também corrobora com o fato de que manipular os processos metabólicos que alteram o teor de lignina e/ou a composição, não significa que a planta necessariamente tenha que perder sua capacidade de sustentação ou algo parecido.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACH, H.; BODE, H.; ROBINSON, D. G.; GRAEBE, J. E. ent-Kaurene synthase is located in proplastids of meristematic shoot tissue. **Planta**, Japan, V.202, p. 211-219, 1997.

ABREU, H. S. **Biossíntese de lignificação**. 1.ed. Itaguaí-RJ, EDUR-UFRRJ, 1994. 63 p.

ABREU, H. S. & FREIRE, M. F. I. Methoxyl content determination of lignins by <sup>1</sup>H NMR. **An Acad. Bras. Ci.**, V.67, p.379-382, 1995.

ABREU, H. S.; MARIA, M. A.; REIS, J. L. Dual oxidation ways toward lignin evolution. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, RJ, V.8, n.1, p.207-210, 2001.

ABREU, H. S.; ALBUQUERQUE, C. E. C.; FIGUEIREDO, J. V. L. **Química e bioquímica da madeira**. Seropédica, RJ, 2002. 52p.

ADLER, E.; BJÖRKQUIST, J.; HAGGROTH, S. Über die Ursache der Farbreaktionen des Holzes. **Acta Chem Scand**, Copenhagen, Denmark, V.2, p.93-94, 1948.

ALONI, R. Polarity of induction and pattern of primary phloem fiber differentiation in Coleus. **American Journal of Botany**, New York, V.63, n.6, p.877-889, 1976.

ALONI, R. Role of auxin and gibberellin in differentiation of primary phloem fibers. **Plant Physiol**, Tel Aviv, Israel, V.63, p.609-614, 1979.

ALONI, R. Role of cytokinin in differentiation of secondary xylem fibers. **Plant Physiol**, V.70, p.1631-1633, 1982.

ALONI, R. Source of induction and sites of primary phloem fibre differentiation in Coleus blumei. **Annals of Botany**, New Jersey, U.S.A., V.42, p.1261-1269, 1978.

ALONI, R. GAD, A. E. Anatomy of the primary phloem fiber system in Pisum sativum. **American Journal of Botany**, New York, V.69, p.979-984, 1982.

ALONI, R. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. **Planta**, V.150, p.255-263, 1980.

ALONI R. Differentiation of vascular tissues. **Annu. Rev. Plant Physiol**, V.38, p.179–204, 1987.

ALONI R. The role of auxin and gibberellin in controlling lignin formation in primary phloem fibers and in xylem of *Coleus blumei* stems. **Plant Physiol**, V.94, p.1743-1747, 1990.

AMTHOR, J. S. Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. **Ann Bot (Lond)**, V.91, p.673-695, 2003.

ANANIEV, E. D.; KARAGYOZOV, L. K.; KARANOV, E. N. Effect of cytokinins on ribosomal RNA gene expression in excised cotyledons of *Curcubita pepo* L. **Planta**, V. 170, p. 370-378, 1987.

ASTHIR, B.; DUFFUS, C.; SMITH, R.; SPOOR W. Diamine oxidase is involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the chalazal cells during barley grain filling. **Journal of Experimental Botany**, V.53, p.1–6, 2004.

ASTHIR, B.; DUFFUS, C. M. ; SPOOR, W. Correlation of gibberellin-induced growth, polyamine levels and amine oxidases in epicotyl, root and leaf blade of barley seedlings. **Plant Growth Regulation**, V.42, p.193-201, 2004.

ATAL, C. K. Effect of gibberellin on the fibers of hemp. **Econ Bot**, V.15, p.133-139, 1961.

AUER, C. Cytokinin conjugation: recent advances and patterns in plant evolution. **Plant Growth Regul**, V. 23, p.17–32, 1997.

AZUMA, T.; HATANAKA, T.; UCHIDA, N.; YASUDA, T. Interactions between abscisic acid, ethylene and gibberellin in internodal elongation in floating rice: the promotive effect of abscisic acid at low humidity. **Kluwer Academic Publishers**, V.41, p.105-109, 2003.

BANDURSKI, R. S.; NONHEBEL, H. M. Auxins: In: Wilkins, M. B. (Ed.) **Advanced plant physiology**. Pitman, London, 1984. p.1-20.

BAO, W.; O'MALLEY, D. M.; SEDEROFF, R. R. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. **Science**, V.260, p. 672-674, 1993.

BARREIROS, R. M.; GARCIA, J. N.; CAIXETA FILHO, J. V.; SANSIGOLO, C. <sup>a</sup>

Modelo de otimização para seleção de árvores matrizes de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Florestalis**, n.61, p. 25-39, 2002.

BAUCHER, M.; CHABBERT, B.; PILATE, G.; VAN DOORSSELAERE, J.; TOLLIER, M. T.; PETIT-CONIL, M.; CORNU, D.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulation a cynammil alcohol dehydrogenase in Poplar. **Plant Physiology**, V.112, p. 1479-1490, 1996.

BERGMANN, L. Der Einfluß von Kinetin auf die Ligninbildung und Differenzierung Gewebekulturen von *Nicotiana tabacum*. **Planta**, V.62, p. 221-254, 1964.

BERNARDS, M.; RAZEM, F.; The poly(phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall bio-polymer. **Phytochemistry**, V.57, p.1115-1122, 2001.

BIEMELT, S.; TSCHIERSCH, H.; SONNEWALD, U. Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology**, V.135, p. 254-265, 2004.

BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E. & DBBEREINER, J. The use of the <sup>15</sup>N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv Batatais. **Can. J. Microbiol**, V.29, p.1036, 1983.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annu Rev Plant Biol**. V.54, p.519-546, 2003.

BONHOMME, F.; KURZ, B.; MELZER, S.; BERNIER, G.; JACQMARD, A. Cytokinin and gibberellin activate SaMADS A, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*. **The Plant Journal**, V.24, n.1, p. 103-111, 2000.

BREMMER, J.M. Inorganic forms of nitrogen. In. C.A BLACK, D.D. EVARIS, J.L. EVANS, J.L. WHILE, L.E. ENSMINGER & F. E. CLARK, (Eds.) **Methods of Soil Analysis**. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Agronomy, 1965b. V. 9, p. 1179-1237,.

BROSA C, CAPDEVILA JM, ZAMORA I Brassinosteroids: a new way to define the structural requirements. **Tetrahedron**, V.52, p.2435-2448, 1996.

BROWNING, B. L. Methods of wood chemistry. **Interscience Publishers**, New York, V.1, p.75-89, 1967.

BRUCK, D. K., PAOLILLO, D. J. Jr. Anatomy of nodes vs. internodes in Coleus: The longitudinal course of xylem differentiation. **Am J Bot**, V.71, p.151-157, 1984.

CASTRO, P. R. C. **Utilização de reguladores vegetais na fruticultura, na horticultura e em plantas ornamentais**. ESALQ-DIBD, Piracicaba, p. 92, 1988.

CHEN, L.; AUH, C.; CHEN, F.; CHENG, X.; ALJOE, H.; DIXON, R.A.; WANG, Z. Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity, gene expression, and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages. **J. Agric. Food Chem.**, V.50, p.5558-5565, 2002.

CHELIAK, W. M., ROGERS, D. L. Integrating biotechnology into tree improvement program. **Can. J. For. Res.** V. 20, p.452-463, 1990.

CROMER, R. N., CAMERON, D. M, RANCE, S. J., RYAN, P. A., BROWN, M. Response to nutrients in *Eucalyptus grandis*. 1. Biomass accumulation. **Forest Ecology and Management**, V. 62, p. 211-230, 1993.

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

DAVIES, P. J. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: DAVIES, P. J. (ed). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Estados Unidos, Kluwer Academic Publishers, 1995, Cap.1, p. 1-12.

DAYKIN A., SCOTT I., CAUSTON D., FRANCIS D. Gibberellin does not accelerate rates of cell division in the dwarf pea shoot apical meristem. **J. Exp. Bot.**, V.48, p. 1147-1150, 1997.

DENNE, M. P., WILSON, J. E. Some quantitative effects of indole-acetic acid on the wood production and tracheid dimensions of Picea. **Planta**, V.134, p. 223-228, 1977.

DENNE, M. P., WHITBREAD, V. Variation of fibre length within trees of Fraxinus excelsior. **Can J For Res**, V.8, p.253-260, 1978.

DIGBY, J., WAREING, P. F. The effect of applied growth hormones on cambial division and the differentiation of the cambial derivatives. **Ann Bot**, V.30, p.539-548, 1966.

DIXON, R. A., CHEN, F., GUO, D., PARVATHI, K. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, V.57, p. 1069-84, 2001.

DODD, R. S. Within-tree variation in wood production and wood quality in sycamore (*Acer pseudoplatanus*): its relation to crown characteristics. **Can J For Res**, V.15, p.56-65, 1985.

DUNBERG, A., ODÉN, P. Gibberellins and conifers. In: Crozier A. (Ed.), **The Biochemistry and Physiology of Gibberellins**. Praeger, New York, 1983. p.221–295.

EFFLAND, M. J. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. **Teppi**, V.60, n. 10. p. 143-144, 1977.

ELFSTRAND, M., SITBON, F., LAPIERRE, C., BOTTIN, A., VON ARNOLD, S. Altered lignin structure and resistance to pathogens in spi 2-expressing tobacco plants. **Planta**, V.214, p.708-716, 2002.

EPPLE, P., APEL, K. & BOHLMANN, H. – A *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. **Plant Physiol**, V.109, p. 813-820, 1995.

ERIKSSON, M. E., MORITZ, T. Daylength and spatial expression of a gibberellin 20-oxidase isolated from hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.). **Planta**, V.214, p. 920-930, 2002.

FERNÁNDEZ, H., FRAGA, M., BERNARD, P., REVILLA, M. Quantification of GA1, GA3, GA4, GA7, GA9, and GA20 in vegetative and male cone buds from juvenile and mature trees of *Pinus radiata*. **Plant Growth Regulation**, V.40, p.185-188, 2003.

FLECK, B., & HARBERD, N.P. Evidence that the *Arabidopsis* nuclear gibberellin signalling protein GAI is not destabilized by gibberellin. **Plant J.**, V.32, p.935–947, 2002.

FOSKET, D. E., ROBERTS, L. W. Induction of wound-xylem differentiation in isolated *Coleus* stem segments in vitro. **Am J Bot**, V.51, p.19-25, 1964.

FOSKET, D. E., TEPFER, D. A., Hormonal regulation of in cultured plant cells. **In Vitro**, V.14, p. 61-75, 1978.

FOSTER, K., LEE, I., PHARIS, R, MORGAN, P. Effects of Ring D-Modified Gibberellins on Gibberellin Levels and Development in Selected *Sorghum bicolor* Maturity

Genotypes. **J. Plant Growth Regul.**, New York, V.16, p.79-87, 1997.

FRIEDMAN, R., LEVIN, N., and ALTMAN, A. Presence and identification of polyamines in xylem and phloem exudates of plants. **Plant Physiol.**, V.82, p.1154-1157, 1986.

FUKUDA, H. & KOMAMINE, A. Establishment of an experimental system for the tracheary elements differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. **Plant Physiol**, V.52, p.57-60, 1980.

FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary element differentiation in single cells isolated from mesophyll of *Zinnia elegans*. **Planta**, V.155, p.423-430, 1982.

FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. Changes in the synthesis of RNA and protein during tracheary element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. **Planta Cell Physiol**, V.24, p.603-614, 1983.

FUKUDA, H. Cytodifferentiation in isolated single cells. **Bot Mag Tokyo**, V.192, p.491-501, 1989.

FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. Cytodifferentiation. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, IKVasil (Ed), **New York Academic**, V.2, p.149-212, 1985.

FUKUDA H. Tracheary element formation as a model system of cell differentiation. **Int. Rev. Cytol**, V.136, p.289-332, 1992

FUKUDA, H. Xylogenesis: Initiation, progression and cell death. **Annual Review of Plant Physiol and Plant Mol Biol**, V.47, p.299-325, 1996.

FUNADA, R.; SUGIYAMA, T.; KUBO, T.; FUSHITANI, M. Determination of indole-3-acetic acid levels in *Pinus densiflora* using the isotope dilution method. **Mokuzai Gakkaishi**, V.33, p.83-87, 1987.

FUKUSHIMA, R. S. & HATFIELD, R. Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, V.38, N.4, p.505-511, 2003.

GAD, A. E., ALONI, R. Time course and polarity of primary phloem fibre differentiation in *Pisum sativum*. **Ann Bot**, V.54, p.423-428, 1984.



GASPAR, T.; PENEL, C.L.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases 1970-1980: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants.** Univ Genève, Cent Bot, 324p. 1982.

GOTTLIEB, O. R. The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. **Phytochemistry**, V,28, n.10, p.2545-2558, 1989.

GOTTLIEB, R.; BORIN, M.R.D.M.B. & KAPLAN, M.A. C. Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in Angiosperms. **Phytochemistry**, V.40, p.99-113, 1995.

HALPIN, C.; KNIGHT, M. E.; FOXON, G. A.; CAMPBELL, M. M.; BOUDET, A. M.; BOON, J. J.; CHABBERT, B.; TOLLIER, M. T.; SCHUCH, W. Manipulation of lignin quality by down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. **The Plant Journal**, V.6, p.339-350, 1994.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J. Modeling the feasibility of intramolecular dehydrodiferulate formation in grass walls. **J. Sci. Food Agric.**, V.79, p.425-427, 1999.

HATFIELD, R., VERMERRIS, W. Update on Lignification Lignin Formation in Plants. The Dilemma of Linkage Specificity. **Plant Physiol**, V.126, p.1351-1357, 2001.

HAYASHI, T. Xyloglucan in the primary cell wall. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, V.40, p. 139-168, 1989.

HAYASHI, T., OGAWA, K., MITSUISHI, Y. Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. **Plant Cell Physiol.**, V.35, p.1199-205, 1994.

HEDDEN, P.; KAMIYA, Y. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. **Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.**, V.48, p.431-460, 1997.

HEDDEN, P.; PHILLIPS A. L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. **Trends Plant Sci**, V.5, p.523-530, 2000.

HEDDEN, P.; PROEBSTING, W. M. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. **Plant Physiol**, V.119, p.365-370, 1999.

HELLIWELL, C. A., SULLIVAN, J. A., MOULD, R. M., GRAY, J. C., PEACOCK, W. J., DENNIS, E. S. A plastid envelop location of *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. **Plant J.** V.8, p.201-208, 2001.

HESS, T., SACHS, T. The influence of a mature leaf on xylem differentiation. **New Phytol.**, V.71, p.903-914, 1972.

HIBINO, T.; TAKABE, K.; KAWAZU, T.; SHIBATA, D.; HIGUCHI, T. Increase of cinnamaldehyde groups in lignin of transgenic tobacco plants carrying an antisense gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase. **Biosci. Biotech. Biochem.**, V.59, p.929-931, 1995.

HIGUCHI, T. Chemistry and biochemistry of bamboo. **Bamboo J.** V.4, p.132,145,1987.

HIGUCHI, T. **Biochemistry and molecular biology of wood.** Springer, 506p, 1997.

HINOJOSA, G. F. Conceito de Hormônio. In: CID L. P. B. (Ed.). **Introdução aos Hormônios Vegetais.** 1ª ed. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cap. 1, p. 15-53, 2000.

HU, W. J. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. **Nat. Biotechnol.**, V.17, p.808-812, 1999.

HUHTINEN O., HONKANEN J., SIMOLA L. Ornithine and putrescine supported divisions and cell colony formation in leaf protoplasts of alders (*Alnus glutinosa* and *incana*). **Plant Sci. Lett.** V.28, p.3-9, 1982.

IWASAKI, Y., FUJISAWA, Y., KATO, H. Function of Heterotrimeric G Protein in Gibberellin Signaling. **J. Plant Growth Regul.** V.22, p.126-133, 2003.

JENKINS, P. A. Influence of applied indoleacetic acid and on xylem cell dimensions in *Pinus radiata* D. Don. In: BIELESKI, R. L., FERGUSON, A. R., CRESSWELL, M. M. (Eds), **Mechanisms of regulation of plant growth.** R Soc NZ, Wellington, p.737-742, 1974.

KAUR-SAWHNEY R., DAI, R., GALSTON A. Effect of inhibitors of polyamine biosynthesis on gibberellin-induced internode growth in light-grown dwarf peas. **Plant Cell Physiol.** V.27, p.253-260, 1986.

KENDE, H.; ZEEVAART, J. A. D. The five “classical” plant hormones. **Plant Cell**, V.9, p.1197-1210, 1997.

KHINDARIA A, AUST SD EPR detection and characterization of lignin peroxidase porphyrin pi-cation radical. **Biochemistry**, V.35, p.13107-13111, 1996.

KOBAYASHY, M., SPRAY, C. R., PHINNEY, B. O., GASKIN, P., MACMILLAN, J. Gibberellin metabolism in maize: The stepwise conversion of gibberellin Aldehyde to gibberellin AZO. **Plant Physiol.** V.110, p.413-418, 1996.

KOZLOWSKI, T. T., KRAMER, P. J. & PALLARDY, S. G. **“The Physiological Ecology of Woody Plants.”** Academic Press, San Diego, California, 1991.

LANNER R. M. Patterns of shoot development in Pinus and Their relationship to growth potential. In: CANNEL, M. G. R. & LAST, F. T. (ED.), **“Tree Physiology and Yield Improvement”**. Academic Press, London, p. 223-243, 1976.

LARA, M. E. B., GARCIA, M. C. G., FATIMA, T., EHNEß, R., LEE, T. K., PROELS, R., TANNER, W., ROITSCH, T. Extracellular Invertase Is an Essential Component of Cytokinin-Mediated Delay of Senescence. **The Plant Cell**, V.16, p.1276-1287, 2004.

LARSON, P. R. Auxin gradients and the regulation of cambial activity. In: **Tree physiology**. New York, Ronald Press, 1962.

LAUVERGEAT, V.; KENEDY, K.; FEUILLET, C.; McKIE, J. H.; GORRICHON, L.; BALTAS, M.; BOUDET, A. M.; GRIMA-PETTENATI, J. & DOUGLAS, K. T. Site-Directed Mutagenesis of a Serine Residue in Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, a Plant NADPH-Dependent Dehydrogenase, Affects the specificity for Coenzyme. **Biochemistry**, V.34, p.12426-12434, 1995.

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

LEWIS, N. G. & YAMOMOTO, E. Lignins: occurrence biosynthesis and biodegradation. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, V.41, p.455-496, 1990.

LI, L., POPKO, J., UMEZAWA, T., CHIANG, V. 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. **Journal of Biological Chemistry**, V.275, p.6537–6545, 2000.

LI, L., ZHOU, Y., CHENG, X., SUN, J., MARITA, J., RALPH, J., CHIANG, V. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. **Plant Biology**, V.100, n.8, p. 4939-4944, 2003.

LICHTENTHALER, H. K. ROHMER, M., SCHWENDER, J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher

plants. **Physiol. Plant.** V.101, p.643-652, 1997.

LIN, S. Y. & DANCE, C. W. **Methods in lignin chemistry.** Springer, Berlin Heidelberg New York, 1992.

LITTLE, C.H.A.; HEALD, J.K.; BROWNING, G. Identification and measurement of indoleacetic and abscisic acids in the cambial region of *Picea sitchensis* ( Bong ) Carr. By combined gas chromatography-mass spectography. **Planta**, V.139, p.133-138, 1978.

LITTLE, C.H.A.; SAVIDGE, B. The role of plant growth regulators in forest tree cambial growth. **Plant Growth Regul.**, V.6, p.137-169, 1987.

LOUREIRO, M. F. & BODDEY, R. M. Aprimoramento da metodologia de kjedahl para estudos do balanço de N total. **R. Bras. Ci. Solo**, 1986.

LU, F. & RALPH, J. **<sup>13</sup>C NMR studies on a new method for lignin characterization.** Madison: United States Department of Agriculture, 1995. p.45-46. (Dairy Forage Research Center. Research Summaries).

MARUMO, S., HATTORI, H., NANOYAMA, Y., AND MUNAKATA, K.. The presence of novel plant growth regulators in leaves of *Distylium racemosum* Sieb et Zucc. **Agric. Biol. Chem.** V.32, p.528-529, 1968.

MCDONALD R., GREANY P., SHAW P., MCCOLLUM T. Preharvest applications of gibberellic acid delay senescence of Florida grapefruit. **J. Hort. Sci.**, V.72, p.461-468, 1997.

MASSUDA, H., FUKUDA, H. K. Changes in peroxidase isoenzyme patterns during tracheary element differentiation in a culture of single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. **Pflanzenphysiol**, V.112, p.417-426, 1983.

MAUSETH, J. D. **Plant Anatomy.** Benjamin Cummings, Califórnia, 1988. 340p.

MICIC, M., ORBULESCU, J., RADOTIC, K., JEREMIC, .M., SUI, G., ZHENG, Y., LEBLANC, R. M. ZL-DHP lignin model compound at the air – water interface. **Biophysical Chemistry**, V.99, p.55-62, 2002.

MILLER, A. R., CRAWFORD, D. L., ROBERTS, L. W. Lignification and xylogenesis in *Lactuca* pith explants cultured in vitro in the presence of auxin and cytokinin: a role for endogenous ethylene. **J Exp Bot**, V.36, p.110-118, 1985.

MORK, D.W.; MORK, M.C. Cytokinin metabolism and action. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** V.52, p.89–118, 2001.

MOTA, R. V. CORDENUNSI, B. R. DO NASCIMENTO JR, PURGATTO E, ROSSETO MR, LAJOLO FM Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. **Planta**, V.216, p.325-333, 2002.

MOURA, V., GUIMARÃES, D. **Produção de mudas de *Eucalyptus* para estabelecimento de plantios florestais.** Comunicado Técnico, n. 85, p. 1-9, 2003.

NAGATA, T. Multifunctional auxin responsive genes. In: Nagata T., Uchiyama (Eds.) **Gene expression in plants.** Kodansha Scientific, Tokyo, p. 69-80, 1995.

NAKAMURA, T., SAOTOME, M. ISHIGURO, Y., ITOH, R., HIGURASHI, S., HOSOMO, M., and ISHII, Y. The effects of GA<sub>3</sub> on weeping of growing shoots of the Japanese cherry, *Prunus spachiana*. **Plant Cell Physiol.** V.35, p.523-527, 1994.

NAKANO, J.; MESHITSUKA, G. The detection of lignin. In: Dence C, Lin S. (Eds) **Methods in Lignin Chemistry.** Berlin: Springer-Verlag, p.23–32, 1992.

NELSON, N. D.; HILLIS, W. E. Genetic and biochemical aspects of kino vein formation in *Eucalyptus*. II. Hormonal influence on kino formation in *E. Regnans*. **Aust For Res**, V.8, p.83-91, 1978.

NORTHCOTE, D. H. Cell organelles and their function in biosynthesis of cell wall components: control of cell wall assembly during differentiation. In: Higuchi, T. (Ed.) **Biosynthesis and biodegradation of wood components.** Academic Press, New York London, p.87-108, 1985.

OLIEN, W. C.; BUKOVAC, M. J. Ethephon-induced gummosis in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). I. Effect on xylem function and shoot water status. **Plant Physiol**, V.70, p.547-555, 1982.

OLSZEWSKI, N., SUN, T., GUBLER, F. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. **Plant Cell**, V.14, p.61–80, 2002.

PHARIS, R. P., JENKINS, P. A., AOKI, H., SASAA, T. Hormonal physiology of wood growth in *Pinus radiata* D. Don: effects of gibberellin A4 and the influence of abscisic acid upon [3 H] gibberellin A4 metabolism. **Aust J. Plant Physiol**, V.8, p.559-567, 1981.

PHARIS, R.; YEH, F. C.; DANCIC, B. P. Superior growth potential in trees: What is its basis, and can it be test for at early age. **Can. J. For. Res.** V.21, p.368-374, 1991.

PÉREZ, F. J., MORALES, V. A basic peroxidase isoenzyme from grape pedicel is induced by gibberellic acid. **Australian Journal of Plant Physiology**, V.26, p.387-390, 1999.

PHILLIPS, R.; PRESS, M.C.; EASON, A. Poliamynes in relation to cell division and xylogenesis in cultured explants of *Elianthus tuberosos*: lack of evidence for growth-regulatory action. **J Exp Bot**, n.38, p.164-172, 1987.

PIRES, E. J. P., BOTELHO, R. V. Uso de reguladores vegetais na cultura da videira. In: Simpósio Brasileiro sobre uvas de mesa, V.1, 2000, Ilha Solteira. **Anais Ilha Solteira**: 2001. 129-147p.

RALPH, J.; ZHANG, Y.; EDE, R. M. **Preparation and value of synthetic lignins with NMR-invisible methoxyl groups**. Madison: United States Department of Agriculture, (Dairy Forage Research Center. Research Summaries), 1995. p.38-40.

RALPH, J.; **3D NMR experiments for use in cell wall research**. Madison: United States Department of Agriculture, (Dairy Forage Research Center. Research Summaries), 1998. p.46-50.

RAPPAPORT, L. Plant growth hormones: internal control points. **Bot Gaz**, V.141, p. 125-130, 1980.

RICHARDSON, S. D. **The role of physiology in forest-tree improvement**. N. Z. For. Serv. Reprint, n. 23, 1960.

RIDOUTT, B. G.; PHARIS, R. P.; SANDS, R. Fibre length and gibberellins A1 and A20 are decreased in eucalyptus globulus by acylcyclohexanedione injected into stem. **Physiol Plant**, V.96, p.559-566, 1996.

ROBERTS, L. W. **Cytodifferentiation in plants. Xylogenesis as a model system**. Cambridge University Press, Cambridge, 1976. 160p.

ROBERTS, L. W. Hormonal Aspects of Vascular Differentiation. In: ROBERTS, L. W., GAHAN, P. B., ALONI, R. **Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators (Springer series in wood science)**. Estados Unidos, Springer-Verlag, 1988. 22-38p.

ROBERTS, L. W., GAHAN, P. B., ALONE, R. **Vascular differentiation and plant**

**growth regulators.** Springer, Berlin Heidelberg: New York, 1988. 154p.

SACHS, T. Axiality and polarity in vascular plants. In: Barlow P W, Carr D J (Eds) **Positional controls in plant development.** Cambridge University Press, Cambridge, 1984. 193-224p.

SACHS, T. The induction of fibre differentiation in peas. **Ann Bot**, V.36, p.189-197, 1972.

SAKS, Y., FEIGENBAUM, P., ALONI, R. Regulatory effect of cytokinin on secondary xylem fiber formation in na in vivo system. **Plant Physiol**, V.76, p.638-642, 1984.

SANSBERRO PA, REY HY, BERNARDIS A, LUNA C, COLLAVINO M, MROGINSKI LA Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by in vitro culture of nodal segments. **Biocell**, V.24, p.53-63, 2000.

SARKAR, S.; PERRAS, M. R.; FALK, D. E.; ZHANG, R. C.; PHARIS, R. P.; FLETCHER, R. A. Relationship between gibberellins, height, and stress tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, V.42, n.2, p.25-135, 2004.

SATO, Y., SUGIYAMA, M., GORECKI, R. J., FUKUDA, H., KOMAMINE, A. Interrelationship between lignin deposition and the activities of peroxidase isoenzymes in differentiating tracheary elements of *Zinnia*: analysis using D- $\alpha$ -aminooxy- $\beta$ -phenylpropionic acid and 2-aminoindan-2-phosphoric acid. **Planta**, V.189, p.584-589, 1993.

SATO, Y.; SUGIYAMA, M.; KOMAMINE, A.; FUKUDA, H. Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. **Planta**, V.196, p.141-147, 1995.

SAVIDGE, R.A., HEALD, J.K, WAREING, P.F. Non-uniform distribution and seasonal variation of endogenous indol-3ylacetic in the cambial region of *Pinus contorta* Dougl. **Planta**, V.155, p.89-92, 1982.

SAVIDGE, R.A. Characterization of indol-3-ylacetic acid in developing secondary xylem of 26 Canadian species by combined gas chromatography-mass spectrometry. **Can J Bot**, V.68, p.521-523, 1990.

SILVA, A., DOMINGUES, M., VIEITES, R., RODRIGUES, J. Fitorreguladores na conservação pós-colheita do maracujá doce armazenado sob refrigeração. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, V.23, n.3, p.643-649, 1999.

SIRCAR, S. M., CHAKRAVERTY, R. The effect of gibberellic acid on jute (*Corchorus capsularis*). **Sci Cult**, V.26, p.141-143, 1960.

SMART, C. C., ARMSTRONG, N. The influence of lignification on the development of vascular tissue in *Vigna radiata*. **Protoplasma**, V.124, p.87-95, 1985.

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.

SOROKIN, H.P.;THIMANN, K.V. The histological basis for inhibition of axillary buds in *Pisum sativum* and effects of auxins and kinetin on xylem development. **Protoplasma**, V.59, p.326-350, 1964.

STANT, M. Y. The effect of gibberellic acid on cell width and the cell-wall of some phloem fibers. **Ann Bot**, n.27, p.185-190, 1963.

STORCK, L. (org.); GARCIA, D. C.; LOPES, S. J.; ESTEFANEL, V. **Experimentação Vegetal**. Santa Maria, UFSM, 2000. 198p.

SUN,T., GUBLER, F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** V.55, p.197-223, 2004.

SUNDBERG, B.; LITTLE, C.H.A ; CUI, K. Distribution of indole-3-acetic acid and the occurrence of its alkali-labile conjugates in the extraxylary region of *Pinus sylvestris* stems. **Plant Physiol**, V.93, p.1295-1302, 1990.

TAKEDA, T.; FURUTA, Y.; AWANO, T.; MIZUNO, K.; MITSUISHI, Y.; HAYASHI, T. Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. **Plant Biology, USA**, V.99, p.9055-9060, 2002.

THOMPSON, N. P., JACOBS, W. P. Polarity of IAA effect on sieve-tube and xylem regeneration in *Coleus* and tomato stems. **Plant Physiol**, n.41, p.673-682, 1966.

TORREY, J.G.; LOOMIS, R. S. Auxin-cytokinin control of secondary vascular tissue formation in isolated roots of *Raphanus*. **Am. J. Bot.** V.54, p.1098-1106, 1967.

VAN DOORSSELAERE, J. A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid 5-hydroxyferulic acid o-methyltransferase activity. **Plant. J.** V.8, p.855-864, 1995.



VIEIRA, E. L., MONTEIRO, C. A. Hormônios Vegetais. In: CASTRO, P. R., SENA, J. O. A., KLUGE, R. A. (Eds.). **Introdução á Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal**. Maringá, Eduem, 2002. 254p.

WANG, Q.; LITTLE, C.; SHENG, C. ODEN, P.; PHARIS, R. Effects of exogeneous gibberellin A4/7 on tracheid production, longitudinal growth and levels of indole-3-acetic acid and gibberellins A4, A7 and A9 in the terminal shoot of *Pinus sylvestris* seedlings. **Physiol Plant**, V.86, p.202-208, 1992.

WANG, Q.; LITTLE, C.; ODEN, P. C. Effect of laterally applied gibberellin A<sub>4/7</sub> on cambial growth and the level of indole-3-acetic-acid in *Pinus sylvestris* shoots. **Physiol Plant**, V.95, p.187-194, 1995.

WAREING, P. F. Interaction between indole-acetic acid and gibberellic acid in cambial activity. **Nature**, Lond., n.181, p.1744-1745, 1958.

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.

WEYERS, J.D.B.; PATERSON, N.W.; BLUCK, R.A. Towards a quantitative definition of plant hormone sensitivity: opinion. **Plant Cell Environ**, V.10, p.1-10, 1987.

WHETTEN, R. & SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **The Plant Cell**, V.7, p.1001-1013, 1995.

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.

WODZICKI, T. J., WODZICKI, A. B. Seasonal abscisic acid accumulation in the stem cambial region of *Pinus silvestris*, and its contribution to the hypothesis of a latewood control system in conifers. **Physiol Plant**, V.48, p.443-447, 1980.

WODZICKI, T. J., WODZICKI, A. B.; ZAJACZKAWSKI, S. Hormonal modulation of the oscillatory system involved in polar transport of auxin. **Physiol Plant**, V.46, p.97-100, 1979.

YAMAMOTO, F.; ANGELES, G.; KOZLOWSKI, T.T. Effect of ethrel on stem anatomy of *Ulmus americana* seedlings. **IAWA Bull N S**, V.8, p.3-9, 1987a.

YAMAMOTO, F.; KOZLOWSKI, T.T. Effect of ethrel on growth and stem anatomy of *Pinus halepensis* seedlings. **IAWA Bull N S**, V.8, p.11-19, 1987b.

YAMAMOTO, F.; KOZLOWSKI, T.T. Effects of flooding of soil on growth stem anatomy, and ethylene production of *Thuji orientalis* seedlings. **IAWA Bull N S**, V.8, p.21-29, 1987.

YE, Z.-H., KNEUSEL, R., MATERN,U., VARNER, J., An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. **Plant Cell**, V.6, p.1427–1439, 1994.

YE, ZHENG-HUA. Vascular tissue Differentiation and Pattern Formation in Plants. **Annu. Rev. Plant. Biol.**, V.53, p.183-202, 2002.

ZAKRZEWSKI, J. Hormonal control of cambial activity and vessel differentiation in *Quercus robur*. **Physiol Plant**, V.57, p.537-542, 1983.

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

## **ANEXOS**

**Anexo I** – Médias das medidas microscópicas dos vasos

**Anexo II** – Médias das medidas microscópicas das fibras

**Anexo III** - Medidas com o coeficiente do microscópio (elementos de vaso)

**Anexo IV** - Medidas com o coeficiente do microscópio (fibras)

**Anexo V** - Extrativos

**Anexo VI** – Tabelas completas da análise de variância

**Anexo VII** – Gráficos dos tratamentos simples (GA<sub>3</sub>, BAP e testemunha) para fibra, vaso, altura e diâmetro da planta

**Anexo VIII** – Gráficos dos efeitos sobre o teor de lignina insolúvel Klason causados pelos tratamentos utilizando os reguladores de crescimento isoladamente (GA<sub>3</sub> e BAP) em relação à testemunha

**Anexo IX** – Espectros no infravermelho dos tratamentos (GA<sub>3</sub> e BAP)

**Anexo X** – Espectros <sup>1</sup>H RMN dos tratamentos (GA<sub>3</sub> e BAP)

**Anexo I** – Médias das medidas microscópicas dos vasos

**Tabela 14.** Médias das medidas dos elementos de vaso ( $\mu\text{m}$ )

Tratamentos	Comprimento	Diâmetro	Espessura da parede
G <sub>[1]</sub>	299,64	55,2	1,3
G <sub>[2]</sub>	328,88	55,0	1,6
C <sub>[1]</sub>	271,24	45,9	1,4
C <sub>[2]</sub>	333,68	59,4	1,5
G <sub>[1]</sub> C <sub>[1]</sub>	298,08	54,8	1,4
G <sub>[1]</sub> C <sub>[2]</sub>	308,76	50,1	1,5
G <sub>[2]</sub> C <sub>[1]</sub>	321,80	53,2	1,4
G <sub>[2]</sub> C <sub>[2]</sub>	328,36	50,1	1,4
T	324,56	39,0	1,3

**Anexo II** – Médias das medidas microscópicas das fibras

**Tabela 15.** Médias das medidas das fibras ( $\mu\text{m}$ )

Tratamentos	Diâmetro	Lúmen	Comprimento	Espessura da parede
G <sub>[1]</sub>	20,40	13,59	516,21	3,40
G <sub>[2]</sub>	20,38	12,62	518,67	3,88
C <sub>[1]</sub>	15,88	9,48	460,52	3,20
C <sub>[2]</sub>	16,22	11,52	592,27	2,35
G <sub>[1]</sub> C <sub>[1]</sub>	14,88	8,31	526,66	3,28
G <sub>[1]</sub> C <sub>[2]</sub>	15,42	9,45	588,88	2,99
G <sub>[2]</sub> C <sub>[1]</sub>	15,79	9,10	525,48	3,34
G <sub>[2]</sub> C <sub>[2]</sub>	19,65	11,67	597,24	3,99
T	13,33	7,41	568,83	2,96

**Anexo III - Medidas com o coeficiente do microscópio (elementos de vaso)**

**Tabela 16.** Elementos de vaso do tratamento G<sub>[1]</sub>

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	200,00	299,64	455,00	69,35
Diâmetro	41,5	55,2	75,1	7,97
Espessura de Parede	0,8	1,3	2,1	0,29

**Tabela 17.** Elementos de vaso do tratamento G<sub>[2]</sub>

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	236,00	328,88	429,00	60,98
Diâmetro	42,4	55,0	66,7	6,24
Espessura de Parede	1,1	1,6	2,2	0,28

**Tabela 18.** Elementos de vaso do tratamento C<sub>[1]</sub>

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	169,00	271,24	411,00	66,12
Diâmetro	36,4	45,9	54,5	4,62
Espessura de Parede	0,9	1,4	1,9	0,24

**Tabela 19.** Elementos de vaso do tratamento C<sub>[2]</sub>

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	233,00	333,68	464,00	67,89
Diâmetro	44,4	59,4	72,7	7,47
Espessura de Parede	1,2	1,5	2,1	0,24

**Tabela 20.** Elementos de vaso do tratamento  $G_{[1]}+C_{[1]}$ 

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	151,00	298,08	470,00	77,00
Diâmetro	42,4	54,8	75,8	7,32
Espessura de Parede	1,2	1,4	1,6	0,13

**Tabela 21.** Elementos de vaso do tratamento  $G_{[1]}+C_{[2]}$ 

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	209,00	308,76	471,00	74,44
Diâmetro	33,3	50,1	64,7	7,92
Espessura de Parede	1,3	1,5	1,9	0,16

**Tabela 22.** Elementos de vaso do tratamento  $G_{[2]}+C_{[1]}$ 

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	179,00	321,80	441,00	72,82
Diâmetro	42,0	53,2	71,7	7,56
Espessura de Parede	1,1	1,4	1,8	0,17

**Tabela 23.** Elementos de vaso do tratamento  $G_{[2]}+C_{[2]}$ 

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	227,00	328,36	507,00	75,24
Diâmetro	40,0	50,1	64,0	6,29
Espessura de Parede	1,3	1,4	1,9	0,15

**Tabela 24.** Elementos de vaso do tratamento T

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	221,00	324,56	470,00	63,80
Diâmetro	33,3	39,0	46,6	3,47
Espessura de Parede	1,0	1,3	1,6	0,15

**Anexo IV - Medidas com o coeficiente do microscópio (fibras)**

**Tabela 25.** Fibras do tratamento G<sub>[1]</sub>

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	16,00	20,40	26,00	2,48
Lúmen	9,00	13,59	18,00	2,36
Comprimento	326,97	516,21	740,60	112,82
Espessura de Parede	2,30	3,40	5,50	0,73

**Tabela 26.** Fibras do tratamento G<sub>[2]</sub>

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	13,80	20,38	24,00	2,72
Lúmen	6,00	12,62	17,00	2,66
Comprimento	417,94	518,67	630,28	67,52
Espessura de Parede	2,00	3,88	5,50	1,01

**Tabela 27.** Fibras do tratamento C<sub>[1]</sub>

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	9,00	15,88	20,00	2,42
Lúmen	4,40	9,48	14,40	2,33
Comprimento	337,16	460,52	721,26	85,49
Espessura de Parede	2,00	3,20	5,00	0,71

**Tabela 28.** Fibras do tratamento C<sub>[2]</sub>

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	12,00	16,22	23,00	2,95
Lúmen	6,80	11,52	17,50	2,72
Comprimento	449,48	592,27	709,19	58,64
Espessura de Parede	1,40	2,35	3,50	0,57

**Tabela 29.** Fibras do tratamento  $G_{[1]}+C_{[1]}$ 

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	8,00	14,88	20,00	3,34
Lúmen	4,00	8,31	13,60	2,81
Comprimento	290,28	526,66	806,35	131,65
Espessura de Parede	1,15	3,28	5,00	0,98

**Tabela 30.** Fibras do tratamento  $G_{[1]}+C_{[2]}$ 

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	8,00	15,42	21,00	2,71
Lúmen	4,00	9,45	14,00	2,22
Comprimento	449,13	588,88	707,96	71,76
Espessura de Parede	1,70	2,99	4,00	0,63

**Tabela 31.** Fibras do tratamento  $G_{[2]}+C_{[1]}$ 

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	13,00	15,79	21,00	2,30
Lúmen	6,00	9,10	13,00	1,99
Comprimento	355,55	525,48	731,91	103,03
Espessura de Parede	1,90	3,34	5,50	0,85

**Tabela 32.** Fibras do tratamento  $G_{[2]}+C_{[2]}$ 

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	14,70	19,65	28,00	3,41
Lúmen	8,00	11,67	17,00	2,49
Comprimento	415,84	597,24	830,72	94,58
Espessura de Parede	2,50	3,99	7,00	0,98

**Tabela 33.** Fibras do tratamento T

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	9,50	13,33	18,00	2,33
Lúmen	3,00	7,41	11,00	2,01
Comprimento	391,61	568,83	703,56	85,65
Espessura de Parede	2,00	2,96	4,70	0,68



**Anexo V - Extrativos**

**Tabela 34.** Extrativos de todos os tratamentos

	C. hexano	A. de etila	Metanol	H2O
G <sub>[1]</sub>	0,16	0,37	1,21	2,43
G <sub>[2]</sub>	0,22	0,40	2,74	1,71
C <sub>[1]</sub>	0,26	0,69	1,29	1,90
C <sub>[2]</sub>	0,14	0,35	1,21	1,78
G <sub>[1]</sub> C <sub>[1]</sub>	0,40	0,52	0,86	1,84
G <sub>[1]</sub> C <sub>[2]</sub>	0,27	0,53	1,12	2,35
G <sub>[2]</sub> C <sub>[1]</sub>	0,18	0,38	1,06	1,70
G <sub>[2]</sub> C <sub>[2]</sub>	0,19	0,29	0,96	1,94
T	0,30	0,39	3,62	4,50

**Anexo VI – Tabelas completas da análise de variância**

**Tabela 35.** Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o **diâmetro de fibras** de *Eucalyptus grandis* aos 6 meses de idade

FV	GL	QM	NS
<b>G (GA<sub>3</sub>)</b>	2	224,3074	0,000000*
<b>C (BAP)</b>	2	121,6728	0,000000*
<b>GxC</b>	4	162,0397	0,000000*
<b>Resíduo</b>	216	7,659026	

\*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de significância.

**Tabela 36.** Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o **lúmen de fibras** de *Eucalyptus grandis* aos 6 meses de idade

FV	GL	QM	NS
<b>G (GA<sub>3</sub>)</b>	2	52,1520	0,000185*
<b>C (BAP)</b>	2	109,9000	0,000000*
<b>GxC</b>	4	135,5968	0,000000*
<b>Resíduo</b>	216	5,830978	

\*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de significância.

**Tabela 37.** Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o comprimento de fibras de *Eucalyptus grandis* aos 6 meses de idade

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>NS</b>
<b>G (GA<sub>3</sub>)</b>	2	813,2	0,909823
<b>C (BAP)</b>	2	151968,0	0,000000
<b>GxC</b>	4	28744,6	0,011133
<b>Resíduo</b>	216	8601,551	

\*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de significância.

**Tabela 38.** Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a parede de fibras de *Eucalyptus grandis* aos 6 meses de idade

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>NS</b>
<b>G (GA<sub>3</sub>)</b>	2	1,417713	0,000000*
<b>C (BAP)</b>	2	0,232768	0,028257*
<b>GxC</b>	4	0,391928	0,000113*
<b>Resíduo</b>	216	0,064195	

\*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de significância.

**Tabela 39.** Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o comprimento do vaso de *Eucalyptus grandis* aos 6 meses de idade

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>NS</b>
<b>G (GA<sub>3</sub>)</b>	2	11458,54	0,098464
<b>C (BAP)</b>	2	14586,03	0,052749
<b>GxC</b>	4	7536,26	0,191374
<b>Resíduo</b>	216	4890,281	

\*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de significância.

**Tabela 40.** Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o diâmetro do vaso de *Eucalyptus grandis* aos 6 meses de idade

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>NS</b>
<b>G (GA<sub>3</sub>)</b>	2	619,573	0,000002*
<b>C (BAP)</b>	2	226,321	0,007287*
<b>GxC</b>	4	1408,830	0,000000*
<b>Resíduo</b>	216	44,94444	

\*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de significância.

**Tabela 41.** Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o espessura do vaso de *Eucalyptus grandis* aos 6 meses de idade

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>NS</b>
<b>G (GA<sub>3</sub>)</b>	2	0,056626	0,729353
<b>C (BAP)</b>	2	0,364174	0,133485
<b>GxC</b>	4	0,216208	0,308880
<b>Resíduo</b>	216	0,179162	

\*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de significância.

**Tabela 42.** Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a lignina de Klason de *Eucalyptus grandis* aos 6 meses de idade

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>NS</b>
<b>G (GA<sub>3</sub>)</b>	2	4,83762	0,000000*
<b>C (BAP)</b>	2	34,46712	0,000000*
<b>GxC</b>	4	16,19453	0,000000*
<b>Resíduo</b>	18	0,053748	

\*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de significância.

**Tabela 43.** Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a altura das plantas de *Eucalyptus grandis* aos 6 meses de idade

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>NS</b>
<b>G (GA<sub>3</sub>)</b>	2	8788,155	0,000000*
<b>C (BAP)</b>	2	313,756	0,214937
<b>GxC</b>	4	472,056	0,066669
<b>Resíduo</b>	36	195,4889	

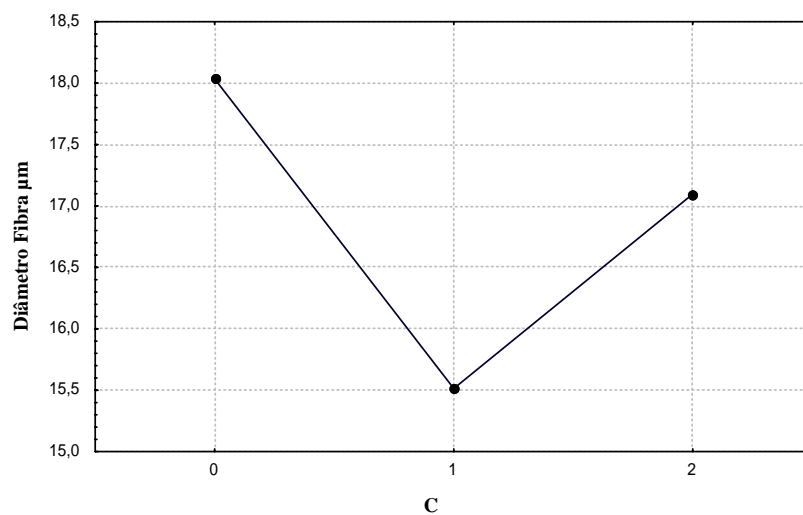
\*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de significância.

**Tabela 44.** Análise de variância para os efeitos isolados e sinérgicos do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o diâmetro das plantas de *Eucalyptus grandis* aos 6 meses de idade

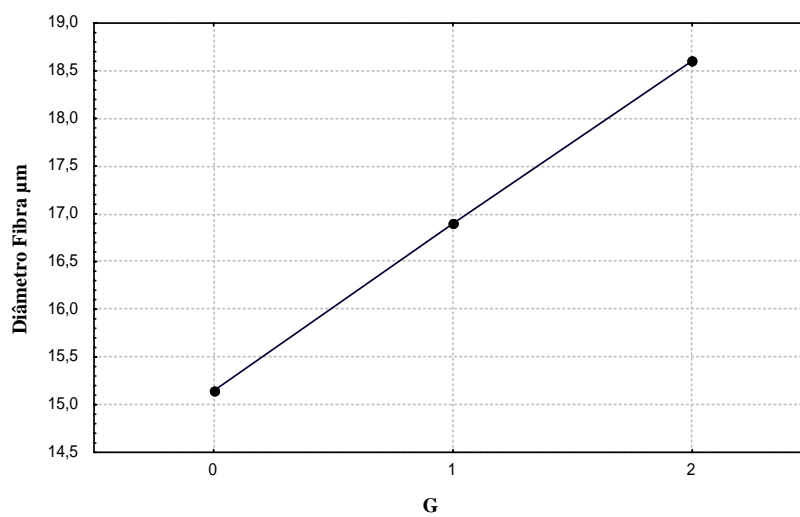
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>NS</b>
<b>G (GA<sub>3</sub>)</b>	2	0,040647	0,003550*
<b>C (BAP)</b>	2	0,006020	0,384674
<b>GxC</b>	4	0,005597	0,467337
<b>Resíduo</b>	216	0,006136	

\*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de significância.

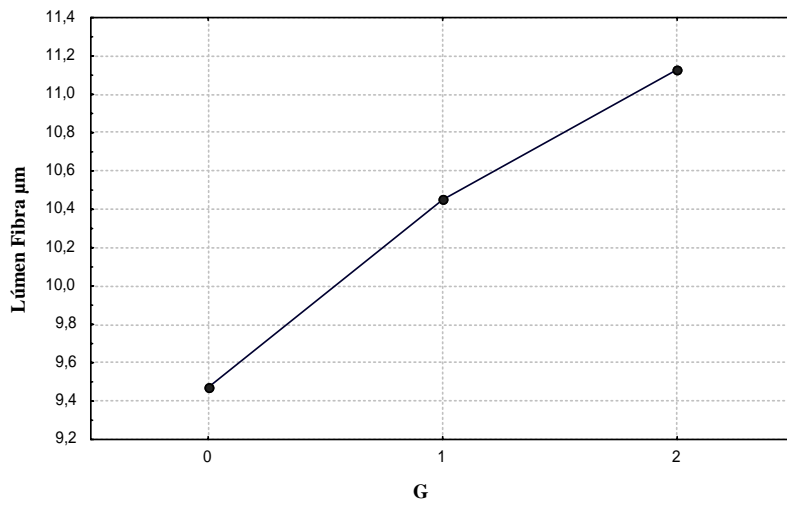
**Anexo VII** – Gráficos dos tratamentos simples ( $GA_3$ , BAP e testemuha) para fibra, vaso, altura e diâmetro da planta



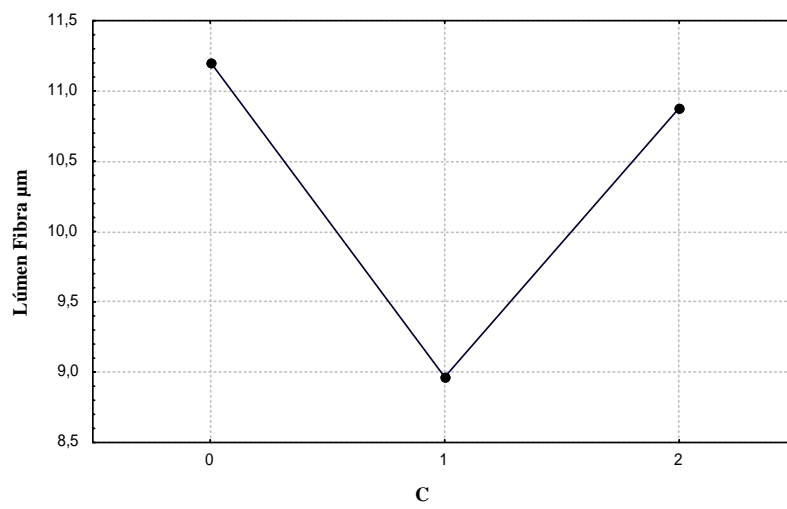
**Figura 32.** Efeito do BAP sobre o diâmetro da fibra



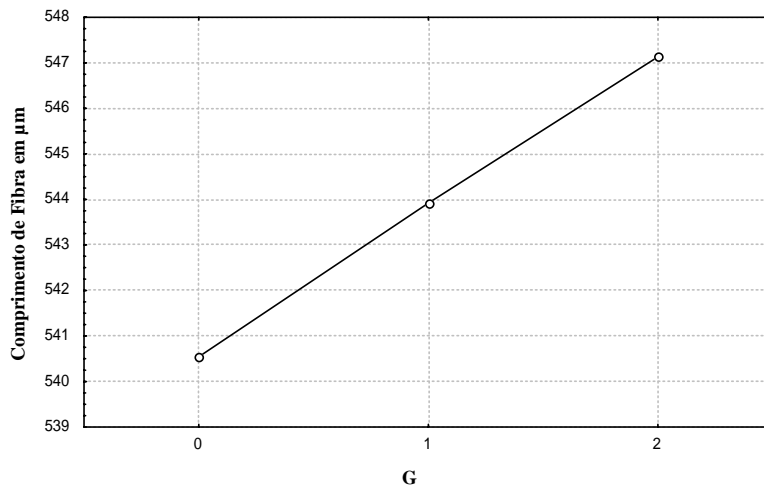
**Figura 33.** Efeito das duas concentrações de  $GA_3$  sobre o diâmetro de fibra



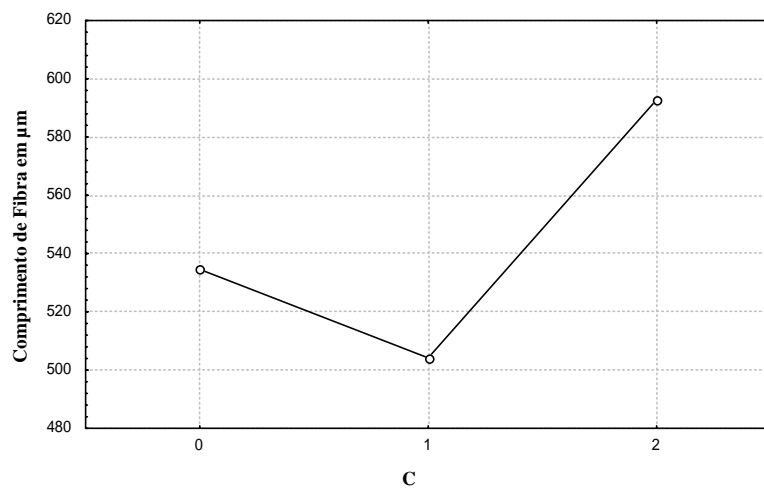
**Figura 34.** Efeito das duas concentrações de  $\text{GA}_3$  sobre o diâmetro do lúmen de fibra



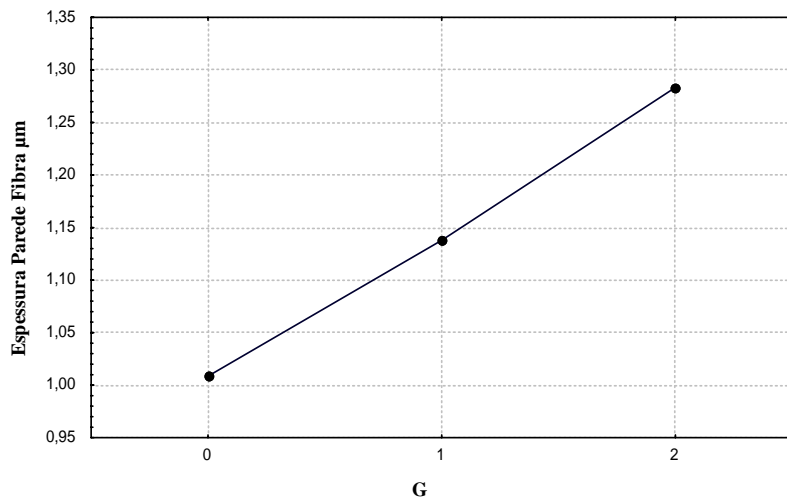
**Figura 35.** Efeito das duas concentrações de BAP sobre o diâmetro do lúmen fibra de fibra



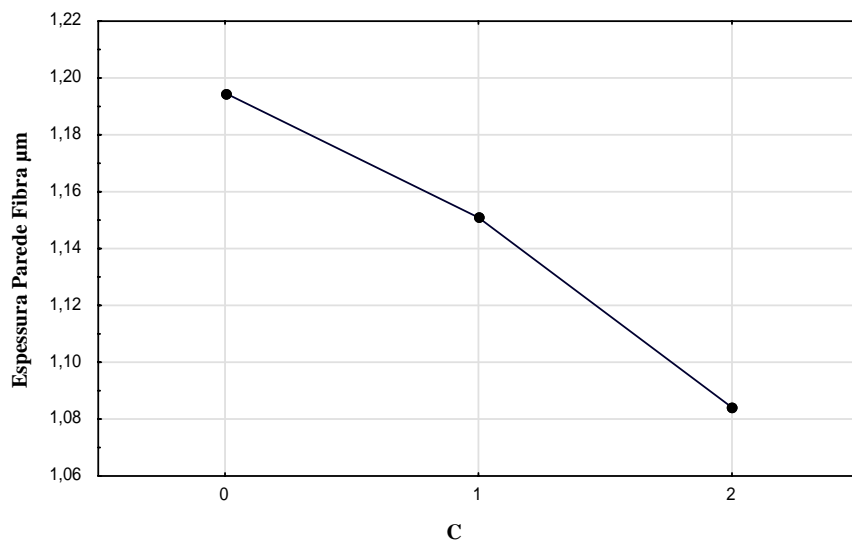
**Figura 36.** Efeito das duas concentrações de  $\text{GA}_3$  sobre o comprimento de fibra



**Figura 37.** Efeito das duas concentrações de BAP sobre o comprimento de fibra

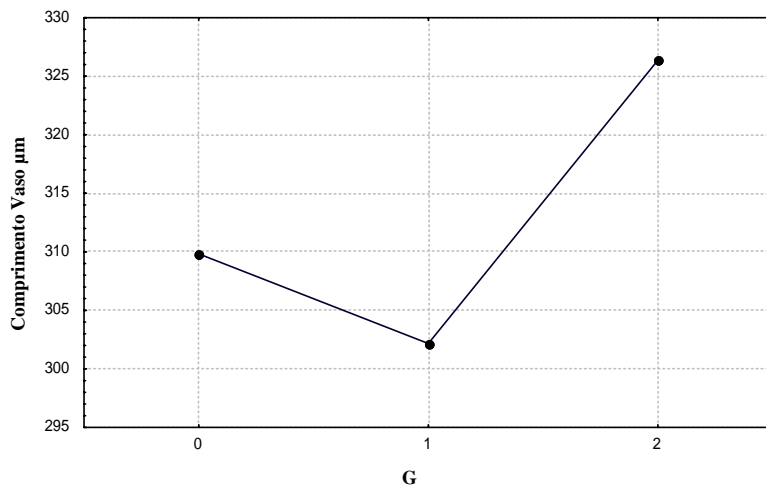


**Figura 38.** Efeito das duas concentrações de  $\text{GA}_3$  sobre a espessura de fibra

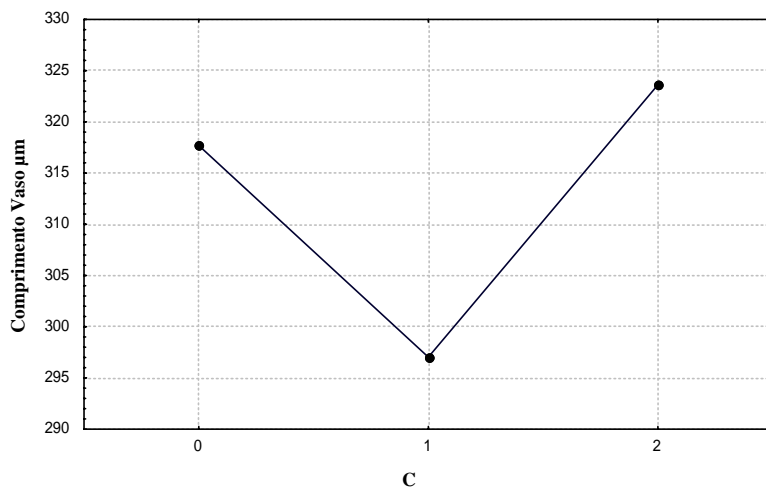


**Figura 39.** Efeito das duas concentrações de BAP sobre a espessura de fibra

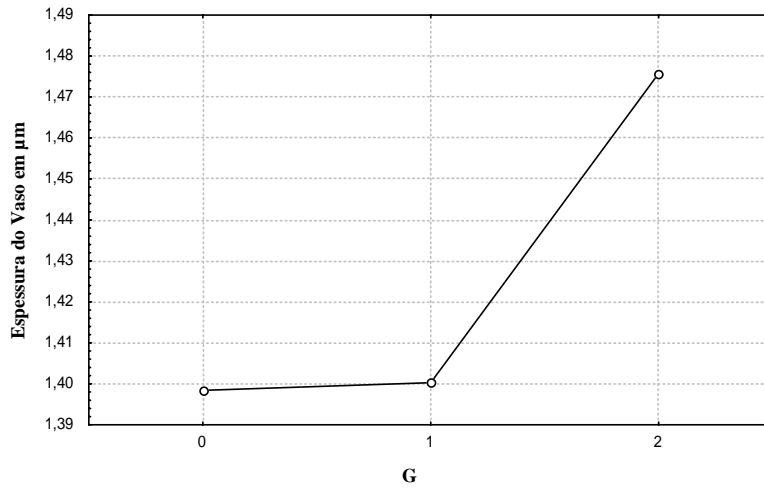




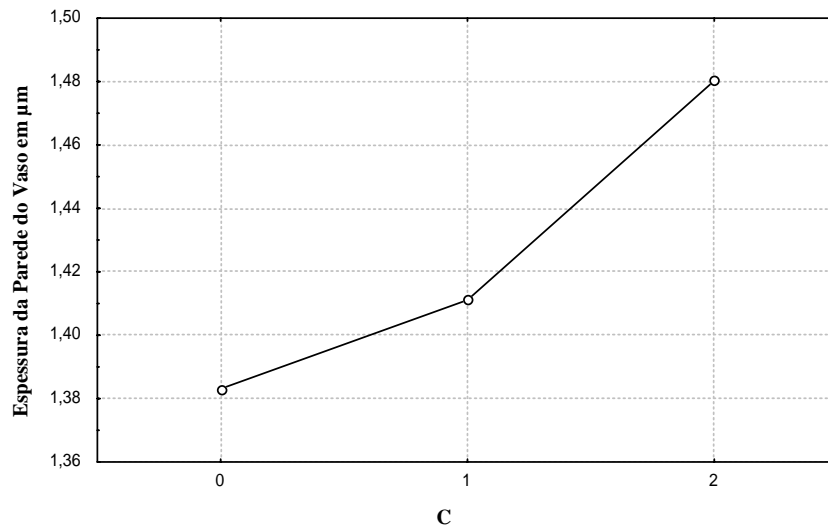
**Figura 40.** Efeito das duas concentrações de  $\text{GA}_3$  sobre o comprimento do vaso



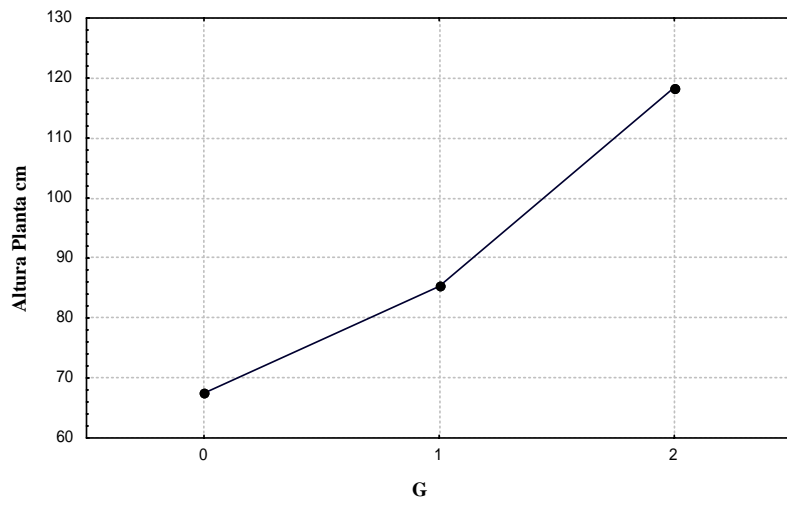
**Figura 41.** Efeito das duas concentrações de BAP sobre o comprimento do vaso



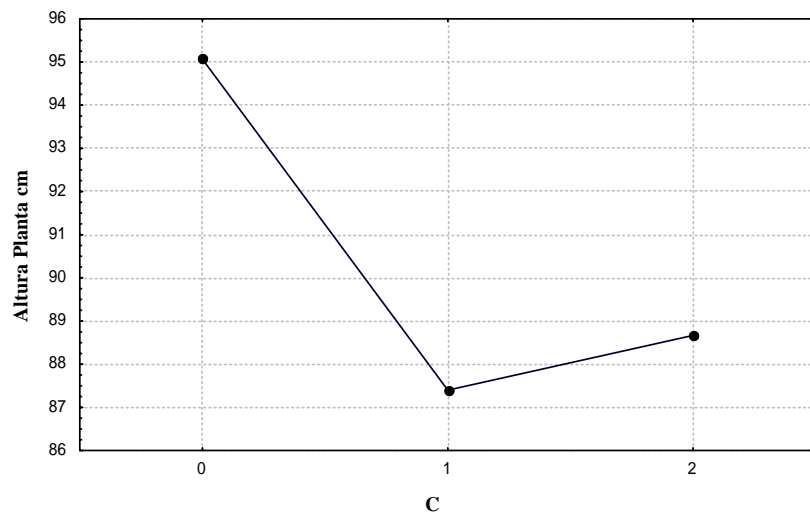
**Figura 42.** Efeito das duas concentrações de  $\text{GA}_3$  sobre a espessura do vaso



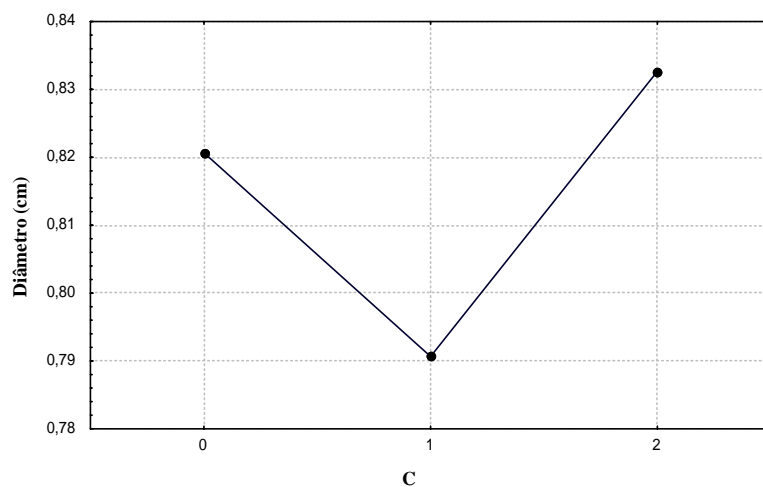
**Figura 43.** Efeito das duas concentrações de BAP sobre a espessura do vaso



**Figura 44.** Efeito das duas concentrações de GA<sub>3</sub> sobre a altura da planta

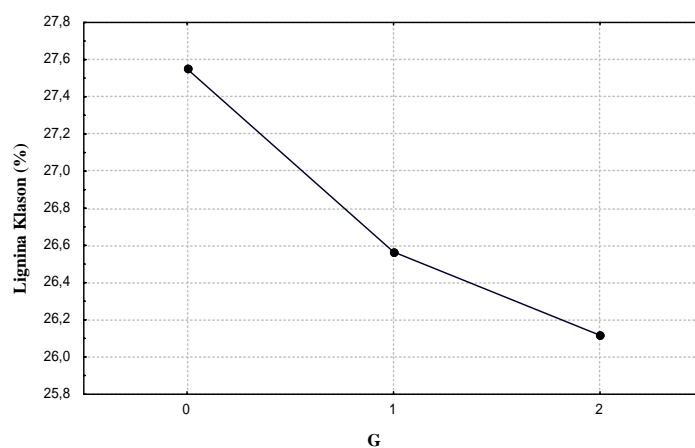


**Figura 45.** Efeito das duas concentrações de BAP sobre a altura da planta

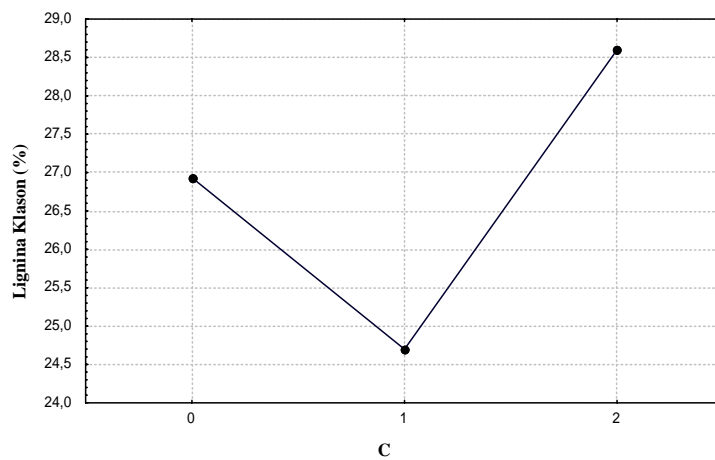


**Figura 46.** Efeito das duas concentrações de BAP sobre o diâmetro na base da planta

**Anexo VIII** – Gráficos dos efeitos sobre o teor de lignina insolúvel Klason causados pelos tratamentos utilizando os reguladores de crescimento isoladamente ( $GA_3$  e BAP) em relação à testemunha

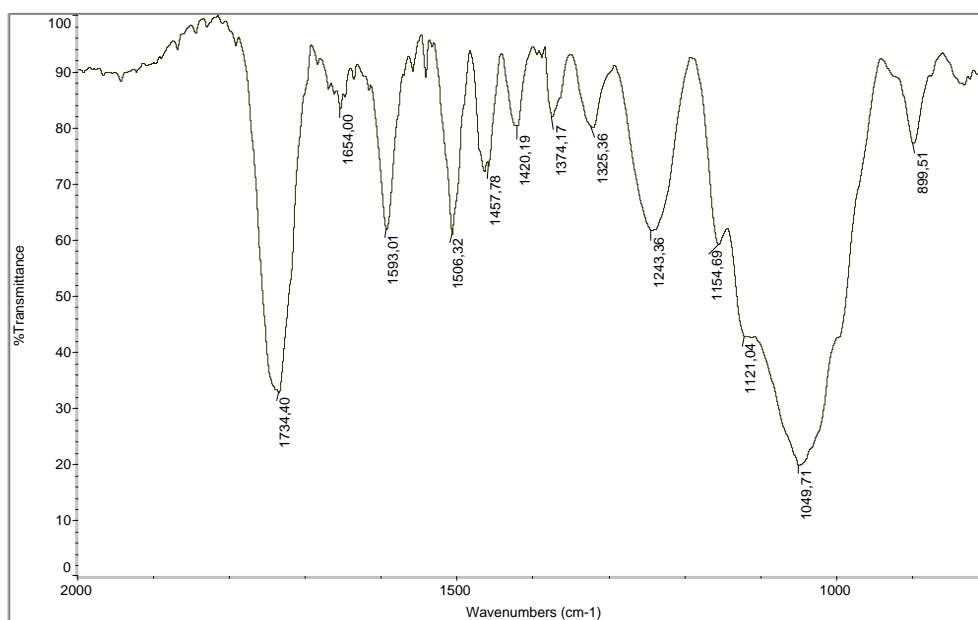


**Figura 47.** Lignina insolúvel (Klason) dos tratamentos (T,  $G_{[1]}$  e  $G_{[2]}$ )

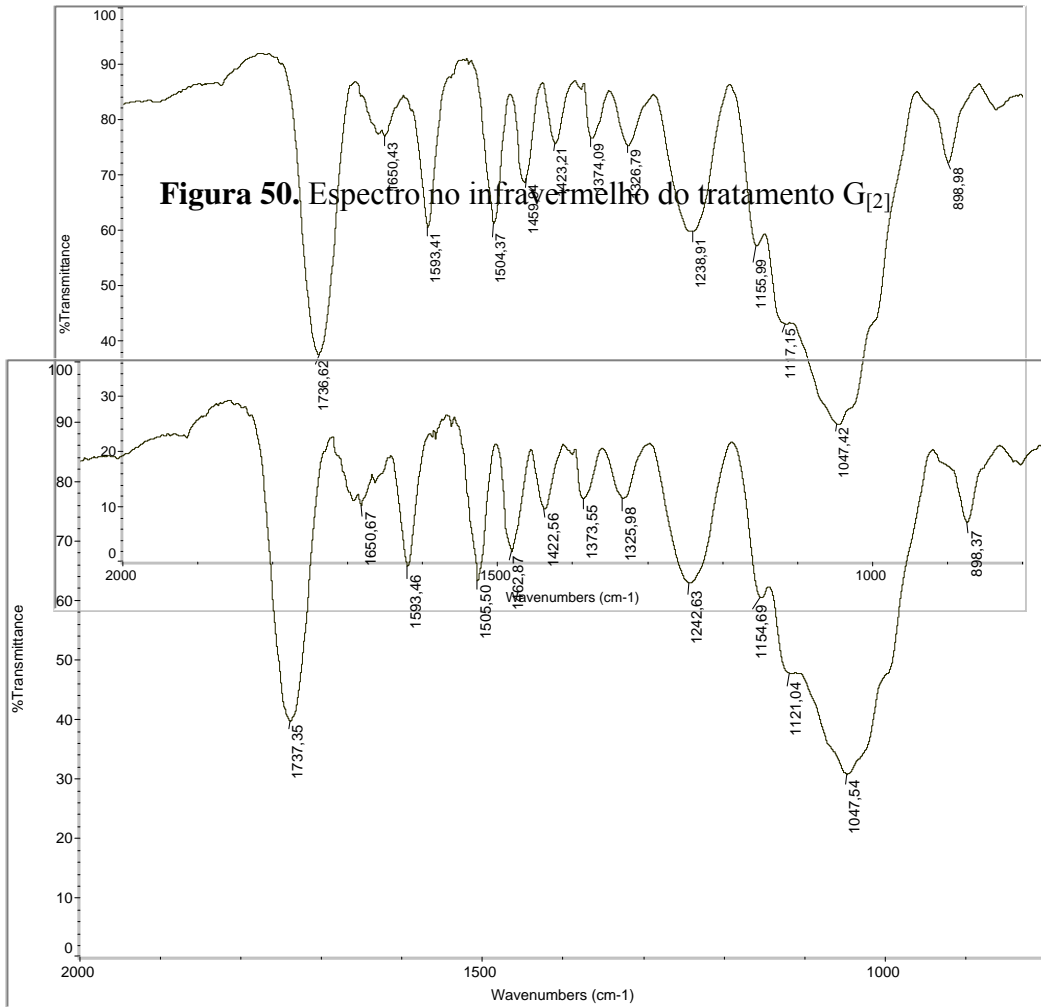


**Figura 48.** Lignina insolúvel (Klason) dos tratamentos (T, C<sub>[1]</sub> e C<sub>[2]</sub>)

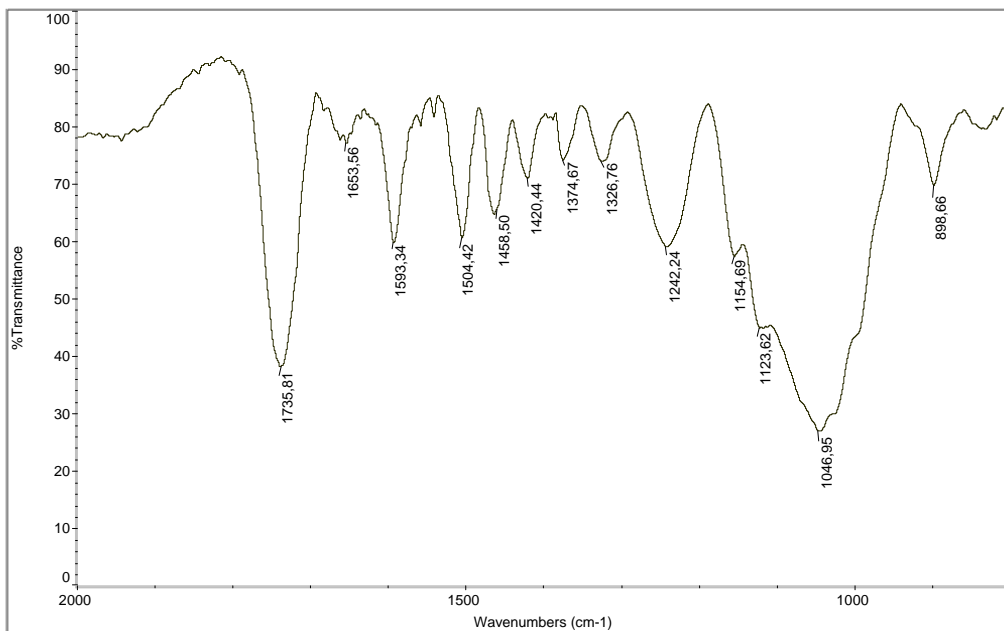
**Anexo IX – Espectros no infravermelho dos tratamentos (GA<sub>3</sub> e BAP)**



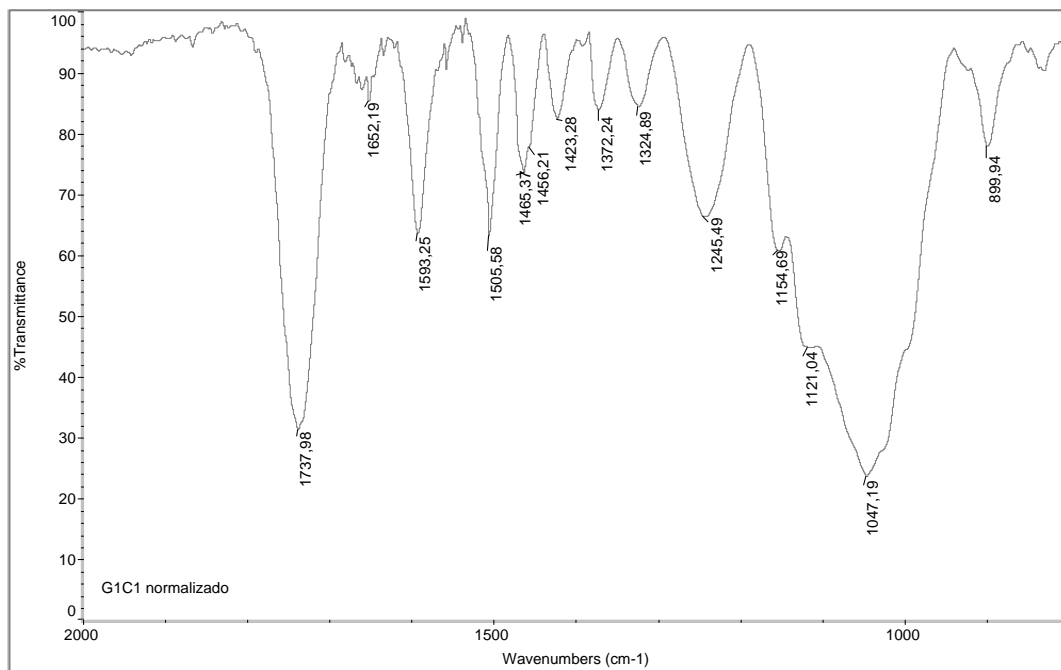
**Figura 49.** Espectro no infravermelho do tratamento G<sub>[1]</sub>



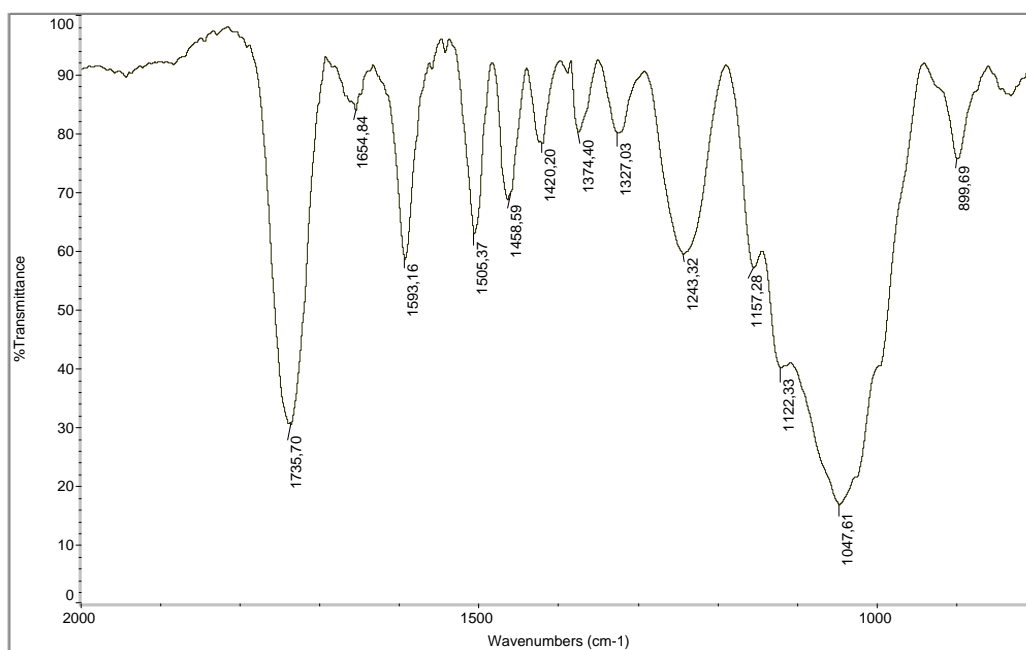
**Figura 51.** Espectro no infravermelho do tratamento C<sub>[1]</sub>



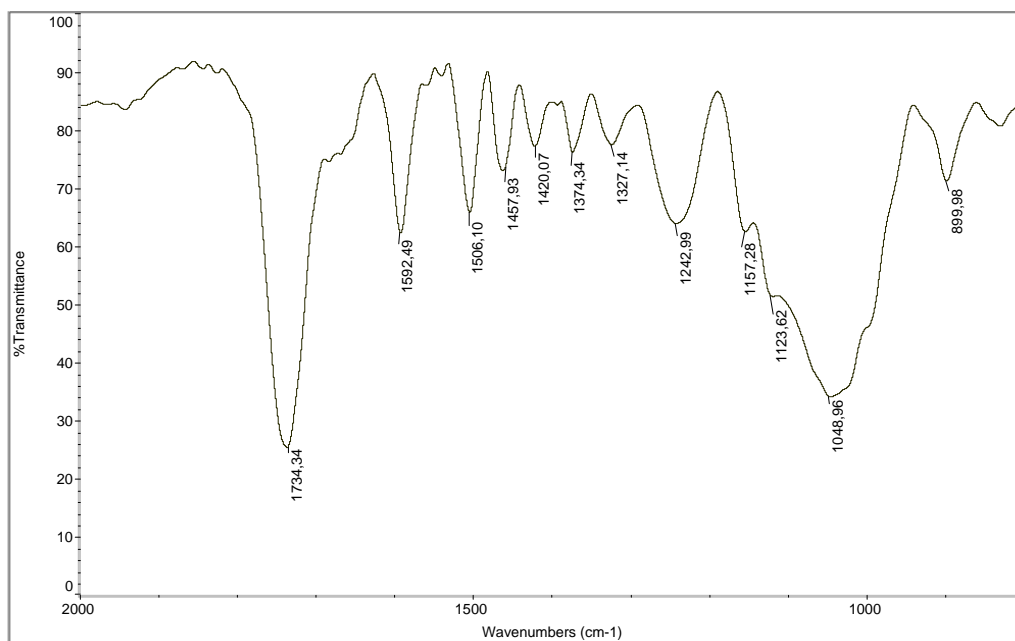
**Figura 52.** Espectro no infravermelho do tratamento C<sub>[2]</sub>



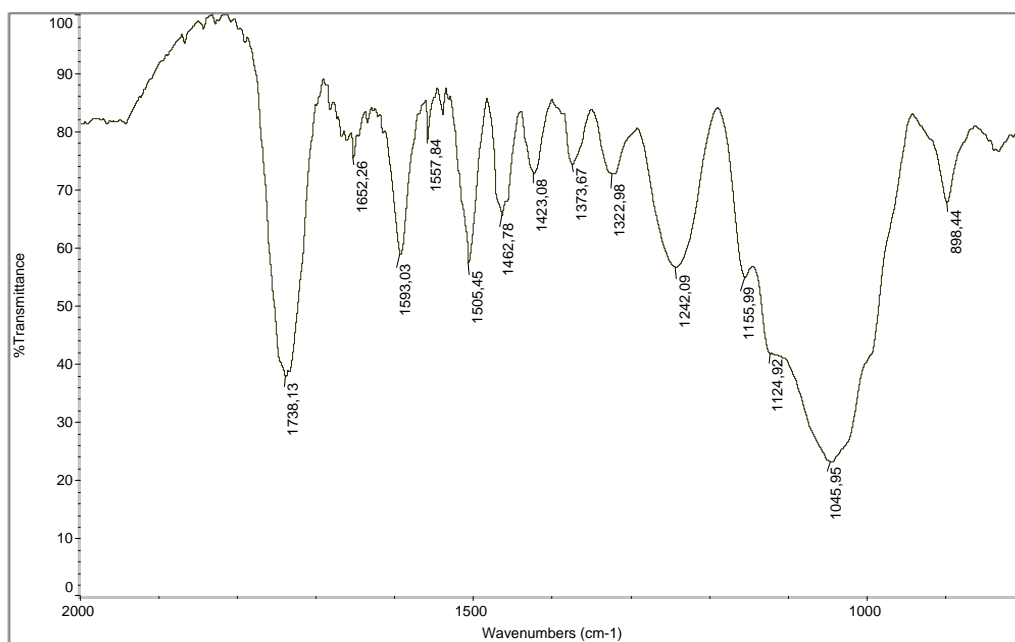
**Figura 53.** Espectro no infravermelho do tratamento G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub>



**Figura 54.** Espectro no infravermelho do tratamento  $G_{[1]}C_{[2]}$

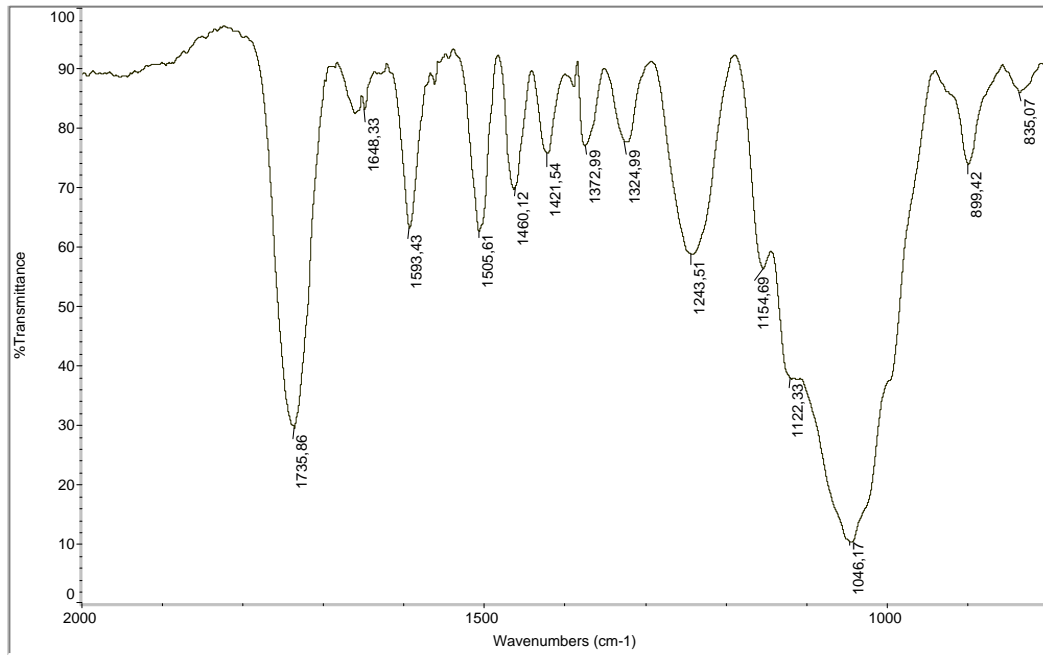


**Figura 55.** Espectro no infravermelho do tratamento  $G_{[2]}C_{[1]}$



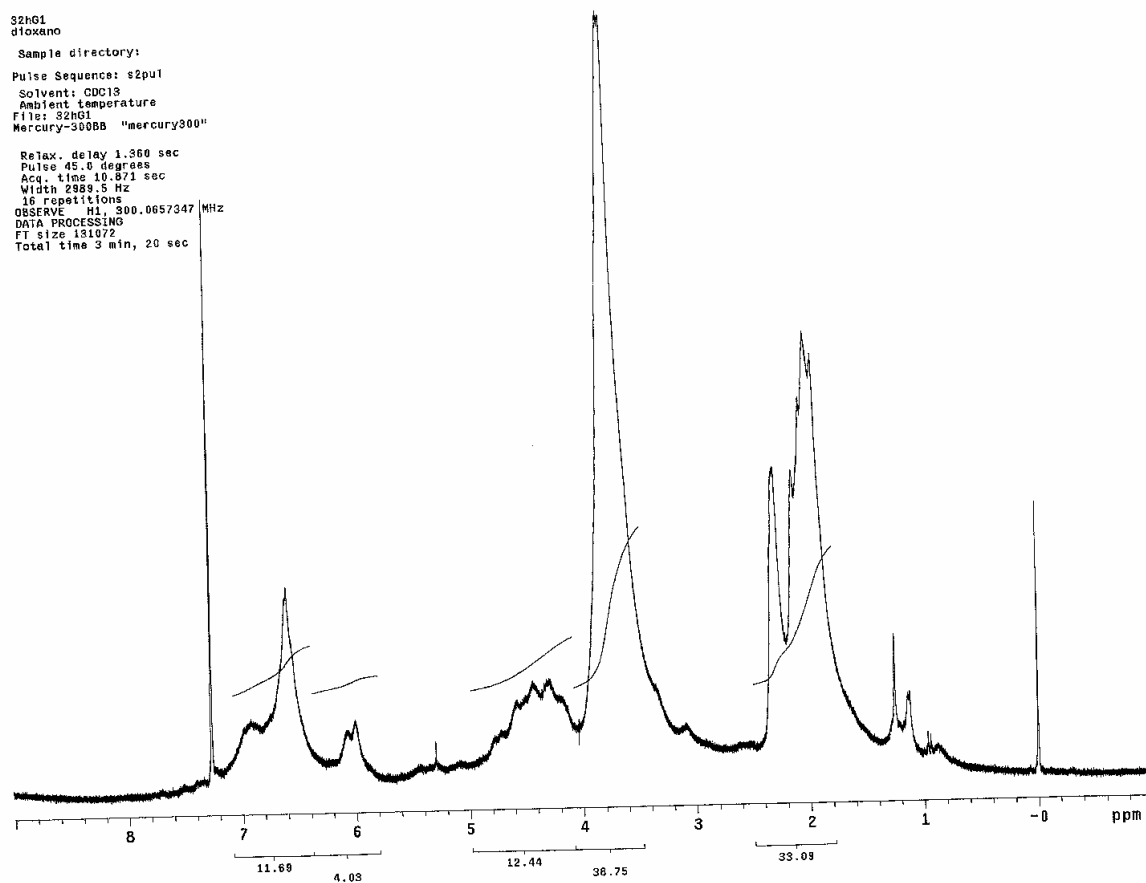
**Figura 56.** Espectro no infravermelho do tratamento  $G_{[2]}C_{[2]}$





**Figura 57.** Espectro no infravermelho do tratamento  $G_{[0]}C_{[0]}$  (Testemunha)

## Anexo X – Espectros $^1\text{H}$ RMN dos tratamentos ( $\text{GA}_3$ e BAP)



**Figura 58.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do tratamento  $G_{[1]}$

32h02  
dioxano  
Sample directory:  
Pulse Sequence: e2pu1  
Solvent: CDCl3  
Ambient temperature  
File: 32h02  
Mercury-300BB "mercury300"  
Relax. delay 1.360 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 10.871 sec  
Width 2989.5 Hz  
16 repetitions  
OBSERVE H1, 300.0057339 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 13172  
Total time 3 min, 20 sec

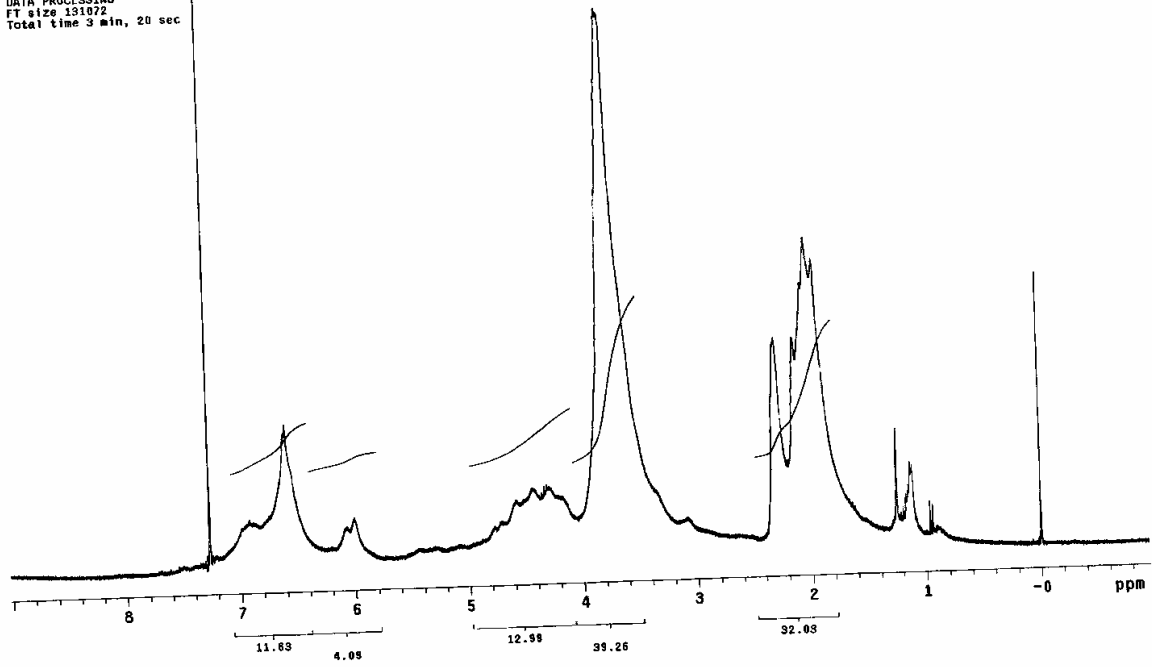


Figura 59. Espectro de <sup>1</sup>H RMN do tratamento G<sub>[2]</sub>

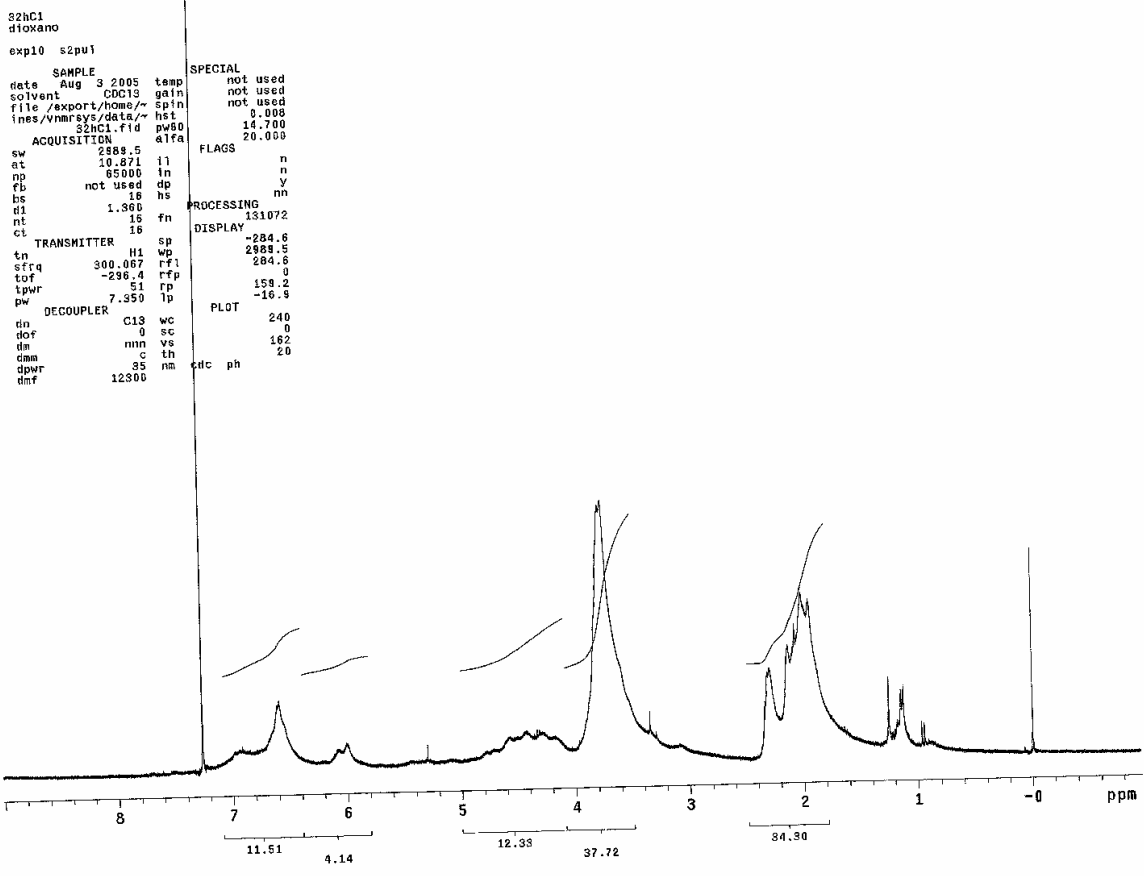


Figura 60. Espectro de <sup>1</sup>H RMN do tratamento C<sub>[1]</sub>

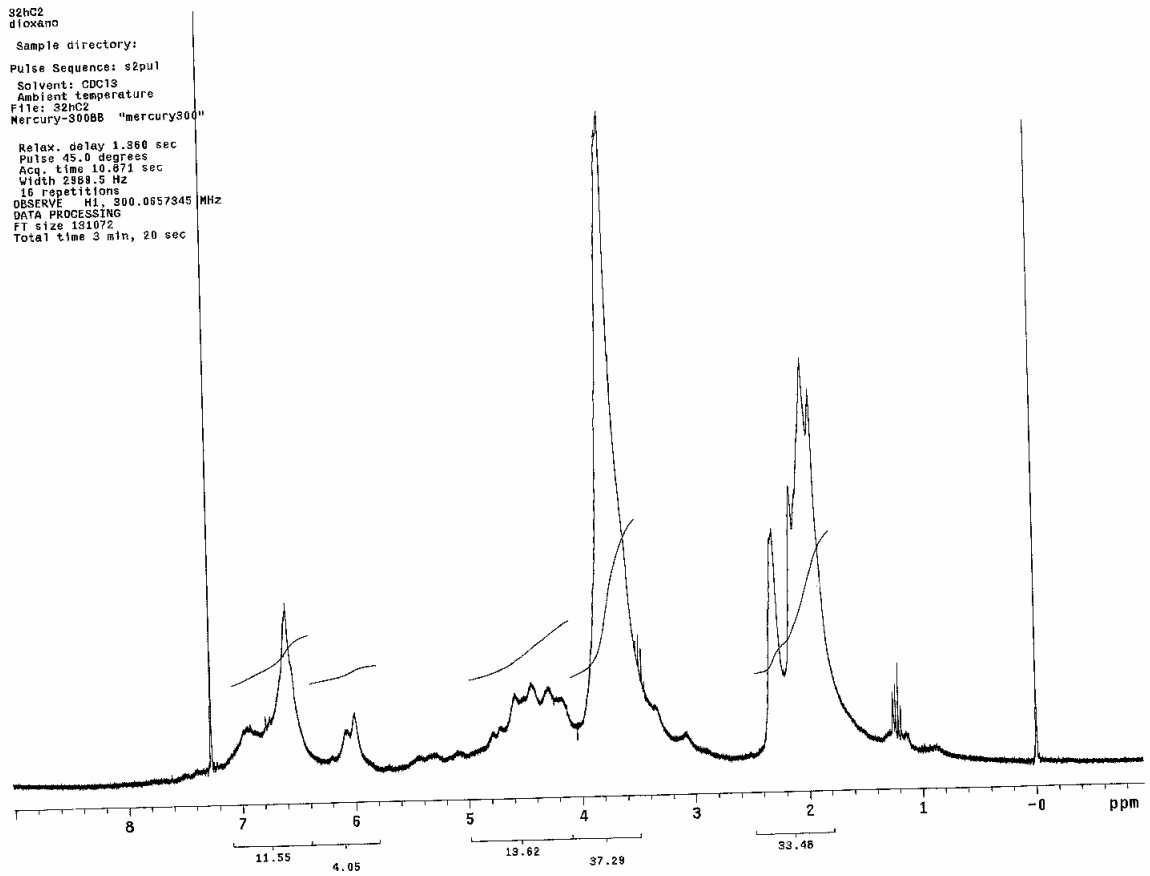
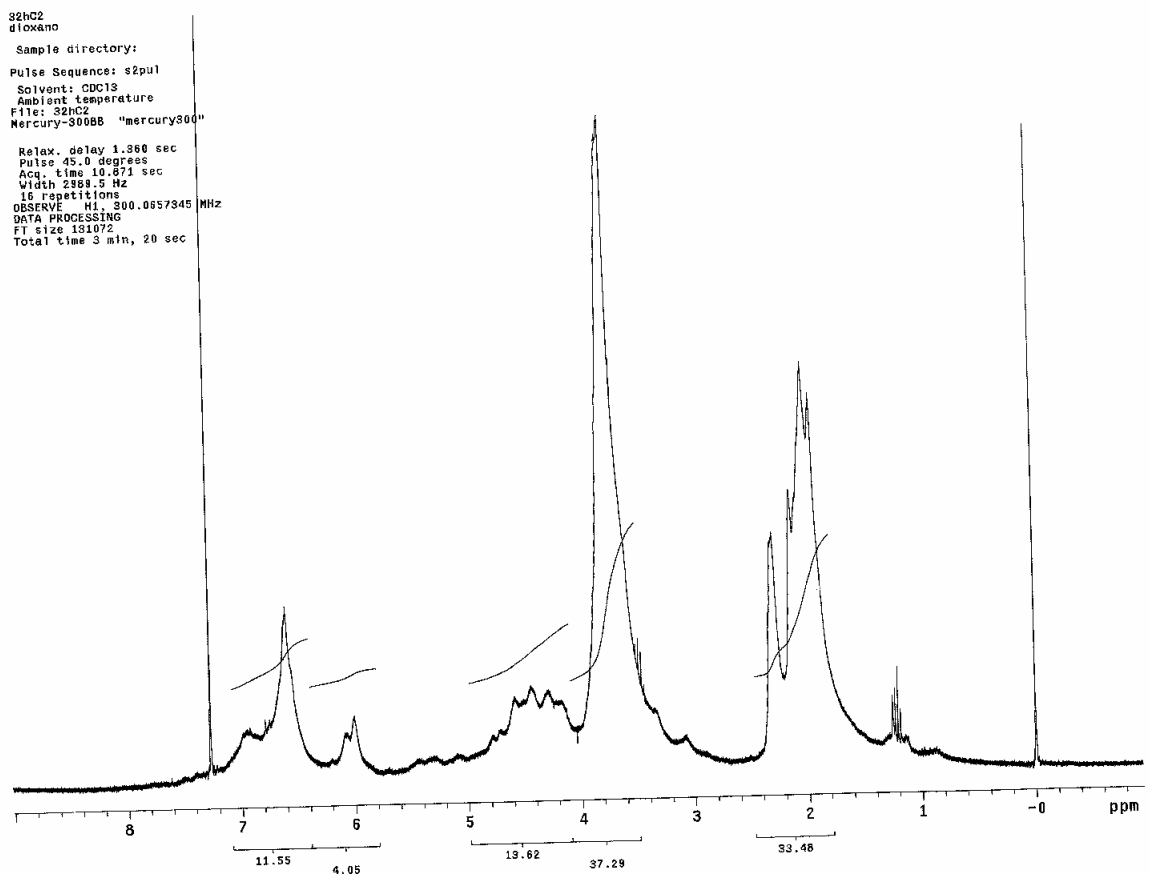


Figura 61. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do tratamento  $\text{C}_{[2]}$



32hG1C1  
dioxano  
Sample directory:  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDCl3  
Ambient Temperature  
File: 32hG1C1  
Mercury-300BB "mercury300"  
Relax. delay 1.360 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 10.871 sec  
Width 2389.5 Hz  
16 repetitions  
OBSERVE H1, 300.0657947 MHz  
DATA PROCESSING  
F1 size 131072  
Total time 3 min, 20 sec

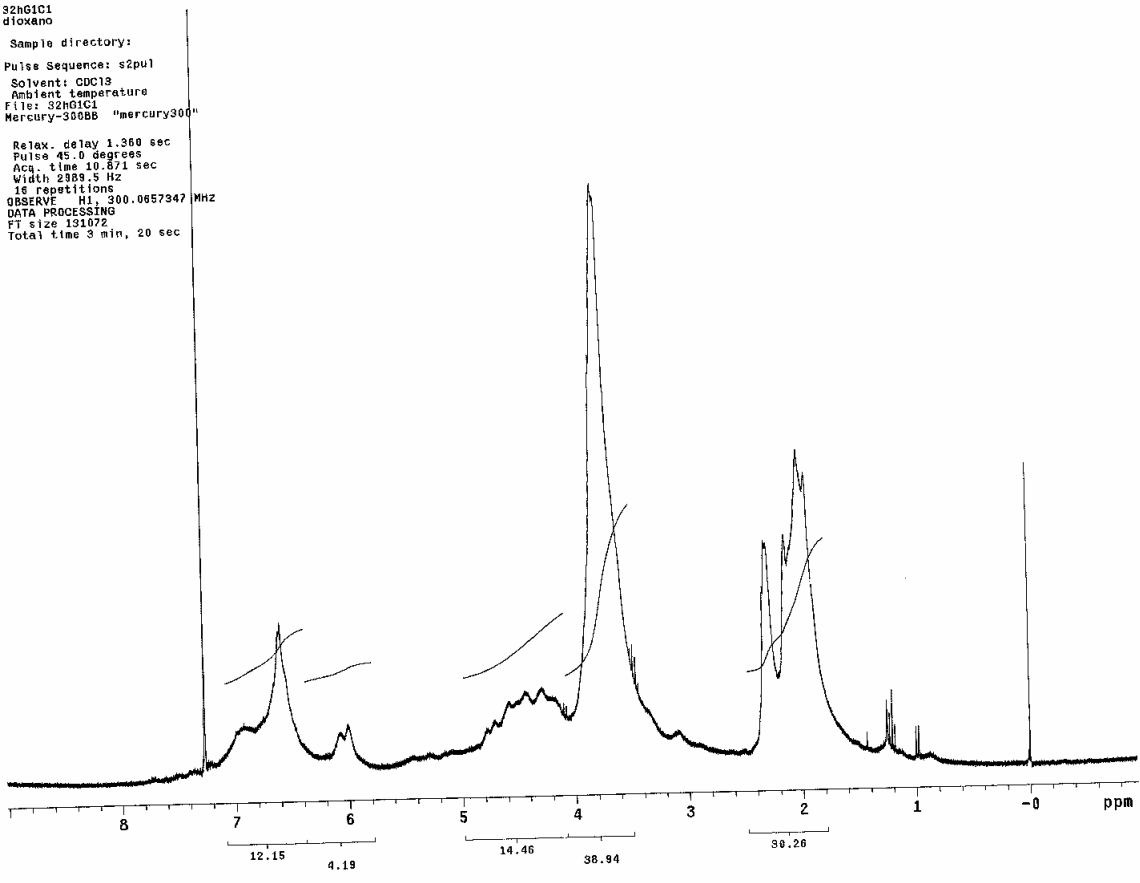


Figura 62. Espectro de <sup>1</sup>H RMN do tratamento G<sub>[1]</sub>C<sub>[1]</sub>

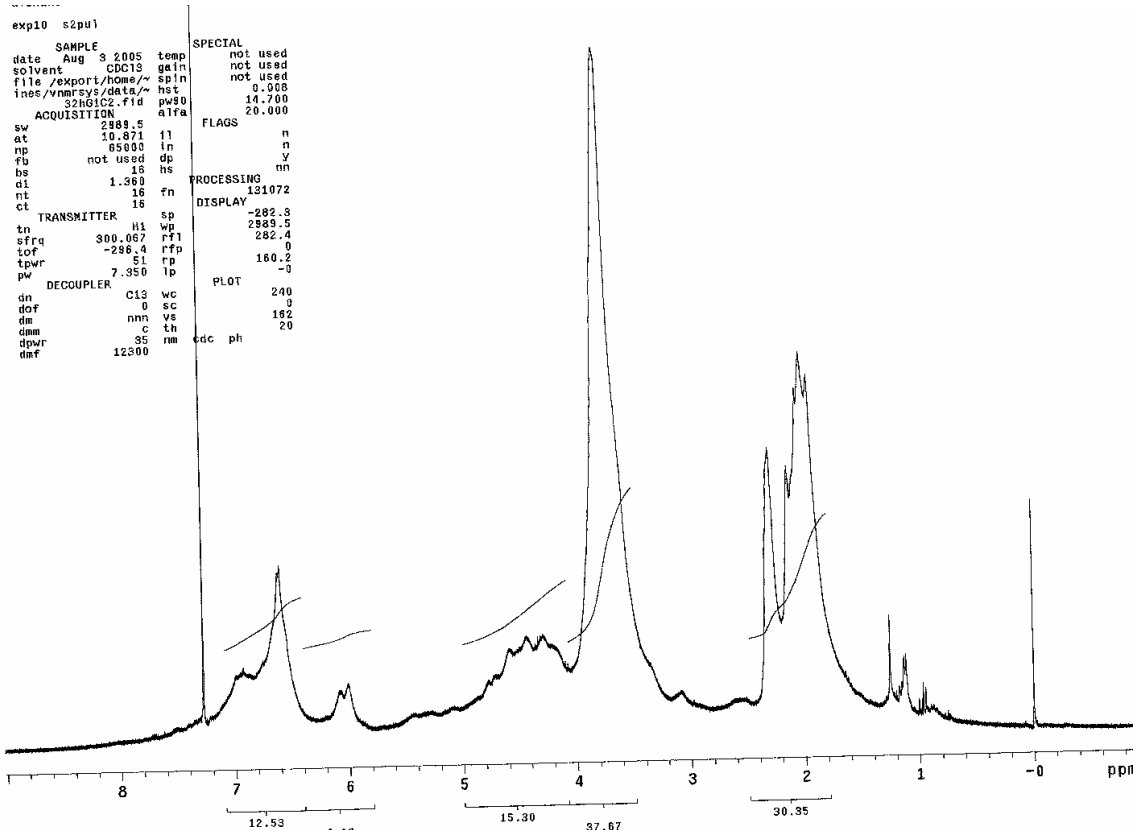


Figura 63. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do tratamento  $G_{[1]}C_{[2]}$

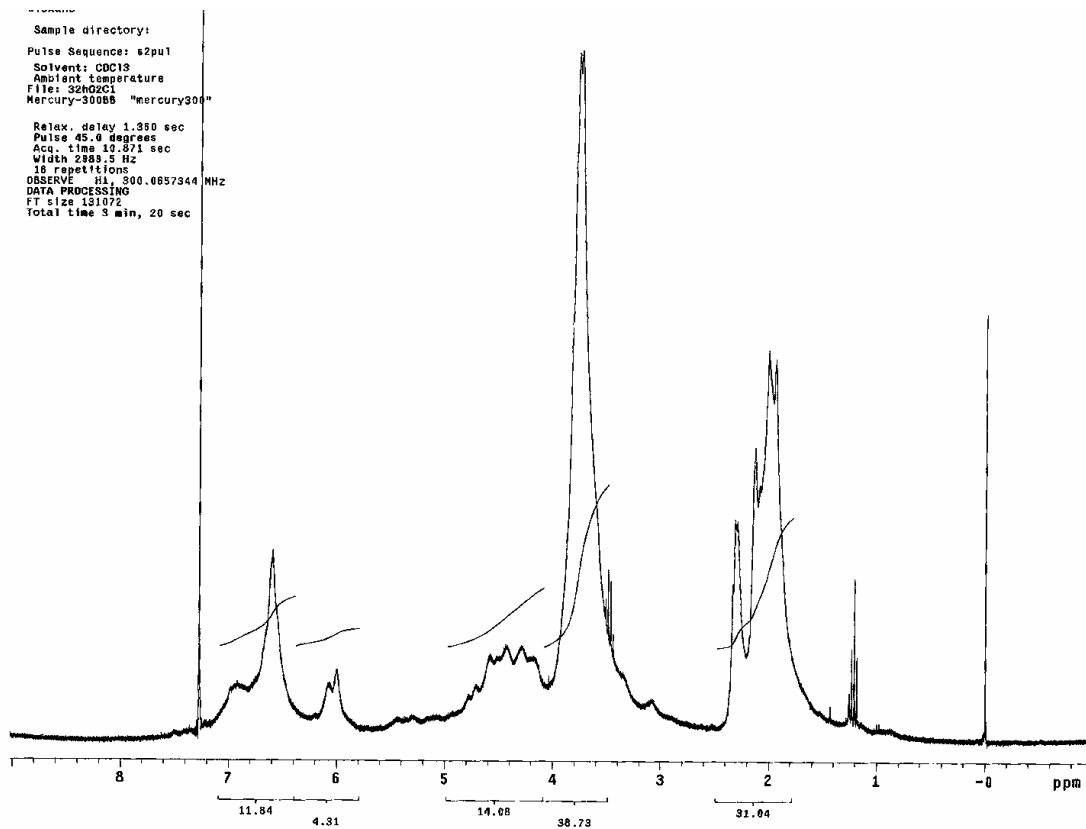


Figura 64. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do tratamento  $\text{G}_{[2]}\text{C}_{[1]}$



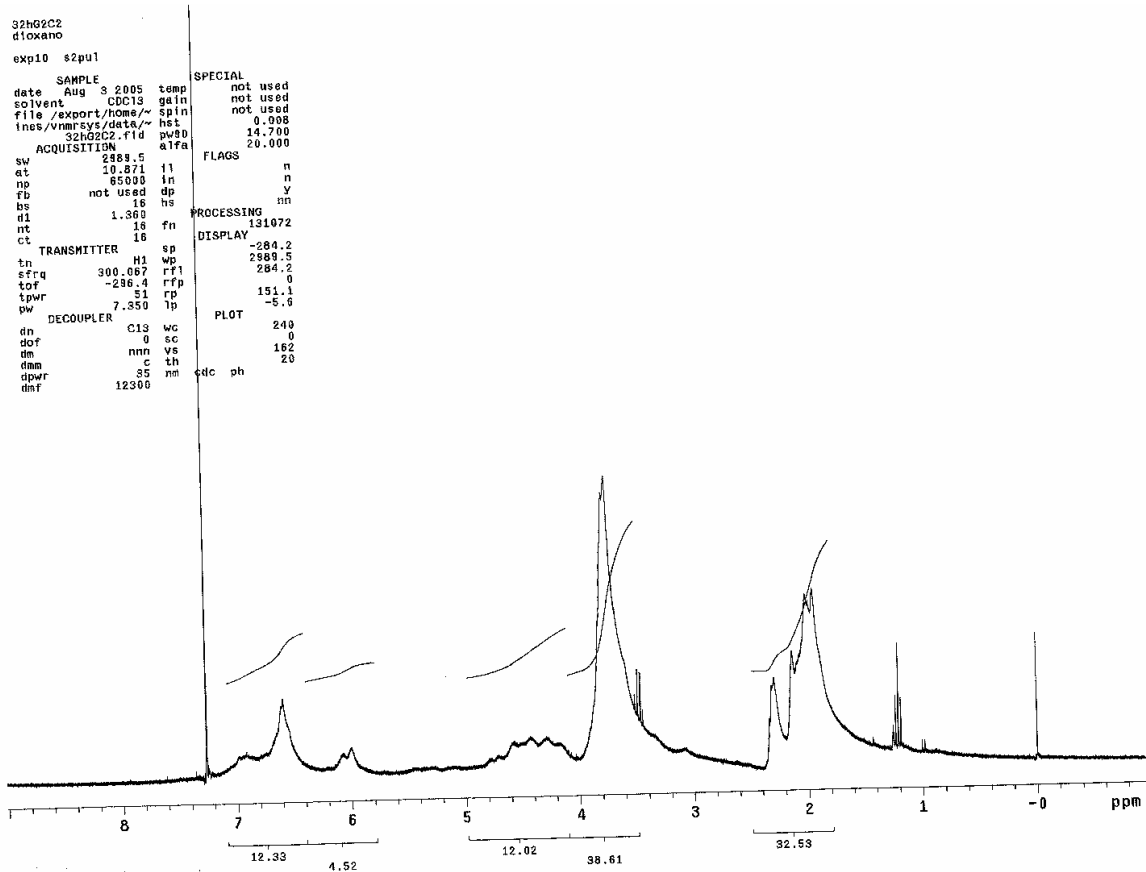


Figura 65. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do tratamento  $G_{[2]}C_{[2]}$

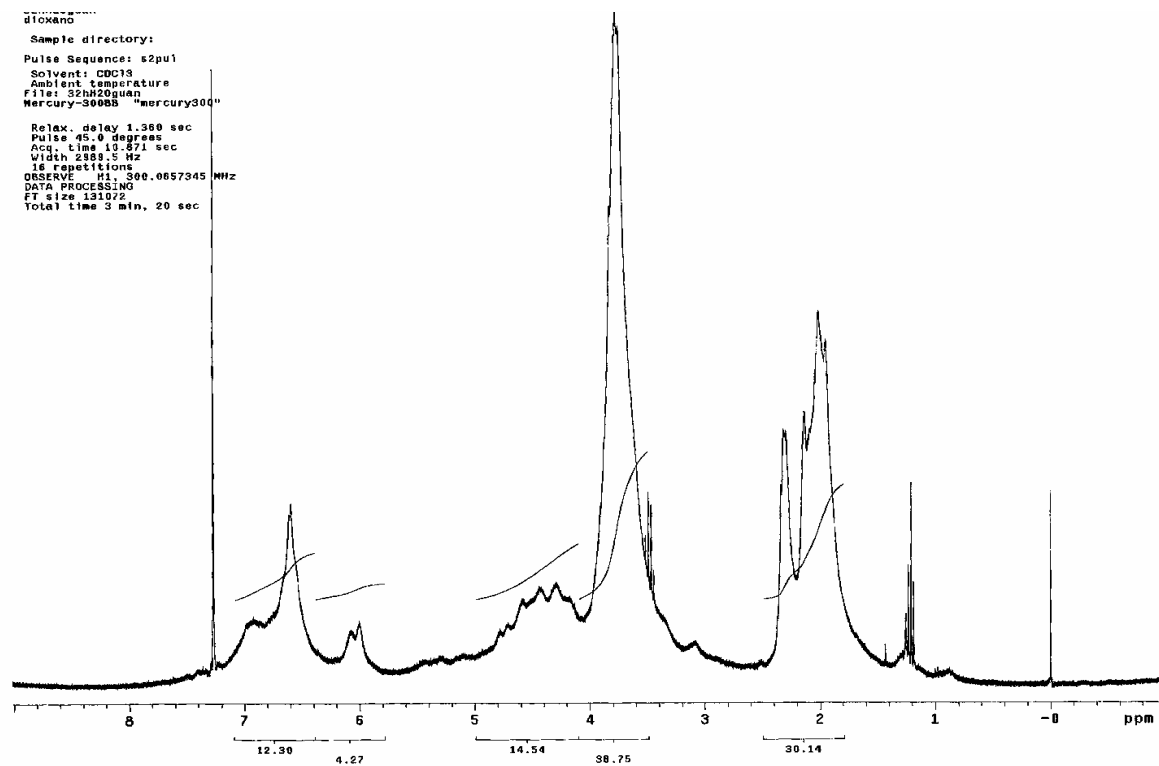


Figura 66. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do tratamento  $G_{[0]}C_{[0]}$  (Testemunha)