

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Fernanda Kokowicz Pilatti

**CRESCIMENTO, PERFIL METABÓLICO E CITOQUÍMICA DE  
CALOS DE *Cedrela fissilis* VELLOZO (MELIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Viana

**FLORIANÓPOLIS**

**2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

P637c Pilatti, Fernanda Kokowicz

Crescimento, perfil metabólico e citoquímica de calos de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae) [dissertação] / Fernanda Kokowicz Pilatti ; orientadora, Ana Maria Viana. - Florianópolis, SC, 2011.

116 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Meliacea - Cultura e meios de cultura. 3. Cedrela. 4. Espectroscopia de infravermelho. 5. Citoquímica. I. Viana, Ana Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23


**“CRESCIMENTO, PERFIL METABÓLICO E CITOQUÍMICA DE CALOS DE *CEDRELA FISSILIS* VELLOZO (MELIACEAE)”.**

POR

**FERNANDA KOKOWICZ PILATTI**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Orientador:



\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Ana Maria Viana**  
BOT/CCB/UFSC

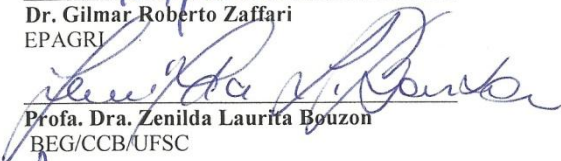
Comissão Examinadora:



\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marcelo Maraschin**  
FIT/CCA/UFSC



\_\_\_\_\_  
**Dr. Gilmar Roberto Zaffari**  
EPAGRI



\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Zenilda Laurita Bouzon**  
BEG/CCB/UFSC



\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr.ª. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC**  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC  
Florianópolis, Abril de 2011.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria Viana, pela orientação durante o Mestrado, pelos ensinamentos e por sua dedicação e paciência.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin e à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Zenilda Bouzon, pela orientação nos experimentos de fito e histoquímica, que muito enriqueceram este trabalho e me deram a oportunidade de gostar ainda mais desta pesquisa.

Às equipes do Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR) e do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), por me acolherem e darem todo o apoio necessário para a realização dos meus experimentos.

Ao MSc. Éder Schmidt, por toda a atenção e apoio que me deu na parte de histoquímica.

À Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Ramlov, pela ajuda com as análises de metabólitos secundários e pela ideias trocadas, que foram fundamentais para compreender e discutir meus resultados.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal: Eduardo, Maini e, especialmente à Cristine. Assim como diz o ditado popular “uma andorinha só não faz o verão”, o trabalho em equipe nos permite trocar experiência, aprender juntos e torna os desafios mais fáceis de serem superados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de cursar o Mestrado.

À Joice Ferrari da Costa, secretária do PPGBiotec, por toda a atenção e ajuda prestadas durante o curso.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realizar este trabalho, e à CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao Laboratório de Microscopia de Fluorescência do BEG, por disponibilizar os equipamentos para as análises de histoquímica, e à técnica Chirle Ferreira, por sua ajuda e atenção.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Edna Regina Amante, por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças para a realização das análises de espectrofotometria.

Aos meus pais, por sempre apoiarem minhas escolhas e por acreditarem nelas, por me darem força quando preciso (e pelos puxões de orelha também). Obrigada por todo o amor que vocês me dão.

À minha família (vô Pedro, vó Suely, Adri, Gleci, André, Gui, Mariana), por todo o carinho e incentivo.

Aos amigos: Paulinha, Mirian, Fê, Angi, Andréia, Angela, Aline P., Paulo, Aline F., Vinícius, Thaís, turma de Meio Ambiente do IFSC, turma do Pa-kua: obrigada pelo companheirismo, pela força e pelo carinho.

Li certa vez que Deus coloca as pedras em nosso caminho, mas sempre nos dá as ferramentas necessárias para movê-las. Assim, agradeço a Deus pelos desafios que me impôs, pela força que me deu para vencê-los, pela oportunidade de aprender com eles e pelas pessoas maravilhosas que colocou ao meu lado para me ajudar nesta jornada.

**“How does one become a butterfly?’ she asked. ‘You must want to fly so much that you are willing to give up being a caterpillar.’”  
(Trina Paulus)**

## RESUMO

*Cedrela fissilis* Velloso (Meliaceae) é uma árvore nativa da Floresta Atlântica (Sul do Brasil) de grande interesse econômico devido à sua madeira de qualidade e seu crescimento rápido, ideal para programas de reflorestamento e arborização de espaços urbanos. Assim como as demais espécies da Família Meliaceae, seu metabolismo secundário é caracterizado pela produção de terpenos, que tem despertado grande interesse industrial e medicinal pelas suas atividades inseticida, anti-tumoral, antibiótica, anti-viral, anti-fúngica e anti-malárica. No entanto, as áreas de Floresta Atlântica têm sido suprimidas pela expansão das cidades e da agropecuária no Brasil, colocando em risco toda a biodiversidade deste ecossistema e tornando inviável a exploração sustentável de seus recursos. A cultura vegetal *in vitro*, através de técnicas de cultura de calos e suspensões celulares, é uma alternativa viável que permite a produção de compostos vegetais de interesse econômico sem que haja a necessidade da exploração dos recursos vegetais *in loco*, permitindo a conservação das florestas. Assim, este trabalho teve como objetivos estudar o efeito de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento, o perfil metabólico e a histologia de calos de *C. fissilis*. O regulador de crescimento 2,4-D promoveu o crescimento de calos a partir de segmentos nodais cotiledonares e de hipocótilo com uma frequência entre 53,8 – 97,1%, porém demonstrou ser tóxico para segmentos foliares e cotiledonares. Os meios de cultura contendo glicose ou frutose promoveram melhor indução de calos do que os meios de cultura suplementado com sacarose. Calos crescidos na presença de glicose ou frutose formaram maior massa fresca e possuíam elevados teores de água. No entanto, calos crescidos em meio de cultura contendo sacarose formaram maior quantidade de massa seca. Diferentes combinações de BAP e ANA foram testadas e todas apresentaram elevados índices de crescimento de calos na presença de glicose ou frutose no meio de cultura. No meio de cultura contendo sacarose, a calogênese variou entre 48,3 – 86,7%, sendo que a combinação de 5  $\mu\text{M}$  de BAP com 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA apresentou a maior taxa de calogênese. Foi observado que a posição do explante interfere na calogênese, e os segmentos nodais cotiledonares inoculados na posição vertical apresentaram maior frequência de calogênese (86,7%) do que os explantes inoculados na posição horizontal (63,3%). Segmentos nodais cotiledonares, segmentos apicais e segmentos de hipocótilo formaram

calos em maior frequência e com maior massa fresca e seca. Segmentos de raízes formaram calos com menor massa seca, e segmentos foliares e cotiledonares formaram elevadas taxas de calos com raízes e com menor massa seca. O cultivo dos calos no escuro aumentou a frequência de calogênese em todos os tipos de explantes, mas provocou uma redução de massa seca. O aumento da concentração de glicose, frutose e sacarose no meio de cultura e do período de cultivo dos calos resultaram em maiores quantidades de massa fresca e seca. A adição de glutamina ao meio de cultura teve efeito inibitório sobre a indução e o crescimento dos calos. Sete formulações salinas de meio de cultura foram testadas, mas apenas no meio de cultura MS foi observada a calogênese. As curvas de dissimilação demonstraram que o crescimento dos calos na presença de frutose ocorre de maneira mais rápida e atinge o estágio estacionário antes dos calos crescidos em meio de cultura contendo glicose ou sacarose, e que a adição de glutamina ao meio de cultura, indiferentemente do açúcar utilizado, aumenta a fase *lag* e reduz o crescimento dos calos. A análise de varredura em UV-vis apontou a presença de compostos fenólicos, clorofilas e carotenóides nos calos e permitiu comparar a ocorrência destes metabólitos entre diferentes tratamentos. A dosagem de metabólitos secundários demonstrou que os calos crescidos em meio de cultura contendo frutose possuíam o maior teor de clorofila (116 µg/g MF), e que os calos crescidos em meio de cultura contendo sacarose e glutamina possuíam o maior conteúdo de compostos fenólicos totais (17,9 µg/g MS) e de flavonóides (2,89 µg/g). A espectroscopia por FTIR permitiu comparar o perfil metabólico primário e secundário de calos crescidos em diferentes condições de cultivo, evidenciando diferenças quali-quantitativas a nível molecular que podem ajudar a caracterizar os diferentes tratamentos avaliados. Na análise histoquímica de diferentes morfologias de calos foi possível observar que as células possuem grandes vacúolos e que ocorre a formação de arranjos concêntricos de células que caracterizam o início da formação de órgãos. A coloração com PAS reagiu com os carboidratos neutros da parede celular e com os grânulos de amido no citoplasma das células, presentes em grande quantidade nos calos com morfologia nodular. A coloração de AT-O teve apenas uma leve reação metacromática na parede celular das células, indicando pouca ocorrência de açúcares ácidos. A coloração de CBB tingiu de maneira uniforme o citoplasma das células devido à presença de proteínas livres e em organelas e destacou a presença de alguns grânulos protéicos. A calogênese é influenciada pela composição do meio de cultura, condições ambientais de cultivo e por fatores endógenos, como o



balanço hormonal de cada tecido e o genótipo da planta doadora dos explantes. As curvas de dissimilação, a análise de metabólitos primários e secundários através de espectroscopia de UV-vis e FTIR e o conhecimento da organização celular através da histoquímica fornecem suporte para a otimização das culturas de calos e para a identificação e seleção de culturas com potencial para a produção de compostos de interesse.

## SUMMARY

*Cedrela fissilis* Velloso (Meliaceae) is a fast growing timber tree from Atlantic Forest (South Brazil) which has great economic value due to its high quality wood and its uses in reforestation programs and landscaping of urban areas. As other Meliaceae species, its secondary metabolism is characterized by the production of terpenes of industrial and medicinal interests for its insecticidal, anti-tumor, antibiotic, anti-viral, anti-fungal e anti-malarial activities. However, Atlantic Forest areas have been suppressed by urban and agriculture expansion, which endangers the biodiversity of this ecosystem and make unfeasible the sustainable exploitation of natural resources. In vitro plant tissue cultures, through the use of callus and cell suspension cultures, is a practicable alternative that allows the production of plant compounds of economic interest without the need of plant resources in loco, allowing forests conservation. This work aimed the study the effects of different culture conditions on growth, metabolic profile and histology of *C. fissilis* callus cultures. The plant growth regulator 2,4-D promoted callus growth from cotyledonary nodal segments and hypocotil segments with a frequency between 53,8 – 97,1%, but showed to be toxic to cotyledon and leaf segments. Culture media containing glucose or fructose promoted higher callus formation than culture medium containing sucrose. Callus growth in the presence of glucose or fructose formed superior fresh weight and had higher water content. In the other hand, callus growth on culture media containing sucrose formed higher dry matter. Different combinations of BAP and ANA were tested and all of them promoted callus growth in culture media containing glucose or fructose. In the presence of sucrose, callus formation ranged between 48,3 – 86,7%, and the combination of BAP 5  $\mu$ M with ANA 2,5  $\mu$ M induced the best calogenesis frequency. The explant position interfered on callus formation, and the cotyledonary nodal segments inoculated in the vertical position promoted higher callus induction (86,7%) than those inoculated in the horizontal position (63,3%) but no differences on callus growth were observed. Cotyledonary nodal segments, apical segments and hypocotil segments formed callus in a higher frequency and with major fresh and dry matter. Callus from root segments formed less dry matter, and cotyledon and leaf segments formed callus and roots. The increase of sugar concentration in the culture medium and of the culture period promoted the increase in fresh and dry matter. The addition of glutamine to the culture media inhibited callus induction and

growth. Seven culture media formulas were tested, but callus formation occurred only in the MS culture medium. Dissimilation curves showed that callus growth is faster in culture medium containing fructose, but cultures reach stationary period earlier. The addition of glutamine to the culture media increased the lag phase and reduced callus growth. The UV-vis screen showed the presence of phenolic compounds, chlorophyll and carotenoids in callus cells and allowed the comparison of these metabolites between calluses from different treatments. The secondary metabolites quantification showed that callus grown in the presence of fructose had the higher chlorophyll content (116  $\mu\text{g/g}$  FM), whilst callus growth in the presence of sucrose and glutamine had higher phenolic compounds (17,9  $\mu\text{g/g}$  DM) and flavonoids content (2,89  $\mu\text{g/g}$ ). FTIR spectroscopy allowed the comparison between primary and secondary metabolic profile of calluses grown under different culture conditions and showed qualitative and quantitative differences. The histochemical analysis of different callus morphologies showed cells containing large vacuoles and concentrically cells arrangements that characterizes first stages of organ formation. PAS staining has reacted with neutral carbohydrates of cell walls and starch grains in cells cytoplasm, which were numerous in nodular callus morphology. TB-O staining had a weak metachromatic reaction with cell walls, indicating that acid carbohydrates occurs in low quantity in callus cells. CBB staining reacted with cytoplasm proteins and organelles and with few protein grains. Callus inductions and growth are determined by culture medium composition, environmental conditions and endogenous factors, such as hormonal balance and genotype. Dissimilation curves, primary and secondary metabolites analysis through UV-vis and FTIR spectroscopy, and the study of callus cell organization by histochemistry provided the background for further studies on callus culture optimization and for identification and selection of cultures with potential to produce compounds of economic interest.

## LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	– Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	– Ácido indolilacético
ANA	– Ácido $\alpha$ -naftalenoacético
AR	– Meio de cultura Anderson's Rhododendron
AT-O	– Azul de Toluidina
BAP	– 6-Benzilaminopurina
CBB	– Azul Brilhante de Coomassie
CG-EM	– Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massa
CIN	– Cinetina (6-furfurilaminopurina)
DAP	– Diâmetro à altura do peito
DMSO	– Dimetilsulfóxido
FT- IR	– Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
MS	– Meio de cultura Murashige & Skoog
PAS	– Ácido Periódico de Schiff
PIC	– Picloram (ácido 4-amino 3,5,6 triclora-2-piridinacarboxílico)
PVP	– Polivinilpirrolidona
SH	– Meio de cultura Schenk & Hildebrandt
TDZ	– Thidiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-thiadiazol-5-feniluréia)
UV-vis	– Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível
W	– Meio de cultura White
WPM	– Meio de cultura Woody Plant Medium

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	3
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	3
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1.	DESCRIÇÃO E ECOLOGIA DA ESPÉCIE .....	4
3.2.	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA, MEDICINAL E INDUSTRIAL .....	6
3.3.	CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS <i>IN VITRO</i> .....	9
3.4.	CONCEITO DE CALO .....	11
3.5.	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA FITOQUÍMICA .....	12
3.6.	BIOTECNOLOGIA VEGETAL E PROGRAMAS DE CONSERVAÇÃO .....	13
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
4.1.	MATERIAL VEGETAL .....	15
4.2.	DESINFECÇÃO DAS SEMENTES .....	15
4.3.	PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA .....	15
4.4.	ESTABELECIMENTO DE PLÂNTULAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS .....	16
4.5.	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CALOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA .....	16
<b>4.5.1.</b>	<b>Efeito de diferentes fontes de carbono e do tempo de cultivo sobre o crescimento de calos</b> .....	16
<b>4.5.2.</b>	<b>Efeito de diferentes fontes de carbono e da glutamina sobre o crescimento de calos</b> .....	17
<b>4.5.3.</b>	<b>Efeito de formulações salinas de meio de cultura, diferentes fontes de carbono e diferentes concentrações de glutamina sobre o crescimento de calos</b> .....	18
<b>4.5.4.</b>	<b>Efeito da posição do explante sobre o crescimento de calos</b> .....	18

4.5.5.	<b>Efeito do tipo de explante, fontes de carbono e da presença e da ausência de luz sobre o crescimento de calos</b> .....	19
4.5.6.	<b>Efeito de BAP em combinação com ANA sobre o crescimento de calos</b> .....	19
4.5.7.	<b>Efeito de 2,4-D e do tipo de explante sobre o crescimento de calos</b> .....	20
4.5.8.	<b>Determinação da massa seca e do teor de água dos calos</b> .....	20
4.6.	DISSIMILAÇÃO DE AÇÚCAR DO MEIO DE CULTURA DURANTE O CRESCIMENTO DOS CALOS .....	21
4.7.	ANÁLISE DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS EM CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....	21
4.7.1.	<b>Perfil metabólico por espectrofotometria de varredura UV-Vis e espectroscopia de infravermelho</b> .....	21
4.7.2.	<b>Dosagem de clorofila, fenólicos totais e flavonóides</b> .....	22
4.7.2.1.	Dosagem de clorofila .....	22
4.7.2.2.	Dosagem de fenólicos totais e flavonóides .....	23
4.8.	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DOS CALOS .....	24
4.8.1.	<b>Preparação das amostras</b> .....	24
4.8.2.	<b>Histoquímica</b> .....	25
4.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	26
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	27
5.1.	OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CALOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA .....	27
5.1.1.	<b>Efeito de reguladores de crescimento sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	27
5.1.1.1.	Efeito de 2,4-D e do tipo de explante sobre o crescimento de calos .....	27
5.1.1.2.	Efeito de BAP em combinação com ANA sobre o crescimento de calos .....	29
5.1.2.	<b>Efeito da posição do explante sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	34

5.1.3.	<b>Efeito do tipo de explante, fontes de carbono e da presença e da ausência de luz sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	35
5.1.4.	<b>Efeito de diferentes fontes de carbono e do tempode cultivo sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	45
5.1.5.	<b>Efeito de diferentes fontes de carbono e da glutamina sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	51
5.1.6.	<b>Efeito de formulações salinas de meio de cultura, diferentes fontes de carbono e diferentes concentrações de glutamina sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	57
5.2.	<b>DISSIMILAÇÃO DO AÇÚCAR DO MEIO DE CULTURA DURANTE O CRESCIMENTO DOS CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	60
5.3.	<b>ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO EM CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	67
5.3.1.	<b>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	67
5.3.2.	<b>Espectrofotometria de UV-Vis</b> .....	69
5.3.3.	<b>Dosagem de clorofila, fenólicos totais e flavonóides em calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	71
5.4.	<b>CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA</b> .....	73
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	80
6.1.	<b>OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CALOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA</b> .....	80
6.1.1.	<b>Efeito dos reguladores de crescimento sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	80
6.1.2.	<b>Efeito da posição do explante sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	85
6.1.3.	<b>Efeito do tipo de explante e da presença ou ausência de luz sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	87

<b>6.1.4.</b>	<b>Efeito das fontes de carbono, da glutamina e da formulação salina do meio de cultura sobre o crescimento de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....</b>	<b>89</b>
<b>6.2.</b>	<b>DISSIMILAÇÃO DE AÇÚCARES E ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO DE CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....</b>	<b>93</b>
<b>6.3.</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....</b>	<b>100</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>104</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A Família Meliaceae apresenta distribuição pantropical e inclui cerca de 50 gêneros e 600 espécies. No Brasil, ocorrem seis gêneros e cerca de 100 espécies. Destaca-se pelo seu valor econômico, medicinal, ecológico e por suas potencialidades de exploração biotecnológica. Do ponto de vista econômico, merecem destaque algumas espécies que produzem madeira de boa qualidade, como o mogno (*Swietenia macrophylla*) e o cedro-branco (*Cedrela fissilis*). Algumas espécies são cultivadas como ornamentais, como a aglaia (*Aglaia odorata*) e a árvore-de-Santa-Bárbara (*Melia azedarach*). Outros gêneros de grande importância são *Cabralea*, *Carapa*, *Guarea* e *Trichilia* (SOUZA & LORENZI, 2005). Por ocorrer predominantemente nas Florestas Tropicais, as espécies desta Família estão sob forte pressão ambiental devido à excessiva exploração madeireira e à destruição de suas áreas naturais de dispersão, sofrendo severa erosão genética, sendo que o mogno (*S. macrophylla*) já aparece na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (LAUDANO, 2005; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008).

Quimicamente, a Família Meliaceae é caracterizada pela produção de limonóides, uma classe de triterpenos que possui atividade inseticida amplamente estudada, além de atividades anti-tumoral, antibiótica, anti-viral, anti-fúngica e anti-malária. Estudos de caracterização química e atividade biológica de compostos secundários das meliáceas, obtidos a partir de extratos de partes das plantas, tais como folhas, casca, raízes e frutos, são facilmente encontrados na literatura e comprovam o grande interesse que a medicina e a indústria têm nessas substâncias (De PAULA *et al.*, 1996; JIMENES *et al.*, 1997; CÉSPEDES *et al.*, 1999; LUO *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2000; CÉSPEDES *et al.*, 2001; LAGO *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2005; AMBROZIN *et al.*, 2006; EASON & SETZER, 2007; GIANOTTI *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2010).

As florestas brasileiras são fontes de óleos essenciais e inúmeros compostos biologicamente ativos que são úteis para a indústria farmacêutica. Porém, o potencial uso medicinal e industrial de grande parte da biodiversidade permanece inexplorado, e os estudos fitoquímicos de espécies arbóreas, que pertencem a ecossistemas ameaçados, são severamente restringidos pela falta de matéria vegetal disponível, uma vez que muitas das espécies já são raras em seus ambientes naturais. Nas últimas décadas, o cultivo de células e tecidos

vegetais em larga escala vem sendo usado para a produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico e pode ser uma solução viável para a obtenção de compostos das espécies arbóreas brasileiras, sem que seja necessária a exploração *in situ* dos recursos florestais. Contudo, poucos estudos foram realizados sobre a cultura *in vitro* e conservação das espécies arbóreas da Floresta Tropical brasileira, como é o caso das Meliaceae (VIANA *et al.*, 1999; NUNES *et al.*, 2003). Entre as poucas pesquisas disponíveis, destaca-se a de Wewetzer (1998), que relatou a produção de azadirachtina, um limonóide com atividade repelente de insetos, a partir da cultura de calos de *Azadirachta indica*, uma meliácea nativa da Índia e Mianmar amplamente utilizada na medicina popular. Outro estudo relevante na área foi realizado por Laudano (2005), que analisou a produção de compostos voláteis em calos de *Cedrela fissilis* e observou diferenças na composição fitoquímica entre culturas mantidas sob diferentes condições de cultivo. Além disso, os compostos majoritários identificados nessas culturas diferiram daqueles encontrados nos extratos da planta, evidenciando que a produção de metabólitos secundários, a partir da cultura de células de *Cedrela fissilis* apresenta grande potencial a ser explorado. Portanto, o desenvolvimento de sistemas de cultura de tecidos para espécies arbóreas brasileiras, especialmente para *Cedrela fissilis*, é uma meta urgente, uma vez que sua disponibilidade permitirá a realização de estudos sobre a regulação da biossíntese e o isolamento de compostos biologicamente ativos, sintetizados *in vitro*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como objetivos pesquisar os efeitos de diferentes condições de cultura sobre o crescimento e o perfil metabólico de calos de *Cedrela fissilis* e realizar a caracterização histoquímica e morfológica de calos de *Cedrela fissilis*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos de fontes de carbono, glutamina, reguladores do crescimento, formulações salinas, tipo de explante, presença e ausência de luz sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*;
- Avaliar o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* sob diferentes condições de cultivo através de curvas de dissimilação;
- Comparar o perfil metabólico de calos de *Cedrela fissilis* crescidos sob diferentes condições de cultivo através de espectrofotometria de varredura em UV-vis e espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- Quantificar clorofilas, compostos fenólicos totais e flavonóides de calos de *Cedrela fissilis* crescidos sob diferentes condições de cultivo;
- Realizar a caracterização morfológica e histoquímica de calos de *Cedrela fissilis*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. DESCRIÇÃO E ECOLOGIA DA ESPÉCIE

O Brasil está localizado entre as latitudes 5° N e 32° S, e suas altitudes variam desde o nível do mar até acima dos 3000 m. Seu território abrange diversas condições ecológicas diferentes, que vão da zona equatorial à temperada, o que garante a presença de uma rica e diversificada flora e fauna. Os biomas da Amazônia, Mata Atlântica, Pantanal, Cerrado, Caatinga e Pampas totalizam 8,5 milhões de Km<sup>2</sup> e compreendem cerca de 20% de toda a biodiversidade do mundo. Além de sua importância ecológica, esses ecossistemas têm papel fundamental na economia mundial, pois são fonte de madeira, fibras, frutos, óleos essenciais, resinas e outros produtos de interesse industrial. No entanto, o crescente desmatamento e a degradação dos habitats naturais têm provocado erosão da diversidade genética e muitas espécies arbóreas estão à beira da extinção. A Amazônia e o Pantanal apresentam o maior grau de conservação, cerca de 82 – 83% de suas áreas, seguidos pelo Cerrado, Caatinga e Pampas, que possuem aproximadamente 41 – 45% dos remanescentes conservados. A Mata Atlântica é o bioma mais degradado, restando apenas 7,26% de sua área original. (VIANA *et al.*, 1999; PILATTI *et al.*, 2010).

A Mata Atlântica está localizada na costa Atlântica e se estende desde o Estado do Rio Grande do Norte, na região Nordeste do Brasil, até o Estado do Rio Grande do Sul, no extremo sul do país. Uma das florestas mais ricas em biodiversidade no Planeta, a Mata Atlântica detém cerca de 20 mil espécies vegetais, sendo 8 mil delas endêmicas, evidenciando sua singularidade botânica. Pela extensão que ocupa do território brasileiro, a Mata Atlântica apresenta um conjunto de ecossistemas com processos ecológicos interligados. As formações do bioma são as florestas Ombrófila Densa, Ombrófila Mista (Mata de Araucárias), Estacional Semidecidual e Estacional Decidual e os ecossistemas associados como manguezais, restingas, brejos interioranos, campos de altitude e ilhas costeiras e oceânicas. São nessas regiões que vive também 62% da população brasileira, cerca de 110 milhões de pessoas. A intensa exploração madeireira de espécies como *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae), *Ocotea odorifera*, *Ocotea catharinensis* e *Ocotea porosa* (Lauraceae) e *Aspidosperma olivaceum* (Apocynaceae), associada à pressão urbana e à supressão da vegetação para a expansão da agropecuária, fazem com que a Mata Atlântica seja

um dos biomas com maiores riscos de extinção do mundo (VIANA *et al.*, 1999; NUNES, 2000).

*Cedrela fissilis* é uma das oito espécies do gênero *Cedrela* que ocorrem no Brasil, podendo ser encontrada na Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica e Floresta Amazônica, sendo restrita sua ocorrência no Pará), na Floresta Ombrófila Mista (Floresta de Araucária), na Floresta Estacional Semidecidual e na Floresta Estacional Decidual. De acordo com Rizzini & Mors (1976), a espécie *C. fissilis* tem ampla ocorrência, sendo encontrada desde o Pará até a Argentina, e sendo comum de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. Ocorre em Santa Catarina juntamente com *C. odorata* e *C. lilloi*, em regiões de Floresta Estacional Decidual ou Semidecidual (KLEIN, 1984; CARVALHO, 1994). Rizzini (1987) comenta que outras duas espécies, *C. odorata* e *C. angustifolia*, são comumente confundidas sob a designação de *C. fissilis*. Todas recebem as denominações vernaculares de cedro, cedro-branco, cedro-rosa e cedro-vermelho. Sua diferenciação é feita através da morfologia, uma vez que suas áreas de ocorrência interpenetram-se. De maneira geral, *C. odorata* é o cedro-vermelho, que ocorre nas matas de terra firme e nas de várzea alta da Amazônia; *C. odorata xerogeiton* é o cedro-do-brejo, típico de capões de mata pluvial do Planalto Central, ocorrendo tanto em terrenos apenas úmidos como alagadiços; *C. angustifolia* aparece nas regiões úmidas da Mata Atlântica, principalmente da Cordilheira Marítima, que abrange os estados de ES, RJ, SP, MG e PR; *C. fissilis* é peculiar às matas mais secas, podendo aparecer em descampados e até no cerrado. É o cedro dos pinheirais, do interior, ou seja, do Brasil meridional.

A espécie é conhecida por diferentes nomes populares, tais como: acaiacá; acaiacatinga; acajá-catinga; acajatinga; acaju; acaju-caatinga; capiúva; cedrinho, no Paraná; cedro-amarelo, na Bahia, no Rio de Janeiro e em São Paulo; cedro-batata, na Bahia e em Santa Catarina; cedro-branco, em Goiás, em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul; cedro-branco-batata, cedro-fofo, cedro-rosado, cedro-de-carangola e cedro-do-rio, na Bahia; cedro-cetim; cedro-diamantina; cedro-rosa, em Mato Grosso do Sul, no Rio de Janeiro, em Santa Catarina e em São Paulo; cedro-roxo, no Pará; cedro-verdadeiro, em Alagoas e na Bahia; cedro-vermelho, na Bahia e no Espírito Santo; cedro-da-bahia; cedro-da-várzea, cedro-do-campo; iacaiacá. Possui como sinonímia botânica: *Cedrela brasiliensis* Adr. Jussieu; *Cedrela brunellioides* Rusby, *Cedrela huberi* Ducke; *Cedrela macrocarpa* Ducke; *Cedrela regnelli* C. de

Candolle; *Cedrela tubiflora* Berton (LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994).

No processo de sucessão considera-se *C. fissilis* como pioneira, sendo encontrada em capoeirões, matas secundárias ou semidevastadas, podendo também se desenvolver no interior da floresta primária, regenerando-se preferencialmente em clareiras ou bordas de mata. É uma espécie heliófita ou de luz difusa e apresenta crescimento rápido, sobretudo em solos profundos e úmidos, e quando recebe bastante luz (REITZ *et al.*, 1979; LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994). As árvores são caducifólias, com 10 a 25 m de altura e 40 a 80 cm de DAP, podendo atingir até 40 m de altura e 200 cm de DAP, na idade adulta. Os períodos de floração e frutificação apresentam grande variação entre os locais de ocorrência. No Estado de Santa Catarina, a floração ocorre entre setembro e dezembro, e a frutificação ocorre nos meses de julho a agosto, produzindo grande quantidade de sementes com alta viabilidade e que se mantêm viáveis por tempo superior a 4 meses. A dispersão se dá pela queda das sementes no solo, dentro do fruto ou pela ação dispersante do vento, e a germinação é abundante e ocorre em 12 – 18 dias. Apesar disso, sua frequência nas florestas do Sul do Brasil varia de uma a três árvores por hectare. Essa densidade reflete tanto sua característica oportunística, que demanda a formação de clareiras para desenvolver-se plenamente, como o equilíbrio com a broca-do-cedro (*Hypsipyla grandella*), que ataca as gemas apicais e leva ao desenvolvimento arbustiforme e, em casos extremos, à morte das plantas, sendo o maior desafio à cultura do cedro, tanto em viveiros como na regeneração natural (LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994).

### 3.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA, MEDICINAL E INDUSTRIAL

A madeira de *Cedrela fissilis* é uma madeira leve e cheiro característico. Sua coloração no alburno varia de branca a rosada. O cerne varia do bege rosado-escuro ou castanho-claro-rosado, mais ou menos intenso, até ao castanho-avermelhado. Possui resistência moderada ao ataque de organismos xilófagos e é resistente aos agentes exteriores, salvo se enterrada ou submersa, quando apodrece rapidamente. É uma madeira muito parecida com o mogno (*Swietenia macrophylla*), porém mais mole e com textura mais grosseira. Entre as madeiras leves, o cedro é a que possibilita o uso mais diversificado possível, superado somente pela madeira do pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*). É de fácil secagem em estufa, não ocorrendo

empenamento e rachaduras, e de fácil manipulação. Apresenta boa retenção de pregos e parafusos, com excelente absorção de pigmentos e polimento. Essas características conferem a ela altíssimo valor econômico e comercial, sendo utilizada em carpintaria, marcenaria, construção naval e aeronáutica, entre outros. A espécie também é recomendada para a arborização em áreas urbanas, como parques e praças, e para recuperação de áreas degradadas e reposição de matas ciliares em locais com ausência de inundação (RIZZINI & MORS, 1976; CARVALHO, 1994).

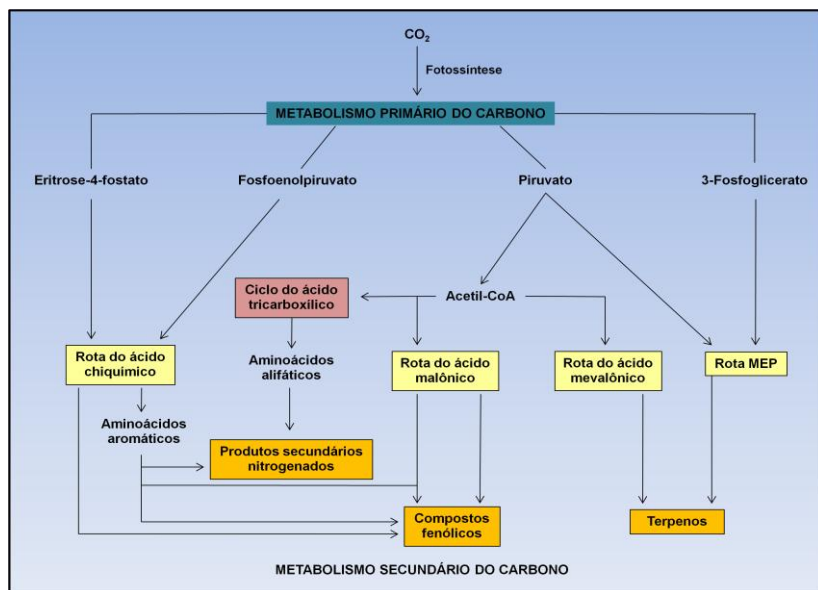
Além disso, a família Meliaceae tem sido estudada pela sua importância medicinal, fitoquímica e no controle de insetos. As espécies desta família têm seu papel principalmente na medicina natural, apresentando como propriedades terapêuticas: ação anti-viral, anti-helmíntica, anti-reumática, anti-inflamatória e anti-cancerígena (NUNES, 2000).

Pesquisas feitas com extrato de folhas e de raízes de *C. fissilis* revelaram atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium kansasii* (RAMOS *et al.*, 2008) e atividade inibitória sobre as enzimas Leishmania APTR (Adenina Fosforibosil Transferase), encontrada em *Leishmania tarentolae* e presente também no genoma de *M. tuberculosis*, e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH), de *Trypanosoma cruzi* (RAMOS *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 2009). Goulart *et al.* (2004) demonstrou que os terpenos farnesol, nerolidol, limoneno, e linalol possuem atividade antimalárica nos estágios intraeritrocíticos do *P. falciparum*.

Os terpenos constituem a maior classe de produtos secundários, apresentando uma grande variedade de substâncias de origem vegetal. São formados a partir de intermediários do metabolismo primário do carbono (Figura 1). O isopentenil difosfato (IPP) é a unidade ativa básica na formação dos terpenos, e pode ser formado a partir da acetil CoA na rota do ácido mevalônico, ou a partir de intermediários glicolíticos na rota do metiliteritrol fosfato (MEP) (VIEGAS JR., 2003; TAIZ & ZEIGER, 2006).

Esses compostos são toxinas e inibidores do forrageio para muitos insetos e mamíferos herbívoros, sendo que sua importância ecológica como defensivos de plantas está bem estabelecida. Os limonóides são, provavelmente, os maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida e tem atraído considerável interesse por causa de suas propriedades biológicas e diversidade de estruturas (LEITE *et al.*, 2009; VIEGAS JR., 2003). A família Meliaceae é

caracterizada pela grande produção de limonóides, e o uso da biotecnologia e de técnicas de cultura de tecidos podem ser alternativas importantes e viáveis para a síntese de tais compostos (LEITE *et al.*, 2009; ROY & SARAF, 2006; TAIZ & ZEIGER, 2006).



**Figura 1:** Visão das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário (Adaptado de Taiz & Zeiger, 2006).

Leite *et al.* (2005) relatou atividade biológica do extrato de *C. fissilis* contra a formiga cortadeira *Atta sexdens rrupopilosa*, além de ter isolado de suas raízes os triterpenos ácido oleanólico e ácido oleanônico e o limonóide 3 $\beta$ -acetoxicarapina. A análise do óleo de *Carapa guianensis* e dos extratos de raízes e de folhas de *Cedrela fissilis*, permitiu o isolamento de nove limonóides, dentre os quais seis apresentaram atividade inseticida sobre a formiga *A. sexdens rrupopilosa* (AMBROZIN *et al.*, 2006). Estudos feitos com o extrato das sementes de *Azadirachta indica*, uma meliácea africana, mostraram eficiência no combate às larvas do mosquito *Anopheles*, vetor da malária (GIANOTTI *et al.*, 2008).

A análise dos óleos essenciais de *Toona ciliata*, *Cedrela odorata* e *C. fissilis* por CG-EM, mostrou a ocorrência de grande quantidade de



sesquiterpenos, entre eles, germacreno-D,  $\beta$ -cariofileno e biciclogermacreno (MAIA *et al.*, 2000). Outros estudos demonstraram que em óleos essenciais de folhas de *C. fissilis*, os componentes voláteis principais detectados foram o biciclogermacreno e o  $\beta$ -longipineno, enquanto que em óleos essenciais da casca predominaram o espatulenol, o viridiflorol, o globulol e o  $\beta$ -bisaboleno (LAGO *et al.*, 2004).

### 3.3. CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS *IN VITRO*

A biotecnologia de espécies florestais, através do emprego de técnicas de cultura de células, ramos e raízes para a regeneração de plantas e produção de metabólitos secundários *in vitro*, e o desenvolvimento de sistemas que possibilitem a conservação de recursos genéticos asseguram formas alternativas para a exploração sustentável, contribuindo com programas de conservação das florestas brasileiras, principalmente de árvores nativas encontradas em ecossistemas ameaçados.

Desde as décadas de 1940 e 1950, quando os primeiros alcalóides foram produzidos em culturas de meristema e raízes e foram estabelecidas as primeiras culturas de células em suspensão, a possibilidade de se produzir compostos secundários de plantas a partir de sistemas de cultura *in vitro* tem despertado interesse, sendo foco de diversas pesquisas. No entanto, a biossíntese de compostos vegetais de valor econômico em cultura de calos e suspensões celulares ainda enfrenta dois gargalos: o primeiro é referente à dificuldade de se estabelecer culturas estáveis, que produzam o metabólito de interesse de maneira contínua e em quantidade significativa, o que demanda muito tempo e a experimentação de diversas variáveis de cultivo; o segundo gargalo é a transição da cultura experimental para o cultivo e a produção do composto em larga escala (*scale up*), de forma que seja economicamente viável para competir, ou até mesmo substituir, as técnicas convencionais de produção dos compostos (ROBINS, 1994; BOTTA *et al.*, 2001; VERPOORTE & MARASCHIN, 2001).

Os dois únicos casos em que estas dificuldades foram contornadas e hoje são produzidos comercialmente são o alcalóide isoquinolínico berberina, proveniente de culturas celulares de *Coptis japonica*, e a naftoquinona shikonina, obtido da cultura de células de *Lithospermum erythrorhizon*. Entretanto, já foram relatados vários casos de sucesso na produção de compostos de interesse em culturas de células, ainda que em escala laboratorial, entre eles: ácido rosmarínico

(*Coleus blumei*), saponina (*Panax ginseng*), cafeína (*Coffea arabica*), diosgenina (*Dioscorea deltoidea*), capsaicina (*Capsicum frutescens*), sanguinarina (*Papaver somniferum*) e ajmalicina (*Catharanteus roseus*) (PLETSCH, 1998; VERPOORTE & MARASCHIN, 2001). O constante aperfeiçoamento das técnicas de cultivo de células, associado aos avanços no conhecimento da fisiologia, bioquímica e regulação metabólica das células vegetais, fazem do cultivo de células em larga escala uma tecnologia viável para a produção de compostos de interesse econômico.

Laudano (2005) analisou os compostos voláteis presentes em calos de *C. fissilis* e identificou 8 monoterpenos e 3 sesquiterpenos. O linalol, que foi o constituinte majoritário, a cânfora, o 1,8-cineol e o 3-careno foram encontrados nos calos, mas não nos óleos essenciais das folhas e da casca, indicando que a biossíntese de compostos que não são detectados em plantas crescidas no ambiente natural pode ser induzida em culturas *in vitro*. O autor ainda observou que a composição dos voláteis difere em calos cultivados na luz e cultivados no escuro, como foi o caso do sesquiterpeno germacreno, que se mostrou presente, tanto nos calos crescidos na luz quanto nos óleos essenciais de folhas e casca. É fundamental a realização de estudos adicionais no sentido de verificar o efeito das diferentes condições de crescimento sobre o perfil de composição dos componentes voláteis dos óleos essenciais dos calos de *C. fissilis*, assim como testar a atividade antibacteriana dos mesmos, já que Lago *et al.* (2004), demonstraram que o óleo de folhas, que contém alta concentração de germacreno, apresentou atividade antibacteriana. Além disso, estudos sobre o efeito de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento dos calos são necessários para selecionar as condições de cultura mais promissoras para o estabelecimento de culturas de suspensão celular visando à produção e extração de metabólitos secundários de interesse econômico.

### 3.4. CONCEITO DE CALO

O calo é um sistema não-organizado de células parenquimatosas pouco diferenciadas e sem polaridade, obtido *in vitro* a partir de um fragmento de tecido ou órgão vegetal que foi isolado da planta-mãe e cultivado em meio de cultura contendo reguladores de crescimento exógenos. Os calos podem ser compactos ou friáveis e apresentar coloração variada, ou mesmo não ter pigmentação. A estrutura e o tipo de crescimento que o calo apresentará dependem de diversos fatores,

tais como a composição do meio de cultura, condições ambientais (iluminação, temperatura, etc.), origem, idade e genótipo do tecido doador do explante e até mesmo o tamanho do inóculo (NARAYANASWAMY, 1994; CHAWLA, 2004; TERMIGNONI, 2005).

A formação do calo envolve mudanças estruturais e metabólicas nas células e pode ser dividida em três etapas: indução, divisão celular e diferenciação. Na fase de indução a célula se prepara para a divisão e seu metabolismo é ativado; segue-se a esta fase a de divisão celular, na qual há síntese ativa e o retorno progressivo ao estado meristemático ou basal, conhecido também como desdiferenciação. À medida que as divisões celulares vão ocorrendo, começam a se estabelecer gradientes nutricionais e padrões histológicos diferenciados. Após perder sua identidade inicial, as células entram em uma nova fase, de diferenciação. Podem surgir centros com atividade meristemática, denominados meristemóides, com disposição concêntrica, onde serão formados traqueídeos e elementos de tubo crivado, primórdios de raízes ou gemas. Embora o processo de calogênese seja dividido em três fases, definidas pelas características predominantes em cada uma delas, a formação da massa celular ocorre pela divisão celular e diferenciação concomitantes, na segunda e na terceira fase (AITCHINSON, 1977; NARAYANASWAMY, 1994; TERMIGNONI, 2005).

### 3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA FITOQUÍMICA

Na cultura de tecidos *in vitro*, a fitoquímica tem papel fundamental na detecção e análise de produtos do metabolismo vegetal. O estudo da constituição química das plantas tem sido facilitado pelo desenvolvimento de métodos rápidos e precisos, tanto para a identificação das classes de compostos quanto para a detecção de moléculas específicas. Dentre os diversos métodos analíticos utilizados na fitoquímica, a análise das características espectrais dos compostos por espectroscopia de absorção UV-vis e infravermelho fornece grande número de informação. Este tipo de análise é baseado na propriedade que as moléculas possuem de absorver parte da radiação incidente e irradiar o restante.

A espectrofotometria de absorção molecular no UV-vis é um método analítico baseado na interação entre a matéria e a radiação eletromagnética, na qual as moléculas absorvem determinados comprimentos de onda da radiação UV/VIS (180 – 780 nm). Compostos

coloridos, conhecidos como cromóforos, podem absorver tanto luz visível quanto ultravioleta (200 a 700 nm), enquanto substâncias sem cor costumam absorver luz na parte invisível do espectro (200 a 400 nm). Este tipo de medição permite identificar e quantificar muitos dos constituintes de um tecido vegetal, além de triar extratos vegetais à procura de classes específicas de compostos. (HARBORNE, 1998; LYRA *et al.*, 2010).

A espectroscopia vibracional de infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica bem estabelecida e continuamente aperfeiçoada que permite a análise de uma grande variedade de amostras de forma rápida e utilizando quantidades mínimas de material. O princípio do método baseia-se no fato de que a energia fornecida pela radiação no infravermelho médio (4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ ) é absorvida pelas ligações químicas de uma molécula em comprimentos de onda específicos, provocando vibrações que alteram o eixo e/ou o ângulo destas ligações. Estas alterações são então correlacionadas com ligações simples ou grupamentos funcionais, permitindo a identificação de compostos. A região do espectro do infravermelho acima de 1200  $\text{cm}^{-1}$  mostra bandas espectrais relativas à vibração individual de ligações ou grupamentos funcionais. Uma vez que muitos grupamentos funcionais podem ser identificados pelas suas frequências vibracionais características, a espectroscopia vibracional de infravermelho torna-se um método simples e confiável para associar um composto à sua classe. Já a região abaixo de 1200  $\text{cm}^{-1}$  mostra bandas relacionadas à molécula inteira e por isso é conhecida como região do *fingerprint*. Dessa forma, a análise por infravermelho é também uma importante ferramenta quando se pretende comparar e caracterizar várias amostras quanto à sua composição (HARBORNE, 1998; DUNN & ELLIS, 2005).

### 3.6. BIOTECNOLOGIA VEGETAL E PROGRAMAS DE CONSERVAÇÃO

De acordo com Carvalho (1994), programas de conservação têm sido estabelecidos para um número muito restrito de espécies florestais brasileiras e indica a necessidade urgente de estabelecimento de programas de conservação para espécies da Floresta Atlântica, como *Cedrela fissilis*, *Ocotea odorifera*, *Ocotea catharinensis*, *Ocotea porosa* e *Calophyllum brasiliense*.

As estratégias tradicionalmente utilizadas para a conservação da biodiversidade vegetal são através de jardins botânicos, unidades de conservação, tais como reservas biológicas e parques nacionais, e programas de bancos de sementes e de enriquecimento e recuperação de áreas degradadas. No entanto, o crescimento lento de muitas espécies, sua suscetibilidade a doenças e ao ataque de insetos, e a falta de conhecimento sobre sua ecologia são consideradas as maiores limitações à produção comercial e à regeneração artificial. A Biotecnologia pode direta e indiretamente viabilizar estratégias de conservação, ao mesmo tempo em que permite que espécies economicamente importantes sejam tanto utilizadas quanto protegidas.

A cultura de tecidos de espécies arbóreas tem sido aplicada à propagação clonal (micropropagação e embriogênese somática), eliminação viral, conservação genética, fertilização *in vitro*, transformação genética, cultura de protoplastos e hibridização somática, produção de metabólitos secundários, conservação de germoplasma, entre outros. A biologia molecular e, mais especificamente, as técnicas de marcadores moleculares, têm papel chave em possibilitar a avaliação da diversidade vegetal a nível genômico. A elucidação das estruturas populacionais e dos padrões de distribuição dos genes dentro dos ecossistemas fornece informações que podem ser usadas para apoiar programas de conservação *in situ*. Por outro lado, o principal objetivo da conservação *ex situ* é coletar e manter uma amostra representativa da diversidade genética existente de uma determinada espécie. Para espécies arbóreas altamente ameaçadas, a conservação *ex situ* pode ser a única abordagem a curto e médio prazo. É importante uma abordagem integrada, que combine conservação *in vitro*, *ex vitro* e *in situ* com estudos de variabilidade genética, biologia reprodutiva e ecologia. Esta é a maior questão para as áreas globais que são ricas em biodiversidade e precisam urgentemente que suas populações percebam o potencial econômico de seus ricos recursos biológicos, mas que, ao mesmo tempo, preservem-nos para as futuras gerações (BENSON, 1999; VIANA *et al.*, 1999; ISHIL, 2006).

Poucos estudos foram realizados no que diz respeito à cultura *in vitro* e conservação das espécies arbóreas da Floresta Tropical brasileira, como é o caso das Meliaceae (NUNES *et al.*, 2003). Assim, estudos de cultura e conservação *in vitro* para as espécies arbóreas das florestas brasileiras, especialmente de Meliaceae, ainda são escassos na literatura. Protocolos de micropropagação foram estabelecidos para *Swietenia macrophylla*, *Cedrela odorata* e *Cedrela fissilis* (LEE & RAO, 1988;

CERDAS *et al.*, 1998; NUNES *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2007), e sistemas de embriogênese somática foram desenvolvidos para *Swietenia macrophylla* e *Cedrela fissilis* (MARUYAMA & ISHII, 1999; VILA *et al.*, 2009). O armazenamento de propágulos vegetativos de *Swietenia macrophylla* e *Cedrela fissilis* em cápsulas de alginato de cálcio, a temperaturas acima do congelamento foi relatado por Maruyama *et al.* (1997) e Nunes *et al.* (2003) e a criopreservação de sementes de *Swietenia macrophylla* e *Cedrela fissilis*, eixos embrionários de *Swietenia macrophylla*, e meristema apical e meristema radicular de *Cedrela odorata* foi alcançada com sucesso (MARUYAMA *et al.*, 1997; MARZALINA & KRISHNAPILLAY, 1999; LAUDANO, 2005). A indução de calos tem sido estudada para a espécie *Cedrela fissilis* por Nunes *et al.* (2002), Laudano (2005) e Mito (2007), demonstrando grande potencial para a produção de mudas clonais, através da organogênese indireta, e produção de metabólitos secundários de interesse medicinal e industrial, sendo de grande importância a continuidade destas pesquisas a fim de melhor compreender a fisiologia da espécie e otimizar os sistemas de cultura *in vitro* e seus potenciais usos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL VEGETAL

Sementes de *Cedrela fissilis*, previamente adquiridas do Instituto Florestal de São Paulo e coletadas na Estação Experimental de Araraquara, São Paulo, foram utilizadas para dar origem a plântulas axênicas que como fontes de explantes para realização dos experimentos.

### 4.2. DESINFECÇÃO DAS SEMENTES

A desinfecção das sementes foi realizada de acordo com Nunes *et al.* (2007). As sementes foram lavadas com água da torneira e detergente neutro, enxaguadas quatro vezes e, em fluxo laminar, foram imersas por 75 minutos em solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa) com 2.5% (v/v) de cloro ativo, acrescida de algumas gotas de detergente. Em seguida, foram enxaguadas por quatro vezes com água destilada esterilizada para a remoção de resíduos de hipoclorito e detergente e inoculadas em meio de cultura.

### 4.3. PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

A preparação do meio de cultura foi feita conforme descrito por NUNES *et al.* (2007). O meio de cultura utilizado para o estabelecimento de plântulas foi o meio de cultura Murashige & Skoog (MS) (MURASHIGE & SKOOG, 1962), uma mistura em pó preparada pela Sigma Chemical Co., na concentração de 4,4 g/L, suplementado com 59 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem, utilizando-se solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou de ácido clorídrico 0,1 N. O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio de 20 x 150 mm (8 ml de meio por tubo). Todos os tubos foram fechados com tampas de polipropileno e autoclavados por 18 minutos a 1,1 Kg/cm<sup>3</sup> e 121°C. Estes procedimentos foram utilizados em todos os experimentos descritos a seguir, com modificações na composição do meio de cultura quando necessário.

#### 4.4. ESTABELECIMENTO DE PLÂNTULAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS

Conforme descrito por Nunes *et al.* (2007), as sementes desinfectadas foram inoculadas em meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com sacarose e Phytigel nas concentrações citadas no item 4.3. Os tubos de ensaio foram cobertos com filme de polipropileno (76 mm x 76 mm), presos com elásticos de borracha. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL ( $22.3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e umidade relativa de 70%. Estas condições foram utilizadas em todos os experimentos, exceto quando especificado.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CALOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA

##### 4.5.1. Efeito de diferentes fontes de carbono e do tempo de cultivo sobre o crescimento de calos

Segmentos nodais cotiledonares medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade (Figura 2 – A), obtidas conforme citado no item 4.4, e inoculados em meio de cultura preparado conforme descrito no item 4.3, suplementado com 59 mM, 88,5 mM ou 118 mM de sacarose, frutose ou glucose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 3.4. Após 4 e 8 semanas do início dos experimentos os calos foram coletados para as análises dos metabólitos primários e secundários e para a análise do crescimento, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 15 repetições por tratamento para a análise de crescimento.



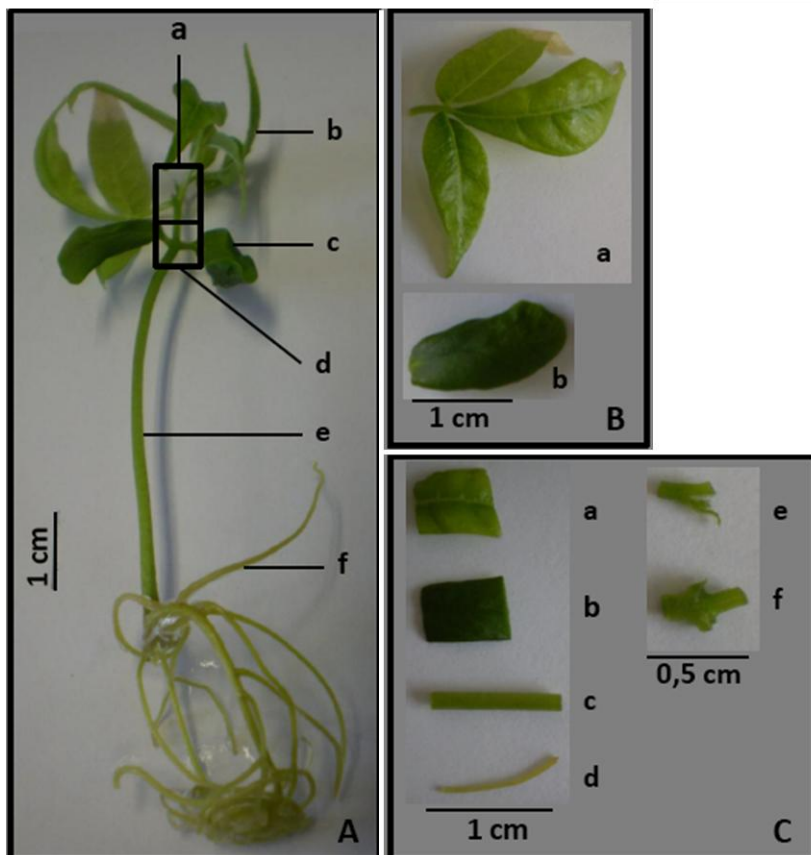


Figura 2: A) Plântula de *C. fissilis* com 8 semanas de idade, obtida conforme citado no item 4.4. A localização dos explantes utilizados nos experimentos estão indicados pelas letras: a) ápice; b) folha; c) cotilédone; d) nó cotilédonar; e) hipocótilo; f) raiz. B) Em detalhe: a) folha; b) cotilédone. C) Explantes utilizados nos experimentos, em detalhe: a) segmento foliar; b) segmento cotilédonar; c) segmento de hipocótilo; d) segmento de raiz; e) segmento apical; f) segmento nodal cotilédonar.

#### 4.5.2. Efeito de diferentes fontes de carbono e da glutamina sobre o crescimento de calos

Segmentos nodais cotilédonares medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade, obtidas conforme citado no item 4.4, e

inoculados no meio de cultura descrito no item 4.3, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Para testar o efeito de diferentes fontes de carbono, o meio de cultura foi suplementado com 59 mM, 88,5 mM ou 118 mM de sacarose, frutose ou glicose. Os efeitos da glutamina foram observados através da suplementação do meio com glutamina na concentração de 2,73 mM. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. Após 8 semanas do início dos experimentos os calos foram coletados para as análises dos metabólitos primários e secundários e para a análise do crescimento, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 15 repetições por tratamento para a análise de crescimento.

#### **4.5.3. Efeito de formulações salinas de meio de cultura, diferentes fontes de carbono e diferentes concentrações de glutamina sobre o crescimento de calos**

Segmentos nodais cotiledonares medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade, obtidas conforme citado no item 4.4, e inoculados nos meios de cultura MS, WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981), B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), W (WHITE, 1963), SH (SCHENK & HILDEBRANT, 1972), K (KAO & MICHAYLUK, 1975) ou AR (Anderson's Rhododendron) (ANDERSON, 1978), suplementados com 0,2% (m/V) de Phytigel, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA e 118 mM de sacarose, frutose ou glicose e concentrações de glutamina de 0, 2,73 mM ou 4,10 mM. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. Após 8 semanas do início dos experimentos os calos foram coletados para a análise do crescimento, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 15 repetições por tratamento para a análise de crescimento.

#### **4.5.4. Efeito da posição do explante sobre o crescimento de calos**

Segmentos nodais cotiledonares medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade, obtidas conforme citado no item 4.4, e inoculados na posição horizontal ou vertical no meio de cultura descrito no item 4.3, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. As

culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. Após 8 semanas do início dos experimentos os calos foram coletados para a análise do crescimento, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 30 repetições por tratamento para a análise de crescimento.

#### **4.5.5. Efeito do tipo de explante, fontes de carbono e da presença e da ausência de luz sobre o crescimento de calos**

Os explantes foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade, obtidas conforme citado no item 4.4. A localização dos explantes na plântula é mostrada na Figura 2 – A. Segmentos foliares medindo aproximadamente 7 mm x 5 mm (Figura 2 – C.a), segmentos de cotilédone medindo aproximadamente 7 mm x 5 mm (Figura 2b), segmentos de hipocótilo medindo aproximadamente 10 mm de comprimento (Figura 2 – C.c), e segmentos de raiz medindo aproximadamente 10 mm de comprimento (Figura 2 – C.d), segmentos de ápice (Figura 2 – C.e) medindo aproximadamente 5 mm, contendo 1 gema apical, e segmentos nodais cotiledonares medindo aproximadamente 5 mm, contendo duas gemas axilares (Figura 2 – C.f), foram inoculados no meio de cultura descrito em 4.3, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glicose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4, e no tratamento de escuro os tubos de ensaio contendo os explantes foram envoltos em papel alumínio. Após 8 semanas do início dos experimentos os calos foram coletados para a análise do crescimento, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como do teor de água. Foram utilizadas no mínimo 10 repetições por tratamento para a análise de crescimento, exceto para os segmentos de epicótilo, que foram utilizados apenas nos experimentos crescidos na presença de luz.

#### **4.5.6. Efeito de BAP em combinação com ANA sobre o crescimento de calos**

Segmentos nodais cotiledonares medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade, obtidas conforme citado no item 4.4. Os pares de cotilédones foram retirados com o auxílio de um bisturi e os nós

cotiledonares, contendo duas gemas axilares cada, foram inoculados no meio de cultura descrito em 4.3, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glicose e os reguladores de crescimento BAP nas concentrações 1,25, 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  em combinação com concentrações de 1,25, 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. Após 8 semanas do início dos experimentos os calos foram coletados para a análise do crescimento, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 13 repetições por tratamento para a análise de crescimento.

#### **4.5.7. Efeito de 2,4-D e do tipo de explante sobre o crescimento de calos**

Os explantes foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade, obtidas conforme citado no item 4.4. Segmentos foliares medindo aproximadamente 7 mm x 5 mm (Figura 2 – C.a), segmentos de cotilédone medindo aproximadamente 7 mm x 5 mm (Figura 2b), segmentos de hipocótilo medindo aproximadamente 10 mm de comprimento (Figura 2 – C.c), segmentos nodais foliares medindo aproximadamente 5 mm, contendo duas gemas axilares, e segmentos nodais cotiledonares medindo aproximadamente 5 mm, contendo duas gemas axilares (Figura 2 – C.f), foram inoculados no meio de cultura descrito em 4.3, suplementado com 59 mM de sacarose e o regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) nas concentrações de 1,13, 2,26, 4,52  $\mu\text{M}$ . As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. Após 6 semanas do início dos experimentos, os calos foram coletados para a análise de crescimento, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, assim como o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 12 repetições por tratamento para a análise de crescimento.

#### **4.5.8. Determinação da massa seca e do teor de água dos calos**

Para a determinação da massa fresca, os calos foram pesados imediatamente após a remoção do meio de cultura e, para a determinação da massa seca, os calos foram transferidos para placas de Petri de 6 cm de diâmetro e mantidos em estufa, por 24 horas a 85°C. O teor de água dos calos foi expresso em porcentagem da massa fresca e

em mg de água por mg de massa seca, determinados através da seguinte fórmula (LAUDANO, 2005):

$$\text{Teor de água (\% da massa fresca)} = (\text{massa fresca} - \text{massa seca}) / \text{massa fresca} \times 100.$$

#### 4.6. DISSIMILAÇÃO DE AÇÚCAR DO MEIO DE CULTURA DURANTE O CRESCIMENTO DOS CALOS

A dissimilação dos açúcares do meio de cultura foi avaliada pelo método descrito por Schripsema (1990). Segmentos nodais cotiledonares medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade, obtidas conforme citado no item 4.4. Os pares de cotilédones foram retirados com o auxílio de um bisturi e os nós cotiledonares, contendo duas gemas axilares cada, foram inoculados no meio de cultura descrito no item 4.3, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 μM de BAP, 5 μM de ANA. A massa inicial do meio de cultura contendo um explante foi estimada através da determinação da massa de cada tubo de ensaio ainda vazio, suas respectivas tampas, dos tubos fechados contendo apenas meio de cultura, após a autoclavagem, e dos tubos de ensaio contendo o meio e o inóculo, devidamente fechados. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4 durante 8 semanas e tiveram sua massa registrada diariamente, sempre no mesmo horário. Ao final do experimento, os calos formados foram coletados e tiveram sua massa fresca determinada. Em cada tratamento foram utilizadas 10 repetições e 3 tubos contendo apenas meio de cultura, que serviram como controle. Os dados obtidos foram plotados em planilha do Microsoft Office Excel 2007, determinadas as curvas de dissimilação de cada calo formado e escolhida a curva mais representativa do perfil de dissimilação observado em cada tratamento.

#### 4.7. ANÁLISE DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS EM CALOS DE *Cedrela fissilis*

##### 4.7.1. Perfil metabólico por espectrofotometria de varredura UV-Vis e espectroscopia de infravermelho

Calos crescidos conforme item 4.5.2, em meio de cultura suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose e 0 ou 2,73

mM de glutamina, e calos iniciados a partir de segmentos cotiledonares e segmentos de hipocótilo cultivados na presença de luz conforme item 4.5.5, em meio de cultura suplementado com 118 mM de frutose, foram coletados e mantidos em nitrogênio líquido até o momento do preparo das amostras.

Para a espectrofotometria de varredura UV-Vis, aproximadamente 2 g de massa fresca foram triturados em solvente clorofórmio:metanol (1:1) em quantidade equivalente a 3 volumes da massa utilizada, durante 2 minutos, com o auxílio de cadinho e pistilo. Cada extrato foi transferido para um tubo de ensaio e ficou em repouso em temperatura ambiente durante 15 minutos. Os extratos foram então filtrados a vácuo e colocados em placa de Petri até que o solvente evaporasse completamente, dentro da capela de exaustão. Para acelerar este processo, as placas foram deixadas *overnight* em estufa aberta a 60°C. Os extratos secos foram re-suspensos em 4 mL de metanol e centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos. Em cubeta de vidro, 3 mL de cada amostra foram submetidos a 5 varreduras em espectrofotômetro UV-vis (200 – 800 nm). Os valores de absorbância obtidos foram plotados em planilha do Microsoft Office Excel 2007 e um gráfico foi gerado a partir da média dos valores obtidos nas varreduras.

Para a espectroscopia de infravermelho, aproximadamente 3g de massa fresca de calos de cada tratamento foram secos em estufa a 85°C durante 24h. A massa seca foi macerada com o auxílio de cadinho e pistilo até ser obtido um pó finíssimo e homogêneo, utilizado para confeccionar pastilhas com KBr. Para cada amostra foram feitas 12 varreduras em espectrômetro FTIR de marca ABB Bomem modelo FTLA2000 contra um "branco" feito com o ar ambiente. O processamento dos espectros obtidos foi realizado com o software OPUS (v. 5.0, Bruker Rheinsteten, Germany) e considerou a definição da janela espectral de interesse (3000-600  $\text{cm}^{-1}$ ), correção da linha de base, correção da relação sinal/ruído e normalização.

## **4.7.2. Dosagem de clorofila, fenólicos totais e flavonóides**

### **4.7.2.1. Dosagem de clorofila**

A clorofila dos calos foi dosada conforme metodologia descrita por Hiscox & Israelstam (1979), com modificações em relação ao volume de solvente utilizado e à temperatura de incubação das amostras. Calos crescidos conforme item 4.5.2, em meio de cultura suplementado

com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose e 0 ou 2,73 mM de glutamina foram coletados e mantidos em NL até o momento da extração da clorofila.

Em tubos de ensaio contendo 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), foram colocados 100 mg de massa fresca de calos, sem macerar o tecido. Os tubos foram fechados com filme de PVC e deixados em estufa a 50°C durante 6 horas. Após a incubação, o solvente contendo a clorofila foi homogeneizado, e deixado em repouso até o tecido se acomodar no fundo dos tubos. O extrato foi cuidadosamente transferido para novos tubos de ensaio e foi armazenado em refrigerador (4°C) até o momento da análise das amostras, realizada no dia seguinte. Para a análise, 3 mL de amostra foram colocados em uma cubeta de vidro e a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-vis (Hiatachi U-1800), em 645 e 663 nm. Para o branco, foram utilizados 3 mL de DMSO puro. Para a quantificação das clorofilas foi utilizada a Fórmula de Arnon (1949):

$$\text{mg.mL de clorofila } a = 0,0127.D_{663} - 0,00269.D_{645}$$

$$\text{mg.mL de clorofila } b = 0,0229.D_{645} - 0,00468.D_{663}$$

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em µg de clorofila por mL de extrato.

#### 4.7.2.2. Dosagem de fenólicos totais e flavonóides

Calos crescidos conforme item 4.5.2, em meio de cultura suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose e 0 ou 2,73 mM de glutamina foram coletados e mantidos em NL até o momento do preparo dos extratos.

Com o auxílio de cadinho e pistilo, 2 g de massa fresca foram triturados em 10 mL de solvente clorofórmio:metanol (1:1) durante 4 minutos, dentro da capela de exaustão. Após a maceração, os extratos ficaram em repouso em temperatura ambiente durante 15 minutos. Depois, cada extrato foi filtrado a vácuo, centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos, e o sobrenadante foi colocado em frascos âmbar, em alíquotas de 1 mL. Os frascos foram levados à capela de exaustão e o solvente das amostras foi evaporado por ventilação forçada, utilizando a bomba à vácuo na função invertida. Para garantir a secagem total da amostras, os frascos foram *overnight* em estufa aberta a 50°C. Os frascos foram então fechados e armazenados em freezer (- 18°C) até o momento das dosagens dos compostos.

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com a metodologia descrita por Rhandir *et al.* (2002). Uma alíquota de cada tratamento foi re-suspendida em 3 mL de etanol 70%. Em tubos de ensaio, foi adicionado 1 mL de cada amostra e 5 mL de metanol 95%, seguido de agitação no vórtex. Dessa solução, foi retirado 1 mL e a este adicionaram-se 5 mL de água ultrapura, 1 mL de etanol 95% e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocaltau, seguido de agitação e repouso de 5 minutos. Após, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 5% (p/v), seguido de agitação e repouso de 1 hora em câmara escura. Em seguida procedeu-se a leitura das amostras a 725 nm em espectrofotômetro UV-vis (Hiatachi U-1800). A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico (50 a 800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  –  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 1,254x$ ). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido gálico por g de massa seca.

A determinação do conteúdo de flavonóides totais foi feita de acordo com Zacarias *et al.* (2007), com modificações. Uma alíquota de cada tratamento foi re-suspendida em 1,5 mL de etanol 70% e 0,5 mL de cada extrato foi utilizado para a determinação do conteúdo de flavonóides totais, na presença de 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio (2% em metanol) e 2,5 mL de etanol. Após repouso de 1 hora, fez-se a leitura a 420 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Hiatachi U-1800). A quantificação dos flavonóides foi feita a partir da curva padrão de quercetina (0,5 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  –  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,009x$ ). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de quercetina por g de massa seca.

## 4.8. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DOS CALOS

### 4.8.1. Preparação das amostras

Calos com diferentes morfologias, crescidos nas condições descritas no item 4.5.2 foram selecionados e seccionados transversalmente. As morfologias escolhidas para análise foram: calo de coloração bege claro, calo verde com estruturas alaranjadas, calo de coloração verde, calo verde com estruturas brancas, calo bege escuro com estruturas globulares lisas. Os cortes foram processados para análises histoquímicas e morfológicas em microscopia de luz de acordo com Schmidt (2009).



As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, em câmara a vácuo, deixadas *overnight* à temperatura de 4° C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, duas vezes, por 10 minutos em cada troca (BOUZON, 1993). Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), com duas trocas de 15 minutos em cada concentração, à temperatura ambiente. A seguir, foi feita a pré-infiltração das amostras, com uma mistura de 1:1 de etanol a 100% e Histo-resina (Leica Histo-resin, Heidelberg, Alemanha), durante 4 h, posteriormente o material foi infiltrado em resina pura por 24 h. A inclusão foi realizada na mesma resina em histo-moldes com adição de polimerizador, à temperatura ambiente, por 2-3 h (ARNOLD *et al.*, 1975, modificado).

Secções com 5 µm de espessura foram corados com diferentes testes histoquímicos e investigados com o microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41) equipado com o sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América).

#### **4.8.2. Histoquímica**

Os materiais foram submetidos aos seguintes testes histoquímicos:

A) Azul de toluidina (AT-O). Este corante foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5%, acidificada com HCl 1N para pH 3,0, por 30 segundos, lavadas em água destilada e secas ao ar (GORDON & MCCANDLESS, 1973; MCCULLY, 1970). As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

B) Ácido Periódico de Schiff (PAS). Foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose). As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 30 minutos, lavados em água corrente e corados com reativo de Schiff por 30 minutos. Foram, então, lavados em água corrente, secos ao ar e montados com bálsamo do Canadá (GAHAN, 1984).

C) Azul brilhante de Coomassie (CBB). Este teste foi utilizado para identificar a presença de proteínas totais. As lâminas contendo as secções foram coradas por 24 h em CBB 0,02 % diluído em solução etanólica acidificada de Clark, posteriormente foram lavadas na mesma solução, seguido de água destilada e secas ao ar (GAHAN, 1984). As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

#### 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student, ao nível de 5% de probabilidade, quando a comparação se restringiu a apenas dois tratamentos, ou através de análise de variância simples (ANOVA) ou multifatorial, com separação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, quando mais de dois tratamentos foram comparados. Os cálculos foram realizados com o auxílio do software estatístico Statgraphics versão 7.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CALOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA

#### 5.1.1. Efeito de reguladores de crescimento sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

##### 5.1.1.1. Efeito de 2,4-D e do tipo de explante sobre o crescimento de calos

O efeito do tipo de explante e da concentração de 2,4-D sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos cultivados durante 5 semanas em meio de cultura MS, suplementado com 59 mM de sacarose, é mostrado nas Tabelas 1 e 2. Não houve calogênese a partir de segmentos foliares e segmentos cotiledonares, sendo que 100% dos segmentos foliares e 62,5 – 95,7% dos segmentos cotiledonares morreram (Tabela 1). Os segmentos de hipocótilos apresentaram maior frequência de calogênese quando cultivados em meio de cultura contendo 1,13  $\mu\text{M}$  ou 4,52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (97,1% e 92,3%, respectivamente). Segmentos nodais cotiledonares tiveram o maior percentual de calogênese (75%) quando cultivados na menor concentração de 2,4-D. Os segmentos nodais foliares cultivados em meio de cultura contendo 4,52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D não formaram calos, e os segmentos nodais foliares cultivados em meio de cultura contendo 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, não formaram quantidade de calos suficiente para a análise estatística.

Os dados da Tabela 2 indicam que os calos de segmentos de hipocótilo, segmentos nodais cotiledonares e segmentos nodais foliares, cultivados em meio de cultura contendo 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, formaram os calos com as maiores massas frescas, variando entre 188,9 mg e 232,9 mg. Esses valores, entretanto, não diferiram significativamente do obtido para os calos produzidos a partir de hipocótilo, em 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Os maiores valores de massa seca, contudo, foram observados com 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, para os calos originados a partir de nó cotiledonar (12,7 mg) e de nó foliar (14,9 mg). Os calos originados de hipocótilo, cultivados em meio de cultura contendo 4,52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, apresentaram a menor razão massa seca/ massa fresca (0,046) e o maior teor de água (95,4%), apenas em relação aos calos produzidos a partir do

cultivo de nó foliar, em 1,13  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e de nó cotiledonar, em 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, não diferindo dos demais tratamentos.

**Tabela 1.** Efeito do tipo de explante e de 2,4-D sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados por 5 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose.

Tipo de explante	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	Taxa de mortalidade (%)
Hipocótilo	1,13	34	97,1	2,9	0
	2,26	39	53,8	0	0
	4,52	39	92,3	0	0
Nó cotiledonar	1,13	12	75,0	16,7	0
	2,26	14	57,1	0	0
	4,52	12	58,3	0	0
Nó foliar	1,13	12	58,3	16,7	0
	2,26	14	14,3	0	0
	4,52	12	0	0	0
Cotilédone	1,13	24	0	0	62,5
	2,26	23	0	0	95,7
	4,52	26	0	0	88,5
Folha	1,13	24	0	0	100
	2,26	24	0	0	100
	4,52	24	0	0	100

**Tabela2.** Efeito do tipo de explante e de 2,4-D sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados por 5 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose.

Tipo de explante	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Massa fresca ( $\text{mg}$ ) <sup>a</sup>	Massa seca ( $\text{mg}$ ) <sup>a</sup>	Massa seca/massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
Hipocótilo	1,13	188,9 bc	9,5 b	0,052 abcd	94,8 bc
	2,26	172,5 abc	8,5 ab	0,050 ab	94,9 bc
	4,52	153,3 ab	6,8 a	0,046 a	95,4 c
Nó cotiled.	1,13	232,9 c	12,7 c	0,055 abcde	94,5 abc
	2,26	109,5 a	6,4 a	0,059 bcde	94,1 ab
	4,52	121,6 ab	5,8 a	0,051 abc	94,8 bc
Nó foliar	1,13	227,1 c	14,9 c	0,066 cde	93,4 a

<sup>a</sup>Médias de no mínimo sete repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 5.1.1.2. Efeito de BAP em combinação com ANA sobre o crescimento de calos

O efeito de diferentes combinações de BAP e ANA sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS, suplementado com 118 mM de sacarose, é mostrado nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Na Tabela 3 é possível observar que a combinação de 5  $\mu\text{M}$  de BAP com 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA induziu o maior percentual de calogênese (86,6%), e que concentrações iguais de BAP e ANA também induziram elevada frequência de calogênese (80%). A calogênese com raízes ocorreu apenas nas combinações de 1,25  $\mu\text{M}$  de BAP com 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA (13,3%) e de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP com 5  $\mu\text{M}$  de ANA (8,3%), sendo que nesta combinação foi observada a menor frequência de calogênese (48%) e foi a única que apresentou a formação de raízes diretamente no explante (18,3%).

**Tabela 3.** Efeito de BAP e ANA sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose.

BAP (µM)	ANA (µM)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	Formação de raízes (%)
1,25	1,25	15	80,0	13,3	0
1,25	5	15	73,3	0	0
2,5	5	45	48,3	8,3	18,3
5	1,25	13	70,0	0	0
5	2,5	15	86,7	0	0
5	5	15	80,0	0	0

Com relação aos dados de crescimento dos calos (Tabela 4), a combinação de 2,5 µM de BAP com 5 µM de ANA originou calos com a maior massa fresca (1082,58 mg), a maior massa seca (83,25 mg) e o maior teor de água (91,58%) dos calos. Os valores de massa fresca e massa seca deste tratamento foram significativamente maiores do que os valores dos tratamentos com 1,25 µM de BAP e 1,25 µM de ANA (503,43 mg e 53,64 mg, respectivamente) e com 5 µM de BAP e 5µM de ANA (476,50 mg e 48,16 mg, respectivamente). Nos demais tratamentos os valores de massa seca dos calos variaram entre 54,46 mg e 62,66 mg. O menor teor de água (88,48%) e o maior valor de razão entre massa seca e massa fresca dos calos foram obtidos no tratamento com 1,25 µM de BAP e 1,25 µM de ANA e diferiram significativamente apenas dos verificados no tratamento 2,5 µM de BAP com 5 µM de ANA.

**Tabela 4.** Efeito de BAP e ANA sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose.

BAP ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/ massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
1,25	1,25	503,43 a	53,64 a	0,115 b	88,48 a
1,25	5	711,63 ab	60,90 ab	0,097 ab	90,23 ab
2,5	5	1082,58 b	83,25 b	0,084 a	91,58 b
5	1,25	613,44 ab	62,66 ab	0,111 ab	88,85 ab
5	2,5	747,38 b	54,46 ab	0,088 ab	91,10 ab
5	5	476,50 a	48,16 a	0,106 ab	89,35 ab

<sup>a</sup>Médias de no mínimo nove repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As Tabelas 5 e 6 mostram, respectivamente, o efeito de diferentes combinações de BAP e ANA sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS, suplementado com 118 mM de glucose. Apenas a combinação de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP com 5  $\mu\text{M}$  de ANA formou 86,7% de calos e 13,3% de calos com raízes, nos demais tratamentos a porcentagem de indução de calos foi de 100% (Tabela 5).

Os resultados da Tabela 6 indicam que os valores de massa fresca dos calos crescidos nos meios de cultura com as combinações de 1,25  $\mu\text{M}$  de BAP e com 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA (918,73g) e 5  $\mu\text{M}$  de BAP com 5  $\mu\text{M}$  de ANA (953,93g) foram significativamente menores do que a massa fresca dos calos crescidos no meio de cultura contendo 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA (1334,3g). Contudo, não houve diferença significativa entre os valores de massa fresca dos calos do tratamento 1,25  $\mu\text{M}$  de BAP com 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA tratamento em relação aos demais. Em termos de massa seca, porém, verifica-se que os calos produzidos nesse tratamento apresentaram valor superior de massa seca (70,06 mg) apenas em relação ao tratamento 5  $\mu\text{M}$  de BAP com 5  $\mu\text{M}$  de ANA (51,80 mg). Nos demais tratamentos as massas secas dos calos variaram de 64,13 mg a 67,26 mg.

**Tabela 5.** Efeito de BAP e ANA sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose.

BAP ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Número de explantos inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)
1,25	1,25	15	100,0	0
1,25	5	15	100,0	0
2,5	5	30	86,7	13,3
5	1,25	15	100,0	0
5	2,5	15	100,0	0
5	5	15	100,0	0

**Tabela 6.** Efeito de BAP e ANA sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose.

BAP ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/ massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
1,25	1,25	918,73 a	65,80 ab	0,074 b	92,57 a
1,25	5	1311,66 ab	67,06 ab	0,054 a	94,55 b
2,5	5	1334,33 b	70,06 b	0,056 a	94,36 b
5	1,25	1170,93 ab	67,26 ab	0,058 a	94,13 b
5	2,5	1058,26 ab	64,13 ab	0,061 a	93,89 b
5	5	953,93 a	51,80 a	0,057 a	94,34 b

<sup>a</sup>Médias de no mínimo quinze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A maior razão massa seca/ massa fresca (0,074) e o menor teor de água (92,57%) foram dos calos crescidos no meio de cultura contendo 1,25  $\mu\text{M}$  de BAP com 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA e diferiram significativamente dos valores encontrados nos demais tratamentos.

O efeito de diferentes combinações de BAP e ANA sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos iniciados a partir e segmentos nodais cotiledonares, cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS, suplementado com 118 mM de frutose, pode ser visto



nas Tabelas 7 e 8. Todas as combinações de BAP e ANA testadas apresentaram 100% de calogênese (Tabela 7).

Os resultados da Tabela 8 mostram que os calos crescidos em meio de cultura contendo 1,25  $\mu\text{M}$  de BAP e 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA apresentaram a menor massa fresca (872,53g), a maior razão massa seca/ massa fresca (0,062) e o menor teor de água (93,79%), e diferiram significativamente apenas dos valores encontrados para os calos crescidos em meio e cultura contendo 2,5 de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para os valores de massa seca dos calos produzidos, que variaram de 50,73 mg a 65,06 mg.

**Tabela 7.** Efeito de BAP e ANA sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose.

BAP ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Número de explantos inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)
1,25	1,25	15	100,0	0
1,25	5	15	100,0	0
2,5	5	30	100,0	0
5	1,25	15	100,0	0
5	2,5	15	100,0	0
5	5	15	100,0	0

**Tabela 8.** Efeito de BAP e ANA sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose.

BAP (µM)	ANA (µM)	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/ massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
1,25	1,25	872,53 a	53,00 a	0,062 b	93,79 a
1,25	5	917,33 a	50,73 a	0,059 ab	94,08 ab
2,5	5	1332,83 b	63,03 a	0,050 a	94,98 b
5	1,25	1227,13 ab	65,33 a	0,054 ab	94,54 ab
5	2,5	1068,00 ab	62,06 a	0,060 ab	93,95 ab
5	5	1286,66 ab	65,06 a	0,054 ab	94,50 ab

<sup>a</sup>Médias de no mínimo quinze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1.2. Efeito da posição do explante sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

A Tabela 9 mostra o efeito da posição do explante sobre a morfogênese de calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura MS, suplementado com 59 mM de sacarose, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Os explantes inoculados na posição vertical apresentaram 86,7% de calogênese, enquanto que nos explantes inoculados na posição horizontal, a calogênese foi de apenas 63,3%. Houve ainda a calogênese com raízes em explantes inoculados na posição vertical, não tendo sido observado o mesmo nos explantes inoculados na posição horizontal.

Embora a frequência de calogênese tenha sido maior quando os explantes foram inoculados na posição vertical, a massa fresca e a massa seca formada foram menores do que as dos calos iniciados a partir explantes inoculados na posição horizontal. Contudo, não houve diferença significativa entre as posições dos explantes, no que se refere à massa fresca, massa seca, razão massa seca/ massa fresca e teor de água (Tabela 10).

**Tabela 9.** Efeito da posição do explante sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Posição do explante	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)
Vertical	30	86,7	6,7
Horizontal	30	63,3	0

**Tabela 10.** Efeito da posição do explante sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Posição do explante	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/ massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
Vertical	406,82 a	27,28 a	0,071 a	92,92 a
Horizontal	432,53 a	30,32 a	0,075 a	92,51 a

<sup>a</sup>Médias de no mínimo dezenove repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste T de Student (p< 0,05).

### 5.1.3. Efeito do tipo de explante, fontes de carbono e da presença e da ausência de luz sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

As Tabelas 11 e 12 mostram, respectivamente, o efeito da presença e da ausência da luz sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos iniciados a partir de diferentes tipos de explantes, cultivados em meio de cultura MS suplementado com 118 mM de sacarose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA. Como pode ser visto na Tabela 11, a maior frequência (entre 94% e 100%) de calogênese na luz ocorreu a partir de segmentos nodais cotiledonares e hipocótilos. No escuro, as maiores porcentagens de calogênese foram observadas a partir de nós apicais, cotiledonares e de hipocótilos. Segmentos foliares e segmentos de raiz tiveram baixa calogênese na presença da luz (20,4% e 27,8%, respectivamente), mas no escuro os valores foram de 73,3% e de

40%, respectivamente. Para segmentos de cotilédones, entretanto, as porcentagens de indução foram semelhantes, tanto na luz como no escuro. Segmentos apicais, segmentos cotiledonares e segmentos foliares formaram raízes nos calos, na luz e no escuro, sendo que, em ambas as condições a frequência foi maior a partir de segmentos cotiledonares (entre 30% e 32,5%). Calos obtidos a partir de nós cotiledonares e raiz não apresentaram rizogênese em nenhum dos tratamentos e calos de hipocótilo apresentaram baixa rizogênese (2,8%) na luz, mas nenhuma do escuro.

Apesar dos calos crescidos no escuro apresentarem massas frescas menores do que aqueles provenientes do mesmo tipo de explante cultivados na presença de luz, não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 12). Porém, em termos de massa seca, calos originados de nós cotiledonares e cotilédones, crescidos na luz, apresentaram massas secas superiores (87,88 mg e 62,13 mg, respectivamente) aos crescidos no escuro (59,8 mg e 34,90 mg, respectivamente). Calos originados de segmentos nodais cotiledonares, crescidos na presença ou ausência de luz, apresentaram massas frescas significativamente maior (938,76 mg e 823,60 mg, respectivamente) do que os calos formados a partir dos demais explantes, na mesma condição de cultivo, mas, considerando-se a massa seca observa-se que apenas os calos formados, a partir de nós cotiledonares, na luz, apresentaram massa seca superior a todos os outros tratamentos. As menores massas secas foram obtidas para os calos originados de raiz (entre 17,50 mg, no escuro e 23,70 mg, na luz) e de folha (23,10 mg no escuro e 32,90 mg na luz). Calos de nó cotiledonar, nó apical, cotilédone e hipocótilo, no escuro e calos de nó apical, cotilédone e hipocótilo, na luz apresentaram valores estatisticamente similares de massa seca, que variaram entre 35,13 mg e 62,13 mg. Na luz, os explantes de nó cotiledonar produziram os calos com maior massa seca, diferindo significativamente dos demais explantes, enquanto que, no escuro, explantes de nó cotiledonar, nó apical, cotilédone e hipocótilo, foram os que originaram calos com maior massa seca.

**Tabela 11.** Efeito da luz e escuro sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Condição	Explante	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)
Luz	Nó cotiledonar	18	94,4	0
	Folha	36	20,4	8,3
	Nó apical	17	65,6	11,1
	Cotilédone	40	27,8	32,5
	Hipocótilo	34	94,4	2,8
	Raiz	36	27,8	0
Escuro	Nó cotiledonar	15	100,0	0
	Folha	28	73,3	12,5
	Nó apical	15	93,3	6,7
	Cotilédone	30	23,3	30,0
	Hipocótilo	31	100,0	0
	Raiz	30	40,0	0

O teor de água dos calos e a razão massa seca/massa fresca variou de acordo com o tratamento, mas, para cada tipo de explante não houve diferença entre luz e escuro, exceto para explantes de cotilédones, em que o teor de água no escuro (89,39%) foi maior que o teor de água na luz (84,75%). Segmentos de folhas originaram calos que apresentaram os menores conteúdos de água (81,44% na luz e 83,51% no escuro) e os maiores valores de razão massa seca/massa fresca (0,185 na luz e 0,164 no escuro), em relação aos demais tratamentos, enquanto que os maiores valores de teor de água, e por conseguinte, os menores valores de razão massa seca/massa fresca foram observados para os calos originados a partir de hipocótilo, na luz e no escuro (91,55% e 93,14%, respectivamente), e de nó cotiledonar, no escuro (92,19%).

**Tabela 12.** Efeito da luz e escuro sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Condição	Explante	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
Luz	Nó cotiledonar	938,76 g	87,88 g	0,099 bc	90,06 cd
	Folha	181,60 a	32,90 abc	0,185 e	81,44 a
	Nó apical	440,15 abcde	44,30 bcdef	0,117 c	88,23 c
	Cotilédone	417,59 abcd	62,13 f	0,152 d	84,75 b
	Hipocótilo	661,45 bcdef	53,57 cdef	0,084 ab	91,55 de
	Raiz	239,20 a	23,70 ab	0,120 c	87,93 c
Escuro	Nó cotiledonar	823,60 fg	59,80 def	0,078 ab	92,19 de
	Folha	142,60 a	23,10 ab	0,164 de	83,51 ab
	Nó apical	391,6 ab	35,13 abcde	0,100 bc	89,93 cd
	Cotilédone	407,00 abc	34,90 abcd	0,106 bc	89,39 cd
	Hipocótilo	763,56 cdefg	51,37 cdef	0,068 a	93,14 e
	Raiz	173,08 a	17,50 a	0,104 bc	89,53 cd

<sup>a</sup>Médias de no mínimo dez repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O efeito da presença ou da ausência de luz sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos iniciados a partir de diferentes tipos de explantes, cultivados em meio de cultura MS, suplementado com 118 mM de glucose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA, é mostrado nas

Tabelas 13 e 14, respectivamente. Houve elevado percentual de calogênese a partir de segmentos nodais cotiledonares (88,9% e 100%), segmentos apicais (100%), hipocótilo (100%) e de raiz (97,25 e 100%), tanto na presença quanto na ausência de luz durante o período de cultivo (Tabela 13). Para explantes de folhas, as frequências de indução de calos variaram entre 42,8%, na luz, e 63,9%, no escuro e para explantes de cotilédone variaram entre 38,9%, no escuro e 60,7% na luz. Na presença de luz, segmentos foliares formaram 57,2% de calos com raízes e segmentos cotiledonares formaram 31,0% de calos com raízes, enquanto na ausência de luz estes explantes formaram, respectivamente, 36,1% e 61,1% de calos com raízes. Nos calos provenientes de explantes de nós apicais e hipocótilo, na luz, não formaram raízes, assim como os originados a partir de nó cotiledonar, nó apical, hipocótilo e raiz, no escuro.

Na Tabela 14 é possível verificar que os calos originados de segmentos nodais cotiledonares, apicais e de hipocótilo apresentaram os maiores valores de massa fresca (variando entre 830,60 mg e 1203,7 mg), não diferindo entre si significativamente, tanto na luz como no escuro. Mas, em termos de massa seca observa-se que, o maior valor foi obtido para calos produzidos a partir de segmentos de nó apical (82,21 mg), na luz, e esse valor diferiu apenas dos valores verificados para calos de raiz, cultivados na luz (25,40 mg) e de folhas, e de raiz, cultivados no escuro (25,10 mg e 23,40 mg, respectivamente), que foram os menores valores de massa seca observados. Para cada tipo de explante, não houve diferença significativa entre as massas frescas e entre as massas secas dos calos, tanto na luz como no escuro. No escuro, não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de massa seca dos calos produzidos pelos diferentes explantes.

**Tabela 13.** Efeito da luz e escuro sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Condição	Explante	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)
Luz	Nó cotiledonar	18	88,9	11,1
	Folha	32	42,8	57,2
	Nó apical	18	100,0	0
	Cotilédone	38	60,7	31,0
	Hipocótilo	48	100,0	0
	Raiz	38	97,2	2,8
Escuro	Nó cotiledonar	10	100,0	0
	Folha	20	63,9	36,1
	Nó apical	10	100,0	0
	Cotilédone	18	38,9	61,1
	Hipocótilo	20	100,0	0
	Raiz	20	100,0	0

Os calos formados a partir de segmentos de raiz, cultivados na luz ou no escuro, apresentaram a menor razão massa seca/ massa fresca (0,0397) e o maior teor de água (96,02%) e diferiram apenas dos calos originados de folhas, que apresentaram a maior razão massa seca/ massa fresca (0,143) e o menor teor de água (85,74%). Os valores de teor de água e da razão entre massa seca e massa fresca, obtidos para os calos originados de segmentos foliares cultivados na presença de luz, diferiram significativamente dos observados para calos de nó cotiledonar, hipocótilo e raiz, na luz e de calos de hipocótilo e raiz, no escuro. Para cada tipo de explante, não houve diferença significativa nos teores de água dos calos crescidos na luz ou no escuro.



**Tabela 14.** Efeito da luz e escuro sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Condição	Explante	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/ massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
Luz	Nó cotiledonar	1203,77 e	63,77 abcd	0,056 abcdefg	94,43 b
	Folha	486,81 ab	68,00 abcd	0,143 bcdefgh	85,74 a
	Nó apical	1145,77 e	82,21 d	0,092 abcdefgh	90,81 ab
	Cotilédone	647,90 abcd	53,90 abcd	0,083 abcdefgh	91,67 ab
	Hipocótilo	955,70 cde	43,00 abcd	0,046 abc	95,40 b
	Raiz	505,25 ab	25,40 ab	0,053 abcde	94,66 b
Escuro	Nó cotiledonar	1120,60 e	46,00 abcd	0,042 ab	95,75 ab
	Folha	334,30 a	25,10 a	0,077 abcdefgh	92,29 ab
	Nó apical	830,60 bcde	37,80 abcd	0,049 abcd	95,12 ab
	Cotilédone	542,40 ab	29,60 abc	0,055 abcdef	94,46 ab
	Hipocótilo	856,80 bcde	34,30 abcd	0,041 a	95,86 b
	Raiz	617,30 abc	23,40 a	0,0397 a	96,02 b

<sup>a</sup>Médias de no mínimo dez repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As Tabelas 15 e 16 mostram, respectivamente, o efeito da presença e da ausência de luz sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS, suplementado

com 118 mM de frutose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Na Tabela 15 é possível observar que a indução de calos a partir de segmentos nodais cotiledonares, segmentos apicais, hipocótilo e raiz foi de 100%, tanto na luz como no escuro. As menores taxas de indução de calos foram observadas a partir de segmentos de cotilédone (50%, na luz e 40%, no escuro). Para explantes de folhas a porcentagem de indução de calos na luz foi de 73,3% e no escuro de 56,7%. Segmentos foliares formaram 26,7% de calos com raízes na presença de luz e 43,3% de calos com raízes na ausência de luz. Na presença de luz durante o período de cultivo, 50% dos calos formados a partir de segmentos cotiledonares possuíam raízes, e na ausência da luz esse percentual foi de 60%. Não foi observada formação de raízes nos calos originados a partir dos demais explantes.

**Tabela 15.** Efeito da luz e escuro sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Condição	Explante	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)
Luz	Nó cotiledonar	18	100,0	0
	Folha	32	73,3	26,7
	Nó apical	18	100,0	0
	Cotilédone	36	50,0	50,0
	Hipocótilo	38	100,0	0
	Raiz	38	100,0	0
Escuro	Nó cotiledonar	14	100,0	0
	Folha	30	56,7	43,3
	Nó apical	15	100,0	0
	Cotilédone	30	40,0	60,0
	Hipocótilo	28	100,0	0
	Raiz	30	100,0	0

Na Tabela 16 observa-se que as massas frescas dos calos originados de nó cotiledonar (1034,44 mg), na luz, e de nó cotiledonar (1211,42 mg), nó apical (949,80 mg) e hipocótilo (907,80 mg), no escuro, foram superiores aos valores obtidos para calos de folha (499,18

mg), cotilédone (583,43 mg) e raiz (337,30 mg), na luz, e de folha (406,18 mg), cotilédone (556,25 mg) e raiz (606,93 mg), no escuro. Entretanto, quando considera-se a massa seca dos calos, os maiores valores, variando entre 42,33 mg e 50,71 mg, foram obtidos com calos produzidos a partir de nó cotiledonar, folha, nó apical e cotilédone, na luz, e a partir de nó cotiledonar e nó apical, no escuro. Os menores valores de massa seca, entre 17,95 mg e 26,18 mg, foram produzidos por calos de raiz, cultivados tanto na luz quanto no escuro. Em termos de massa fresca, para cada tipo de explante, não foram detectadas diferenças entre os calos produzidos na luz e no escuro, mas, em termos de massa seca verifica-se que, calos de folhas e de cotilédones crescidos na luz apresentaram massas secas maiores (43,95 mg e 50,70 mg, respectivamente) do que os calos dos mesmos explantes crescidos no escuro (23,81 mg e 33,93 mg, respectivamente).

Os teores de água dos calos produzidos no escuro, a partir de explantes de folha e cotilédones, foram superiores (93,70% e 93,71%, respectivamente) aos dos calos cultivados na luz (90,95% e 90,78%, respectivamente). Para os demais explantes, não foram detectadas diferenças significativas entre luz e escuro. Calos de nó cotiledonar e hipocótilo, cultivados na luz, e calos de nó cotiledonar, hipocótilo e raiz, cultivados no escuro, apresentaram os maiores valores de teor de água, que não diferiram significativamente entre si e variaram de 94,92% a 96,53%, enquanto que os calos de segmentos foliares e de segmentos cotiledonares, cultivados na luz, apresentaram os menores teores de água (90,95% e 90,78%, respectivamente) e os maiores valores de razão entre massa seca e massa fresca.

**Tabela 16.** Efeito da luz e escuro sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Condição	Explante	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
Luz	Nó cotiledonar	1034,44 fg	50,50 e	0,051 abc	94,92 bcd
	Folha	499,18 ab	43,95 de	0,090 d	90,95 a
	Nó apical	744,05 bcdef	43,72 de	0,059 c	94,12 b
	Cotilédone	583,43 abcd	50,70 e	0,092 d	90,78 a
	Hipocótilo	823,25 cdef	31,90 bcd	0,039 ab	96,05 cd
	Raiz	337,30 a	17,95 a	0,052 bc	94,81 bc
Escuro	Nó cotiledonar	1211,42 g	50,71 e	0,048 abc	95,24 bcd
	Folha	406,18 ab	23,81 ab	0,063 c	93,70 b
	Nó apical	949,80 efg	42,33 cde	0,052 bc	94,75 bc
	Cotilédone	556,25 abcd	33,93 bcd	0,063 c	93,71 b
	Hipocótilo	907,80 defg	30,12 abc	0,035 a	96,53 d
	Raiz	606,93 abcde	26,18 ab	0,047 abc	95,30 bcd

<sup>a</sup>Médias de no mínimo quatorze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 5.1.4. Efeito de diferentes fontes de carbono e do tempo de cultivo sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

As Tabelas 17 e 18 mostram, respectivamente, o efeito de diferentes concentrações de glicose sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados em meio de cultura MS, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, após 4 e 8 semanas de cultivo. Em meio de cultura contendo glicose (Tabela 17), a calogênese foi de 86,7 – 100%, após 4 semanas de cultivo e entre 80 – 100%, após 8 semanas de cultivo. No período mais longo de cultivo, houve a formação de raízes em 13,3% dos calos crescidos em meio de cultura contendo 88,5 mM de glicose e em 16,7% dos calos crescidos no tratamento contendo 118 mM do mesmo açúcar.

**Tabela 17.** Efeito da glicose e do período de cultivo sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Glucose (mM)	Tempo (semanas)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	Formação de raízes (%)
59	4	30	86,7	0	0
	8	15	100	0	0
88,5	4	30	93,3	0	0
	8	15	80,0	13,3	0
118	4	30	100	0	0
	8	15	73,3	16,7	0

Na Tabela 18 é possível verificar que, após 4 e 8 semanas de cultivo, as massas frescas dos calos formados no meio de cultura suplementado com 118 mM de glicose (1115,53 mg e 1376,73 mg, respectivamente) e, após 8 semanas, na presença de 88,5 mM de glicose (1374,5 mg) foram significativamente superiores em relação aos valores de massa fresca obtidos, tanto após 4 e 8 semanas, nos tratamentos com 59 mM de glicose no meio de cultura com glicose 59 mM (625,6 mg e 915,2 mg, respectivamente), como após 4 semanas em 88,5 mM de glicose (819,06 mg). Também houve diferença

significativa entre os tratamentos, tanto para os valores de massa seca como para os valores de teor de água dos calos. Assim, o maior valor de massa seca (79,06 mg) foi obtido com 118 mM de glucose, após 8 semanas de cultivo, decrescendo significativamente nos tratamentos com 88,5 mM e 59 mM de glucose. O mesmo padrão de resposta foi observado para o período de cultivo de 4 semanas. É possível observar que em todos os tratamentos, os calos produzidos com o período de cultivo de 8 semanas apresentaram massas secas superiores em relação aos calos cultivados em 4 semanas. Quanto ao teor de água, é possível observar que calos cultivados por 8 semanas, na presença de 118 mM de glucose, tiveram o teor de água reduzido (94,01%) em relação aos demais tratamentos (95,16% a 95,83%) e, por conseguinte, maior razão massa seca/massa fresca (0,05). Entre os demais tratamentos não foram detectadas diferenças significativas.

**Tabela 18.** Efeito da glucose e do período de cultivo sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Glucose (mM)	Tempo (semanas)	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
59	4	625,6 a	24,8 a	0,0410 a	95,83 b
	8	915,2 ab	39,73 b	0,0449 a	95,50 b
88,5	4	819,06 ab	36,33 b	0,0453 a	95,46 b
	8	1374,5 c	58,07 c	0,0449 a	95,50 b
118	4	1115,53 bc	51,26 c	0,0483 a	95,16 b
	8	1376,73 c	79,06 d	0,0500 b	94,01 c

<sup>a</sup>Médias de no mínimo quatorze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O efeito do período de cultivo e de diferentes concentrações de frutose sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos iniciados a partir segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura MS, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, é demonstrado nas Tabelas 19 e 20. O meio de cultura suplementado com frutose (Tabela 19) induziu a melhor calogênese, entre 86,7 – 100%, em

ambos os períodos de cultivo. Os tratamentos com frutose também apresentaram baixo índice de formação de raízes nos calos, apenas 6,7%, no meio de cultura suplementado com 59 mM de frutose.

**Tabela 19.** Efeito da frutose e do período de cultivo sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Frutose (mM)	Tempo (semanas)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	Formação de raízes (%)
59	4	30	86,7	0	0
	8	16	86,7	6,7	0
88,5	4	30	100	0	0
	8	15	100	0	0
118	4	30	100	0	0
	8	15	100	0	0

O aumento da concentração de frutose no meio de cultura não provocou aumento significativo da massa fresca dos calos, após 4 semanas de cultivo (Tabela 20). Porém, em termos de massa seca é possível observar que os calos crescidos com 88,5 mM ou com 118 mM de frutose apresentaram massas secas superiores (37,86 mg e 39,06 mg, respectivamente) em relação ao tratamento com 59 mM de frutose (21,69 mg). Após 8 semanas de cultivo, a massa fresca obtida no tratamento com 118 mM de frutose (1629,5 mg) foi significativamente maior do que o valor obtido com o tratamento contendo 59 mM de frutose (1081,33 mg), mas não diferiu significativamente do tratamento com 88,5 mM. Entretanto, com 8 semanas de cultivo, foram detectadas diferenças significativas entre as massas secas dos calos, em todas as concentrações de frutose, sendo que o maior valor (74,4 mg) foi observado com 118 mM de frutose. Observa-se que calos cultivados por 8 semanas, com 50 mM de frutose, apresentaram massas secas estatisticamente semelhantes aos calos de 4 semanas produzidos na presença de 88,5 mM e 118 mM de sacarose. Os maiores teores de água dos calos (96,24% e 96,14%, respectivamente), assim como os menores valores de razão entre as massas seca e fresca (0,037 e 0,038, respectivamente) foram observados no tratamentos com 59 mM de frutose, tanto com 4 como com 8 semanas de cultivo, sendo que esses

valores diferiram significativamente do obtido com 118 mM de frutose e 8 semanas de cultivo (95,19% de teor de água e 0,048 de razão massa seca/massa fresca).

**Tabela 20.** Efeito da frutose e do período de cultivo sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Frutose (mM)	Tempo (semanas)	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
59	4	584,46 a	21,69 a	0,037 a	96,24 b
	8	1081,33 bc	39,46 b	0,038 a	96,14 b
88,5	4	945,26 ab	37,86 b	0,040 ab	95,93 ab
	8	1418,40 cd	60,26 c	0,043 ab	95,61 ab
118	4	925,73 ab	39,06 b	0,043 ab	95,66 ab
	8	1629,53 d	74,40 d	0,048 b	95,19 a

<sup>a</sup>Médias de no mínimo treze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O efeito de diferentes concentrações de sacarose sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados em meio de cultura MS, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, após 4 e 8 semanas de cultivo, é demonstrado nas Tabelas 21 e 22, respectivamente. O meio de cultura contendo sacarose (Tabela 21) apresentou a menor quantidade de calos formados, entre 20 – 26,7%, após 4 semanas de cultivo, e entre 30 e 46,7% após 8 semanas de cultivo. No entanto, os explantes inoculados neste meio de cultura apresentaram maior calogênese com raízes (3,3 – 16,7%) ou apenas a formação de raízes, sem calogênese (6,7 – 36,7%).



**Tabela 21.** Efeito da sacarose e do período de cultivo sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Sacarose (mM)	Tempo (semanas)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	Formação de raízes (%)
59	4	30	26,7	0	0
	8	30	46,7	0	0
88,5	4	30	26,7	3,3	6,7
	8	30	46,7	3,3	13,3
118	4	30	20,0	3,3	26,7
	8	30	30,0	16,7	36,7

Para a avaliação de crescimento dos calos, foram inoculados 30 explantes em cada tratamento, sendo que 15 deles seriam coletados ao final de 4 semanas de cultivo e os demais, após 8 semanas de cultivo. No entanto, os tratamentos suplementados com sacarose apresentaram índices muito baixos de calogênese e por esta razão o crescimento de calos destes tratamentos foi avaliado apenas após 8 semanas de cultivo. O aumento de concentração de sacarose no meio de cultura não levou a um aumento significativo da massa fresca dos calos (Tabela 22), porém houve diferença significativa entre as massas secas dos calos dos diferentes tratamentos, sendo que, os calos crescidos em meio de cultura com 59 mM e 88,5 mM apresentaram massas secas menores (51,13 mg e 65,46 mg, respectivamente) do que os crescidos na presença de 118 mM de sacarose (87,14 mg). Em termos do teor de água observa-se que os calos produzidos em 85,5 mM e 118 mM de sacarose apresentaram teores de água reduzidos (90,99% e 91,14%, respectivamente) em relação ao tratamento de 59 mM de sacarose (93,34%) e, conseqüentemente, os maiores valores de razão entre massa seca e massa fresca.

**Tabela 22.** Efeito da sacarose sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Sacarose (mM)	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
59	841,07 a	51,14 a	0,066 a	93,34 b
88,5	800,0 a	65,46 a	0,088 b	91,14 a
118	1107,14 a	87,14 b	0,090 b	90,99 a

<sup>a</sup>Médias de no mínimo quatorze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A Tabela 23 compara os dados de crescimento dos calos cultivados, durante 8 semanas, em meios de cultura contendo diferentes concentrações de glicose, frutose ou sacarose. É possível observar que o maior valor de massa fresca dos calos foi obtido em meio de cultura contendo 118 mM de frutose (1629,53 mg), mas esse valor não diferiu estatisticamente dos valores obtidos com 88,5 mM de frutose (1418,4 mg) e dos observados com 88,5 mM e 118 mM de glicose (1374,50 mg e 1376,73 mg, respectivamente). Os tratamentos contendo 59 mM ou 88,5 mM de sacarose apresentaram os menores valores de massa fresca (841,0 mg e 800,0 mg, respectivamente). No entanto, a maior massa seca (87,14 mg) e o menor teor de água (90,99%), com a maior razão massa seca/massa fresca (0,090) foram verificados nos calos crescidos em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose. Esse valor de massa seca, contudo, não diferiu significativamente dos valores obtidos com frutose ou glicose 118 mM (74,4 mg e 79,06 mg, respectivamente). Calos com os menores valores de massa seca (entre 39,46 mg e 51,14 mg) foram produzidos nos tratamentos com 59 mM de sacarose, frutose ou glicose. Os menores teores de água dos calos foram observados nos tratamentos com 88,5 mM e 118 mM de sacarose, com os maiores valores de razão massa seca/massa fresca, e os maiores teores (entre 94,01% e 96,14%) em todas as concentrações de frutose e glicose.

**Tabela 23.** Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Fonte de Carbono	Concentração (mM)	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
Sacarose	59	841,0 a	51,14 ab	0,066 c	93,34 b
	88,5	800,0 a	65,46 bcd	0,088 d	91,14 a
	118	1107,14 abc	87,14 e	0,090 d	90,99 a
Frutose	59	1081,33 abc	39,46 a	0,038 a	96,14 d
	88,5	1418,40 cd	60,26 bc	0,043 ab	95,61 cd
	118	1629,53 d	74,40 cde	0,048 ab	95,19 cd
Glucose	59	915,20 ab	39,73 a	0,045 ab	95,50 cd
	88,5	1374,50 bcd	58,07 bc	0,045 ab	95,50 cd
	118	1376,73 bcd	79,06 de	0,059 bc	94,01 bc

<sup>a</sup>Médias de no mínimo treze repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1.5. Efeito de diferentes fontes de carbono e da glutamina sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

O efeito de diferentes concentrações de glucose e da glutamina sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos indicados iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS, suplementado com 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA é demonstrado nas Tabelas 24 e 25, respectivamente. Nos tratamentos suplementados com 59 mM ou 118 mM de glucose e 2,73 mM de glutamina a máxima porcentagem de calogênese observada foi de 66,7%, enquanto que nos tratamentos sem glutamina as porcentagens

variaram entre 73,3% e 100% (Tabela 24). Assim, enquanto que no tratamento com 59 mM de glucose foram formados calos em 100% dos explantes, no mesmo tratamento, com a adição de glutamina, apenas 66,7% dos explantes apresentaram calogênese. Efeito semelhante foi observado no tratamento com 118 mM de glucose. No entanto, no tratamento contendo 88,5 mM de glucose com 2,73 mM de glutamina foram formados 86,7% de calos, enquanto que o mesmo tratamento sem a glutamina induziu 80% de calogênese. A formação de raízes nos calos foi observada em 13,3% e 16,7% das culturas crescidas com 88,5 mM e 118 mM de glucose, na ausência de glutamina, e em 13,3% das culturas mantidas em 88,5 mM de glucose, na presença de glutamina. Não foi observada a formação de raízes diretamente a partir do explante em nenhum dos tratamentos.

**Tabela 24.** Efeito de concentrações de glucose e glutamina sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Glucose (mM)	Glutamina (mM)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	Formação de raízes (%)
59	0	15	100	0	0
88,5	0	15	80,0	13,3	0
118	0	15	73,3	16,7	0
59	2,73	15	66,7	0	0
88,5	2,73	15	86,7	13,3	0
118	2,73	15	56,7	0	0

A adição de 2,73 mM de glutamina aos tratamentos contendo glucose também resultou em valores de massa fresca significativamente menores, em comparação aos mesmos tratamentos sem a glutamina, como pode ser observado na Tabela 25. Em termos de massa seca observa-se que para a concentração de glucose de 59 mM a adição de glutamina não alterou significativamente o crescimento dos calos, sendo que os valores variaram de 32,70 mg a 39,73 mg. Contudo, nas concentrações de 88,5 mM e 118 mM a adição de glutamina inibiu o crescimento dos calos, que apresentaram massas secas de 41,73 mg e 46,00 mg, respectivamente. Assim, o maior valor de massa seca dos

calos (79,06 mg) foi obtido com 118 mM de glicose, na ausência de glutamina. O teor de água dos calos, nos tratamentos com glicose contendo glutamina, foi significativamente menor do que aqueles dos tratamentos sem glutamina, exceto para 118 mM de glicose, cujo valor não diferiu do obtido no tratamento com 59 mM de glicose, com glutamina. Dessa forma, os valores de razão massa seca/ massa fresca dos calos crescidos em meio contendo 88,5 mM e 118 mM de glicose e glutamina foram maiores do que os tratamentos desprovidos de glutamina.

**Tabela 25.** Efeito de concentrações de glicose e glutamina sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Glicose (mM)	Glutamina (mM)	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/ massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
59	0	915,20 b	39,73 ab	0,045 a	95,50 e
88,5	0	1374,50 c	58,07 c	0,045 a	95,50 d
118	0	1376,73 c	79,06 d	0,059 b	94,01 c
59	2,73	530,2 a	32,70 a	0,063 bc	93,61 bc
88,5	2,73	581,7 a	41,73 ab	0,077 cd	92,26 ab
118	2,73	593,2 a	46,00 b	0,080 d	91,99 a

<sup>a</sup>Médias de no mínimo dez repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As Tabelas 26 e 27 mostram, respectivamente, o efeito de diferentes concentrações de frutose e da glutamina sobre a morfogênese e o crescimento de calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Na Tabela 26 verifica-se que a menor porcentagem de indução de calos (66,7%) foi obtida com 59 mM de frutose e 2,73 mM, sendo que nos demais tratamentos as porcentagens de indução variaram de 86,7% a 100%, tanto na presença como na ausência de glutamina. A formação de raízes nos calos (6,7%) ocorreu apenas em dois tratamentos, com 59 mM de

frutose sem glutamina e com 88,5 mM de frutose com glutamina. Não foi observada a formação de raízes diretamente nos explantes.

Os valores de massa fresca (Tabela 27) foram significativamente maiores nos tratamentos contendo 88,5 e 118 mM de frutose sem glutamina (1418,40g e 1629,53g, respectivamente), contudo o maior valor de massa seca (74,40 mg) foi observado na concentração de 118 mM, na ausência de glutamina. Na concentração de 59 mM de frutose a adição de glutamina não interferiu no crescimento dos calos, em termos de massa seca, mas nos tratamentos de 88,5 mM e 118 mM, a presença de glutamina reduziu o crescimento e os valores decresceram para 40,93 mg e 57,33 mg, respectivamente. Em todas as concentrações de frutose, os teores de água dos calos crescidos na ausência de glutamina foram superiores aos dos crescidos na presença de glutamina. Os menores teores de água e os maiores valores de razão massa seca/massa fresca foram observados nos tratamentos de 88,5 mM e 118 mM de frutose, com glutamina, sendo que o valor obtido para 59 mM de frutose, com glutamina não diferiu estatisticamente do observado com 118 mM, sem glutamina.

**Tabela 26.** Efeito de concentrações de frutose e glutamina sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Frutose (mM)	Glutamina (mM)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	Formação de raízes (%)
59	0	16	86,7	6,7	0
88,5	0	15	100	0	0
118	0	30	100	0	0
59	2,73	15	66,7	0	0
88,5	2,73	15	93,3	6,7	0
118	2,73	15	100,0	0	0

**Tabela 27.** Efeito de concentrações de frutose e glutamina sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Frutose (mM)	Glutamina (mM)	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/ massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
59	0	1081,33 ab	39,46 a	0,038 a	96,14 c
88,5	0	1418,40 cd	60,26 b	0,043 ab	95,61 bc
118	0	1629,53 d	74,40 c	0,048 ab	95,19 bc
59	2,73	692,80 ab	34,40 a	0,051 bc	94,82 ab
88,5	2,73	668,70 a	40,93 a	0,062 c	93,70a
118	2,73	1003,00 ab	57,33 b	0,060 c	93,90 a

<sup>a</sup>Médias de no mínimo dez repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O efeito de diferentes concentrações de sacarose e da glutamina sobre a morfogênese e sobre o crescimento de calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados durante 8 semanas em meio MS, suplementado com 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA, podem ser vistos nas Tabelas 28 e 29. Na concentração de 59 mM de sacarose, a adição de 2,73 M de glutamina ao meio de cultura reduziu para 13,3% a porcentagem de explantes que formaram calos, enquanto que nas demais concentrações de sacarose a produção de calos variou entre 46,7% e 53,3%, na presença ou ausência de glutamina (Tabela 26).

**Tabela 28.** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre a morfogênese de calos de *Cedreia fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Sacarose (mM)	Glutamina (mM)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	Formação de raízes (%)
59	0	30	46,7	0	0
88,5	0	30	46,7	3,3	13,3
118	0	30	30,0	16,7	36,7
59	2,73	30	13,3	3,3	3,3
88,5	2,73	30	53,3	13,3	0
118	2,73	30	53,3	3,3	0

Na Tabela 29, é possível observar uma redução significativa da massa fresca (362,8 mg) no tratamento com 59 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina, quando comparado com os tratamentos com 88,5 mM e 118 mM de sacarose, sem glutamina e com 118 mM de sacarose, com glutamina. O maior valor de massa fresca (1107,14 mg) foi obtido no tratamento com 118 mM de sacarose, na ausência de glutamina, mas esse valor não diferiu dos valores verificados nas demais concentrações de sacarose, sem glutamina. O maior valor de massa seca (87,14 mg) também foi obtido nesse tratamento, mas foi estatisticamente semelhante aos valores observados com 88,5 mM de sacarose, sem glutamina (65,46 mg) e com 118 mM de sacarose, com glutamina (65,24 mg). Na concentração de sacarose de 59 mM, com glutamina, a massa seca dos calos foi menor do que as dos calos crescidos com 118 mM de sacarose, na ausência de glutamina, não diferindo significativamente do valor verificado para 88,5 mM de sacarose, com glutamina. Quanto ao teor de água dos calos observa-se que o menor valor (90,6%), assim como o maior valor de razão entre massa seca e massa fresca (0,093) ocorreu 88,5 mM de sacarose, com glutamina. Esse valor não diferiu dos demais tratamentos, exceto quando os calos foram cultivados em 59 mM de sacarose, sem glutamina.



**Tabela 29.** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Sacarose (mM)	Glutamina (mM)	Massa Fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa Seca (mg) <sup>a</sup>	Razão massa seca/massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
59	0	841,0 ab	51,14 ab	0,066 a	93,34 bcd
88,5	0	800,0 ab	65,46 bc	0,088 b	91,14 abc
118	0	1107,14 b	87,14 c	0,090 b	90,99 a
59	2,73	362,8 a	32,0 a	0,089 ab	91,06 ab
88,5	2,73	629,1 a	55,44 ab	0,093 b	90,6 a
118	2,73	636,9 a	65,24 bc	0,107 b	91,06 ab

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1.6. Efeito de formulações salinas de meio de cultura, diferentes fontes de carbono e diferentes concentrações de glutamina sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

Segmentos nodais cotiledonares foram inoculados em meios de cultura preparados a partir de diferentes formulações salinas (MS, WPM, B5, W, SH, K ou AR) combinadas com 118 mM de glucose, frutose ou sacarose, diferentes concentrações de glutamina e suplementados com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Após 8 semanas de cultivo, apenas o meio de cultura MS apresentou frequência de calogênese suficiente para prover os resultados que pudessem ser submetidos à análise estatística. A Tabela 30 mostra a porcentagem de calos formados nos diferentes tratamentos no meio de cultura MS. Assim como foi observado no experimento anterior, os meios de cultura suplementados com sacarose apresentaram os índices mais baixos de calogênese, variando entre 53,3% e 80%, sendo que o tratamento contendo 2,73 mM de glutamina induziu a maior calogênese (80%). Os tratamentos contendo glucose ou frutose como fonte de carbono induziram 100% de calogênese, exceto o tratamento contendo frutose e 4,10 mM de glutamina. Não houve formação de raízes diretamente do

explante em nenhum dos tratamentos e a calogênese com raízes foi observada apenas no meio de cultura suplementado com sacarose e 2,73 mM de glutamina (6,7%).

**Tabela 30.** Efeito de fontes de carbono e glutamina sobre a morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Fonte de Carbono (118 mM)	Glutamina (mM)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	Formação de raízes (%)
Sacarose	0	15	66,7	0	0
	2,73	15	80	6,7	0
	4,10	15	53,3	0	0
Glucose	0	15	100	0	0
	2,73	15	100	0	0
	4,10	15	100	0	0
Frutose	0	15	100	0	0
	2,73	15	100	0	0
	4,10	15	86,7	0	0

Na Tabela 31 observa-se que na presença de sacarose e glucose, a adição de 4,10 mM de glutamina reduziu o crescimento dos calos em massa fresca (276,6 mg e 578,9 mg, respectivamente) e massa seca (35,8 mg e 41,9 mg, respectivamente) em relação aos mesmos tratamentos desprovidos de glutamina (1048,2 mg e 1291,9 mg de massa fresca, respectivamente e 77,8 mg e 61,1 mg de massa seca, respectivamente). Assim, a massa seca dos calos foi igualmente afetada pela adição de glutamina ao meio de cultura, sendo possível observar a redução desses valores à medida que aumenta a concentração de glutamina no meio de cultura, exceto para frutose. Na presença de frutose não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de glutamina. Apenas no tratamento com sacarose a concentração de 2,73 mM de glutamina reduziu significativamente o crescimento dos calos, em massa seca, em relação ao tratamento desprovido de glutamina, nas demais fontes de carbono os valores obtidos na ausência e na presença dessa concentração de glutamina não

apresentaram diferença significativa. Com relação à massa fresca, contudo, observa-se que ocorreram reduções no crescimento em meio de cultura contendo 2,73 mM de glutamina, quando comparado com a ausência de glutamina, apenas nos tratamentos com sacarose e glucose. A suplementação do meio de cultura com glutamina provocou uma redução no teor de água dos calos. Observa-se que, na concentração de 4,10 mM de glutamina, em todas as fontes de carbono houve redução dos valores, quando comparado com os mesmo tratamentos desprovidos de glutamina. Os calos crescidos em meio de cultura contendo sacarose e 4,10 mM de glutamina apresentaram apenas 86,7% de água, o menor valor entre os tratamentos. Os valores de razão entre massa seca e massa fresca também foram superiores nos tratamentos com sacarose e glutamina nas concentrações de 2,73 mM e 4,10 mM.

Quando se compara os dados de todos os tratamentos verifica-se que na presença de glucose, sacarose ou frutose, sem glutamina, foram produzidos os calos com as maiores massas frescas (variando de 1036,13 mg a 1291,9 mg), mas, em termos de massa seca valores superiores foram obtidos apenas com sacarose e glucose (77,8 mg e 61,1 mg, respectivamente). Entretanto, o valor obtido para glucose foi maior apenas em relação aos tratamentos com 4,10 mM de glutamina, tanto com sacarose como com glucose, não diferindo das massas secas produzidas com frutose. Para os tratamentos com glutamina, o crescimento dos calos, tanto em massa fresca como em massa seca, foi semelhante independente da fonte de carbono.

**Tabela 31.** Efeito de fontes de carbono e de concentrações de glutamina sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Fontes de carbono (118 mM)	Glutamina (mM)	Massa fresca (mg) <sup>a</sup>	Massa seca (mg) <sup>a</sup>	Massa seca/massa fresca <sup>a</sup>	Teor de água (%) <sup>a</sup>
Sacarose	0	1048,2 bc	77,8 c	0,075 b	92,4 c
	2,73	520,7 a	53,8 ab	0,109 c	89,1 b
	4,10	276,6 a	35,8 a	0,133 d	86,7 a
Glucose	0	1291,9 c	61,1 bc	0,053 a	94,7 d
	2,73	693,1 ab	45,9 ab	0,068 ab	93,1 cd
	4,10	578,9 a	41,9 a	0,076 b	92,3 c
Frutose	0	1036,13 bc	51,7 ab	0,052 a	94,8 d
	2,73	655,1 ab	44,1 ab	0,070 b	92,9 c
	4,10	739,2 ab	46,5 ab	0,070 b	93,0 c

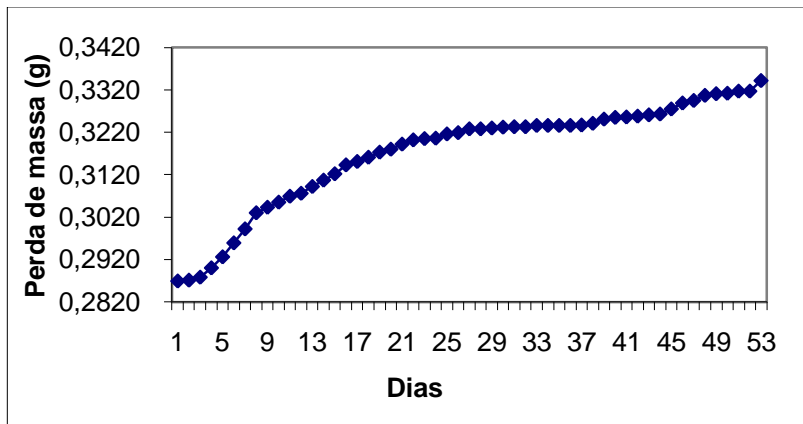
<sup>a</sup>Médias de no mínimo oito repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.2. DISSIMILAÇÃO DO AÇÚCAR DO MEIO DE CULTURA DURANTE O CRESCIMENTO DOS CALOS DE *CEDRELA FISSILIS*

A determinação do crescimento dos calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, foi realizada através da metodologia de dissimilação do açúcar do meio de cultura, proposto por Schripsema (1990), que leva em conta a perda de peso das culturas ao longo do período de cultivo.

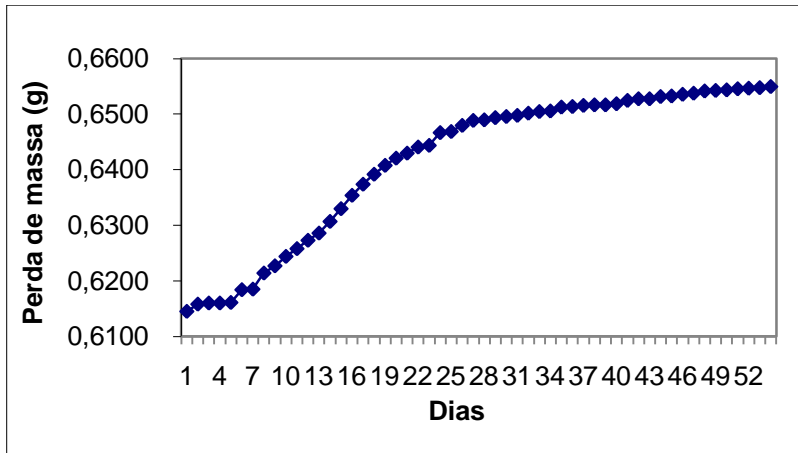
A Figura 3 representa o crescimento dos calos em meio de cultura suplementado com frutose. Entre o 1º e o 4º dia de cultivo, as culturas apresentaram pouco crescimento, correspondendo à fase *lag*, onde as células do explante se preparam para entrar em divisão. Entre o 5º e o 9º dia as células entram na fase de crescimento exponencial, no qual a taxa de divisão celular é máxima. A partir do 10º dia, o crescimento dos calos continua, mas o ritmo é reduzido. Entre o 26º e o 38º dia a cultura apresenta um período estacionário, seguido por um novo pequeno

crescimento até o final do cultivo. A cultura apresentou uma perda de 0,0473 g de massa ao longo do cultivo, e a massa do calo ao final do cultivo foi de 1,536 g (Tabela 32).



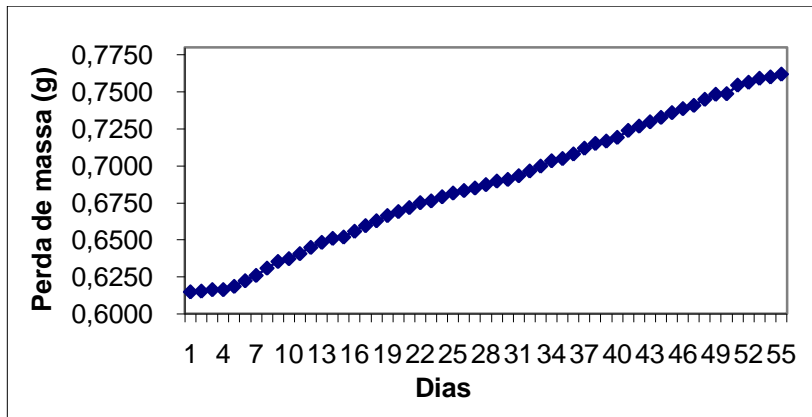
**Figura 3:** Crescimento relacionado à dissimilação em calos de *C. fissilis* cultivados durante 53 dias, em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

O crescimento de calos em meio de cultura suplementado com frutose e glutamina está representado na Figura 4. A fase *lag* das culturas ocorre durante os primeiros cinco dias de cultivo e é seguida de um crescimento exponencial entre o 6º e o 24º dia. Após o 25º dia de cultivo, a cultura cessa o crescimento e entra em um período estacionário. A perda de massa ocorrida durante o cultivo foi de 0,0405 g e a massa de calo formada ao final do período de cultivo foi de 0,490 g (Tabela 32).



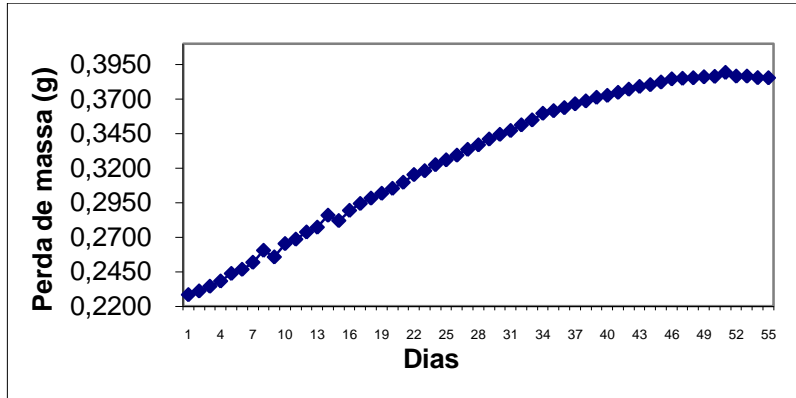
**Figura 4:** Crescimento relacionado à dissimilação em calos de *C. fissilis* cultivados durante 54 dias, em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

A Figura 5 representa o crescimento dos calos em meio de cultura suplementado com glucose. A fase *lag* das culturas ocorre entre o 1º e o 4º dia. No entanto, o crescimento das culturas após esta fase não apresenta uma fase exponencial bem definida, e ocorre seguindo uma tendência linear, desde o 5º dia até o final do cultivo, sem apresentar um período estacionário. Ao longo do período de cultivo, a perda de massa observada foi de 0,1470 g, e a massa de calo obtida após 55 dias de cultivo foi de 1,656 g (Tabela 32).



**Figura 5:** Crescimento relacionado à dissimilação em calos de *C. fissilis* cultivados durante 55 dias, em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

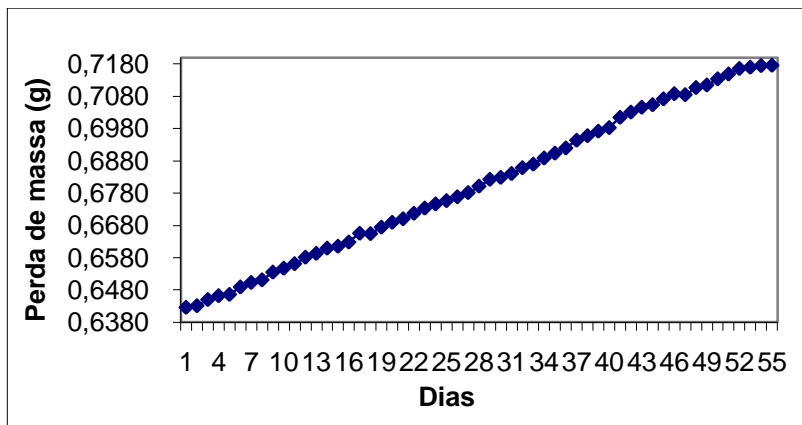
A Figura 6 representa o crescimento de calos cultivados em meio de cultura suplementado com glicose e glutamina. A curva de dissimilação não apresenta um período bem definido na fase *lag*, exibindo uma perda de massa com tendência linear, desde 1º dia de cultivo até aproximadamente o 45º dia. A partir do 46º dia, as culturas parecem atingir a fase estacionária de crescimento. A perda de massa das culturas durante o cultivo foi de 0,1575 g e a massa de calo formada ao final do período de cultivo foi de 0,532 g (Tabela 32).



**Figura 6:** Crescimento relacionado à dissimilação em calos de *C. fissilis* cultivados durante 55 dias, em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

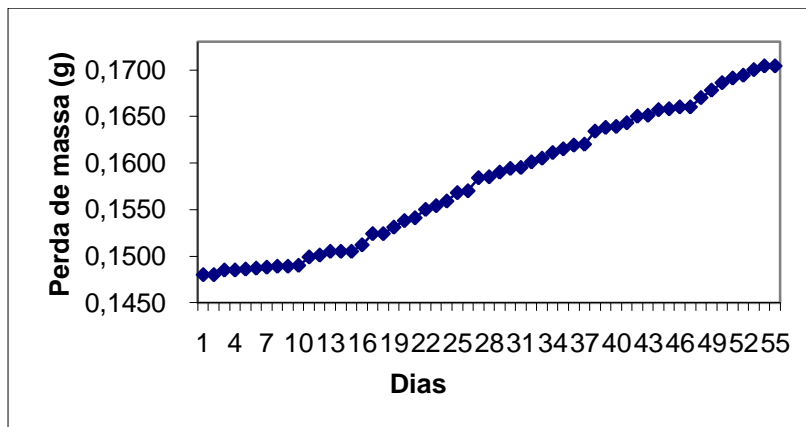
A Figura 7 representa o crescimento de calos cultivados em meio de cultura suplementado com sacarose. A curva de dissimilação indica que o crescimento das culturas teve tendência linear, com uma fase *lag* pouco definida ocorrendo entre o 1º e o 3º dia de cultivo. Quase no final do período de cultivo, a partir do 52º dia, a curva parece atingir o início da fase estacionária de crescimento. A perda de massa da cultura durante o cultivo foi de 0,0749 g e a massa de calo formada após 55 dias de cultivo foi de 0,357 g (Tabela 32).





**Figura 7:** Crescimento relacionado à dissimilação em calos de *C. fissilis* cultivados durante 55 dias, em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM sacarose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

A Figura 8 representa o crescimento de calos cultivados em meio de cultura suplementado com sacarose e glutamina. A curva de dissimilação apresenta uma fase *lag* bastante longa, estendendo-se ao longo dos 10 primeiros dias de cultivo. Após esta fase, o crescimento apresenta uma tendência de aumento linear que se prolonga até o 52º dia de cultivo, quando parece entrar em estágio estacionário. A perda de massa ocorrida durante o período de cultivo foi de 0,0224 g e a massa de calo obtida no final do cultivo foi de 0,199 g (Tabela 32).



**Figura 8:** Crescimento relacionado à dissimilação em calos de *C. fissilis* cultivados durante 55 dias, em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM sacarose, 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

**Tabela 32:** Valores da massa inicial, massa final, dissimilação total (Massa final – Massa inicial) das culturas de calos e massa final dos calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Tratamento	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Dissimilação total (g)	Massa do calo (g)
Frutose	0,3342	0,2869	0,0473	1,536
Frutose + glutamina	0,6550	0,6145	0,0405	0,490
Glucose	0,7620	0,6150	0,1470	1,656
Glucose + glutamina	0,3856	0,2281	0,1575	0,532
Sacarose	0,7176	0,6427	0,0749	0,357
Sacarose + glutamina	0,1704	0,1480	0,0224	0,199

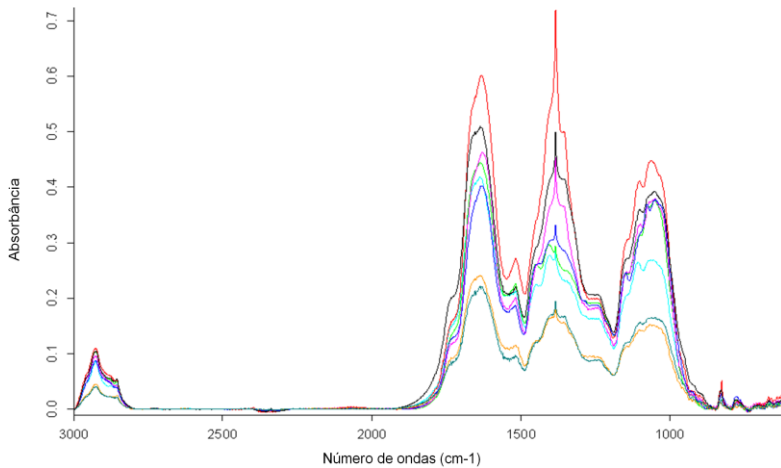
### 5.3. ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO EM CALOS DE *Cedrela fissilis*

#### 5.3.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia vibracional de infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada no pó de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, sacarose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, e de calos iniciados a partir de segmentos cotiledonares e de hipocótilo cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

A Figura 9 mostra os espectros gerados por cada tratamento em janela de KBr. Para facilitar a comparação entre os perfis metabólicos dos diferentes tratamentos, os espectros referentes a cada um foram sobrepostos. Os 8 tratamentos analisados apresentaram perfis espectroscópicos muito parecidos, com formação de bandas nas mesmas regiões do comprimento de onda, diferindo apenas nos valores da absorbância e no ponto específico de formação de alguns picos. Quanto ao tamanho, a literatura costuma classificar os picos subjetivamente como fracos, moderados ou intensos, e essa classificação será utilizada para a descrição dos dados neste trabalho.

Houve a formação de dois picos moderados na região de 530 – 630  $\text{cm}^{-1}$ , dois picos fracos na região de 760 – 830  $\text{cm}^{-1}$ , vários picos intensos na região de 1000 – 1200  $\text{cm}^{-1}$ , picos intensos e muito próximos na região de 1300 – 1400  $\text{cm}^{-1}$ , um pico intenso na região de 1500 – 1650  $\text{cm}^{-1}$ , um pico moderado na região de 2920  $\text{cm}^{-1}$  e uma banda mais larga e intensa na região de 3300 – 3400  $\text{cm}^{-1}$ . De maneira geral, a absorbância foi maior no pó dos calos de hipocótilo e no pó de calos de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio contendo frutose. As menores absorbâncias foram registradas nos tratamentos com glucose e frutose com glutamina. Os demais tratamentos tiveram valores de absorbância intermediários aos demais.



**Figura 9:** Espectros de FTIR obtidos a partir da média de 12 varreduras em janela de KBr, a partir do pó de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, sacarose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA, e de calos iniciados a partir de segmentos cotiledonares e hipocótilo cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA. As cores dos espectros referem-se aos tratamentos dos calos: **Frutose**; **Frutose + glutamina**; **Glucose**; **Glucose + glutamina**; **Sacarose**; **Sacarose + glutamina**; **Hipocótilo**; **Cotilédone**.

A Tabela 33 mostra os valores de comprimento de onda onde se formaram os picos de transmitância em cada um dos tratamentos.

**Tabela 33:** Valores de número de ondas onde ocorreu a formação de picos de absorvância na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) realizada em pó de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, sacarose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, e de calos iniciados a partir de segmentos cotiledonares e hipocótilo cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Tratamento	Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )
Glucose	617, 828, 1052, 1102, 1239, 1354, 1384, 1399, 1513, 1634, 2926, 3413
Glucose + glutamina	619, 775, 827, 1058, 1108, 1385, 1405, 1440, 1517, 1636, 2855, 2926, 3405
Frutose	618, 768, 828, 1053, 1103, 1142, 1357, 1384, 1516, 1634, 2926, 3390, 3515
Frutose + glutamina	620, 829, 1055, 1104, 1142, 1356, 1384, 1396, 1445, 1517, 1635, 2854, 2926, 3415
Sacarose	617, 777, 826, 1050, 1077, 1147, 1384, 1438, 1518, 1629, 2928, 3400
Sacarose + glutamina	619, 777, 826, 1052, 1073, 1102, 1143, 1350, 1385, 1406, 1448, 1516, 1635, 2857, 2927, 3384
Cotilédone	619, 764, 829, 1051, 1102, 1144, 1243, 1359, 1384, 1517, 1628, 2928, 3392
Hipocótilo	619, 765, 827, 1064, 1104, 1356, 1383, 1516, 1632, 2928, 3385

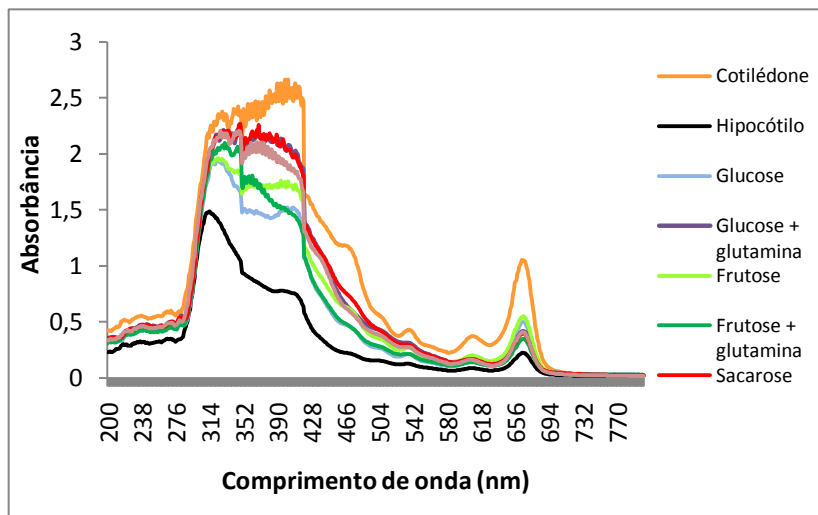
### 5.3.2. Espectrofotometria de UV-Vis

A espectrofotometria de varredura em UV-Vis foi realizada em extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, sacarose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, e de calos iniciados a partir de segmentos cotiledonares e hipocótilo cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

A Figura 10 mostra os espectros obtidos em cada tratamento. É possível observar que, de uma maneira geral, o espectro do extrato de calos de cotilédones apresentou valores maiores de absorbância, enquanto que o espectro do extrato de calos de hipocótilo teve os valores mais baixos, e os extratos de segmentos nodais apresentaram valores de absorbância muito semelhantes na região de absorção da luz visível.

Os diferentes tratamentos tiveram perfis de absorção coincidentes quanto aos comprimentos de onda. Um pico de alta absorbância se formou na região de 659 – 670 nm, com a formação de um pequeno ombro mais próximo de 659 nm. Três regiões de maior absorbância também podem ser observadas nos intervalos entre 605 – 614 nm, 530 – 540 nm e 470 – 480 nm.

Na região de absorção do UV que compreende os comprimentos de onda 280 até 400 nm, onde começa a absorção por luz visível, ocorreu a fusão de vários picos de absorbância, levando à formação de “ombros”, que ficaram mais evidentes nos espectros dos calos de hipocótilo e de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura contendo glicose, frutose, frutose e glutamina ou sacarose e glutamina. Nesta região de absorção, os valores de absorbância diferiram muito entre os tratamentos, evidenciando diferenças na constituição metabólica dos calos no que diz respeito aos compostos que absorvem na luz UV.



**Figura 10:** Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, sacarose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA, e de calos iniciados a partir de segmentos cotiledonares e hipocótilo cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

### 5.3.3. Dosagem de clorofila, fenólicos totais e flavonóides em calos de *Cedrela fissilis*

A Tabela 34 mostra os valores dos conteúdos de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total (clorofila *a* + clorofila *b*), fenólicos totais e flavonóides de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, glucose ou sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA. O conteúdo de fenólicos totais e flavonóides de calos cultivados em meio de cultura suplementado com sacarose não puderam ser determinados por problemas no processamento das amostras.

Os calos cultivados em meio de cultura suplementado com frutose apresentaram 1,63  $\mu$ g de clorofila/mL *a* e 0,69  $\mu$ g de clorofila *b*/mL. O conteúdo de clorofila total deste tratamento (2,32  $\mu$ g/mL) foi o maior entre os tratamentos analisados e diferiu significativamente dos tratamentos que foram suplementados com frutose e glutamina, glucose

e glutamina, sacarose e sacarose com glutamina. O conteúdo total de clorofila dos calos crescidos em meio de cultura suplementado com glucose (2,20 µg/mL, dos quais 1,64 µg de clorofila *a*/mL e 0,56 µg de clorofila *b*/mL) não diferiu significativamente do teor de clorofila total dos calos crescidos na presença de frutose ou glucose com glutamina, mas foi significativamente maior do que os valores de clorofila total encontrados nos demais tratamentos. O conteúdo total de clorofila dos calos cultivados em meio de cultura suplementado com glucose e glutamina (2,01 µg/mL, dos quais 1,59 µg de clorofila *a*/mL e 0,42 µg de clorofila *b*/mL), sacarose sem glutamina (1,91 µg/mL, dos quais 1,58 µg de clorofila *a*/mL e 0,33 µg de clorofila *b*/mL) e sacarose com glutamina (1,81 µg/mL, dos quais 1,59 µg de clorofila *a*/mL e 0,23 µg de clorofila *b*/mL) não diferiram significativamente entre si. Os calos cultivados em meio de cultura suplementado com frutose e glutamina apresentaram 1,59 µg de clorofila *a*/mL e 0,23 µg de clorofila *b*/mL. Este tratamento apresentou o menor conteúdo total de clorofila (1,22 µg/mL), diferindo significativamente dos demais tratamentos.

Os calos cultivados em meio de cultura suplementado com glutamina tiveram produção de fenólicos totais maior do que nos calos cultivados em meio de cultura sem glutamina. O maior conteúdo foi encontrado nos calos cultivados em meio de cultura suplementado com sacarose e glutamina (17,90 µg/g MS) e diferiu significativamente dos demais tratamentos. O conteúdo de fenólicos totais dos calos cultivados na presença de frutose e glutamina (5,16 µg/g MS) foi significativamente maior do que o de calos cultivados em meio contendo glucose e glutamina (3,06 µg/g MS). O conteúdo de fenólicos totais dos calos cultivados em meio de cultura suplementado com glucose (1,41 µg/g MS) não apresentou diferença significativa em relação aos tratamentos com glucose ou frutose. Os calos cultivados em meio de cultura suplementado com frutose apresentaram teor de fenólicos totais significativamente menor do que os outros tratamentos (1,04 µg/g MS).

O teor de flavonóides em calos cultivados em meio de cultura suplementado com sacarose e glutamina (2,89 µg/g) foi significativamente maior do que os valores encontrados nos demais tratamentos. O conteúdo de flavonóides dos calos cultivados em meio de cultura suplementado com glucose, frutose ou glucose e glutamina não diferiram significativamente entre si (1,17; 1,14; 0,98 µg/g, respectivamente). O menor teor de flavonóides foi encontrado nos calos



cultivados em meio de cultura contendo frutose e glutamina (0,53 µg/g) e diferiu significativamente de todos os tratamentos.

**Tabela 34:** Conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, fenólicos totais e flavonóides de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, glucose ou sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.

Tratamento	Clorofila (µg/mL)			Fenólicos Totais (µg/g MS) <sup>a</sup>	Flavonóides (µg/g) <sup>a</sup>
	<i>a</i>	<i>b</i>	Total <sup>a</sup>		
Frutose	1,63	0,69	2,32 a	1,04 d	1,14 bc
Frutose + glutamina	0,90	0,33	1,22 d	5,16 b	0,53 d
Glucose	1,64	0,56	2,20 ab	1,41 cd	1,17 b
Glucose + glutamina	1,59	0,42	2,01 bc	3,06 c	0,98 bcd
Sacarose	1,58	0,33	1,91 c	-	-
Sacarose + glutamina	1,59	0,23	1,81 c	17,90 a	2,89 a

<sup>a</sup>Médias de três repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey (p≤0,05).

#### 5.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA

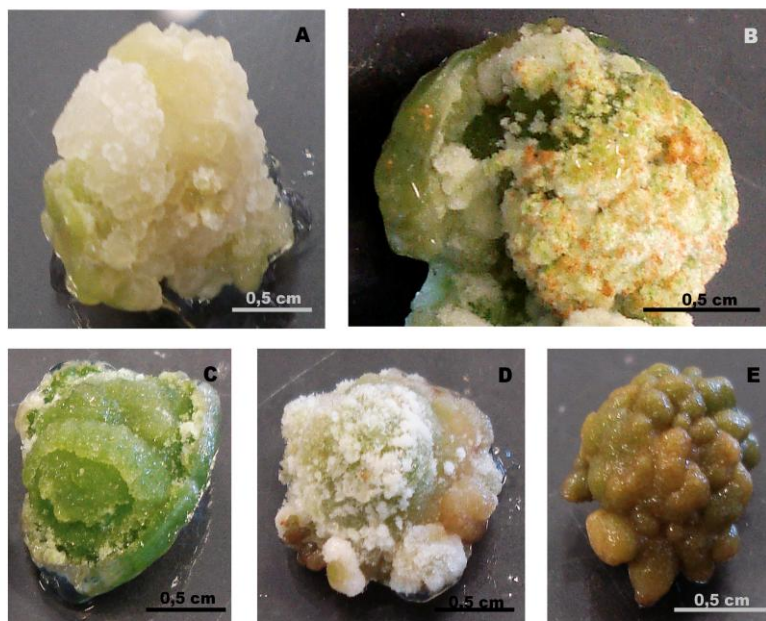
No decorrer dos experimentos de crescimento de calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*, cultivados durante 8 semanas em meio MS, suplementado com 2,5 µM de BAP, 5 µM de ANA, 118 mM de glucose, frutose ou sacarose, e 0 ou 2,73 mM de glutamina, observou-se que eles se apresentavam com diferentes morfologias, mesmo quando se tratava de um mesmo tratamento. A maioria dos calos que cresceram em meio de cultura suplementado com frutose ou com glucose apresentaram coloração verde, bege ou bege com porções esverdeadas. Enquanto, os calos cultivados no meio contendo sacarose foram observados com coloração predominantemente bege e com frequência apresentavam porções mais oxidadas. Outras estruturas foram observadas em calos provenientes dos 6 tratamentos

utilizados, como foi o caso de estruturas globulares brancas de aspecto aveludado, a formação de raízes e o brotamento das gemas axilares, entre outros.

Para caracterizar a morfologia e a histoquímica, foram escolhidas 5 amostras crescidas em diferentes condições de cultivo, mas que contemplam tanto as características mais comuns quanto algumas estruturas mais raras observadas nos calos.

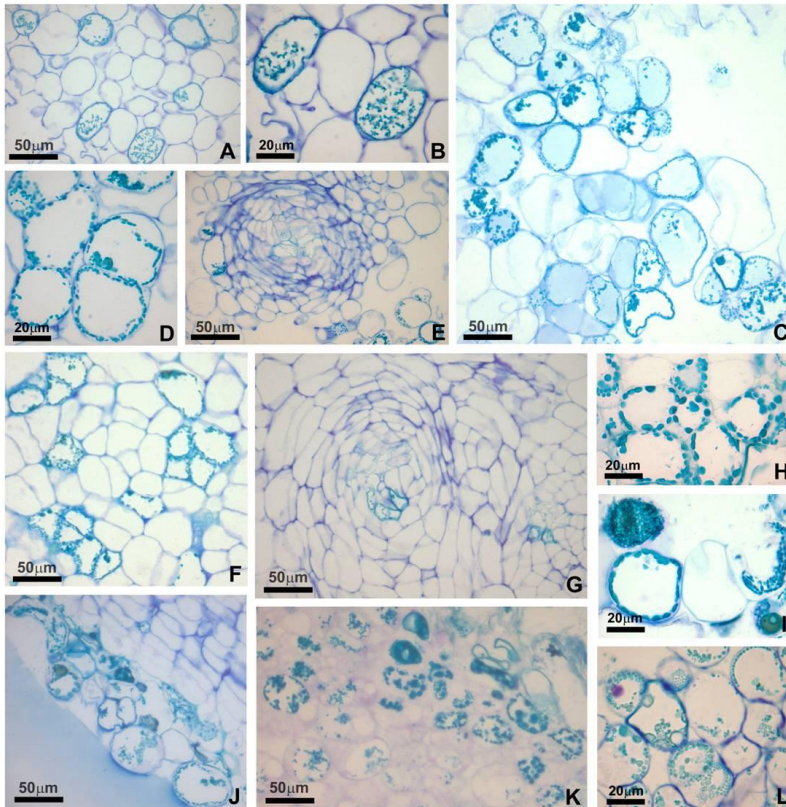
O calo apresentado na Figura 11– A (Amostra 1), crescido em meio de cultura contendo 118 mM de glucose, sem a adição de glutamina, representa a morfologia com coloração bege, levemente translúcida. A Amostra 2, apontada na Figura 11 – B também foi obtida em meio de cultura suplementado com 118 mM de glucose, sem a adição de glutamina, mas possui morfologia bem diferente da amostra anterior. O calo mostrado na Figura 11 – B tem coloração verde e apresentara porções brancas com estruturas alaranjadas. A Figura 11 – C mostra um calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de frutose, sem glutamina (Amostra 3). A coloração verde desta amostra foi freqüente nos calos crescidos em meio contendo frutose ou glucose. Na Amostra 4, um calo crescido em meio de cultura suplementado com 118 mM de glucose e 2,73 mM de glutamina (Figura 11 – D), é possível observar estruturas globulares brancas de aspecto aveludado, que apareceram com frequência em calos crescidos nas diferentes condições de cultivo, mas que ocasionalmente também estavam presentes na extremidade de explantes que não chegaram a formar calo. O calo representado pela Amostra 5, crescido em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina (Figura 11 – E), tem morfologia bastante diferente dos demais calos, apresentando grandes nódulos de aspecto liso e polido. Este tipo de calo também tinha menores dimensões que as demais morfologias e era muito mais compacto.

Quando observados ao microscópio de luz, os diferentes tipos de calos não apresentaram diferenças relevantes em relação a morfologia e à disposição das células. Estas apresentam tamanhos grandes e possui vacúolos que ocupam a maior parte do citoplasma. Foram observadas regiões onde as células estão dispostas de forma concêntrica e possuem formato mais achatado e alongado, sugerindo o início de formação de alguma estrutura tubular especializada.



**Figura 11:** Diferentes morfologias de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA. A) Amostra 1: calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de glucose; B) Amostra 2: calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de glucose; C) Amostra 3: calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de frutose; D) Amostra 4: calo crescido em meio de cultura suplementado com 118 mM de glucose e 2,73 mM de glutamina; E) Amostra 5: calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina.

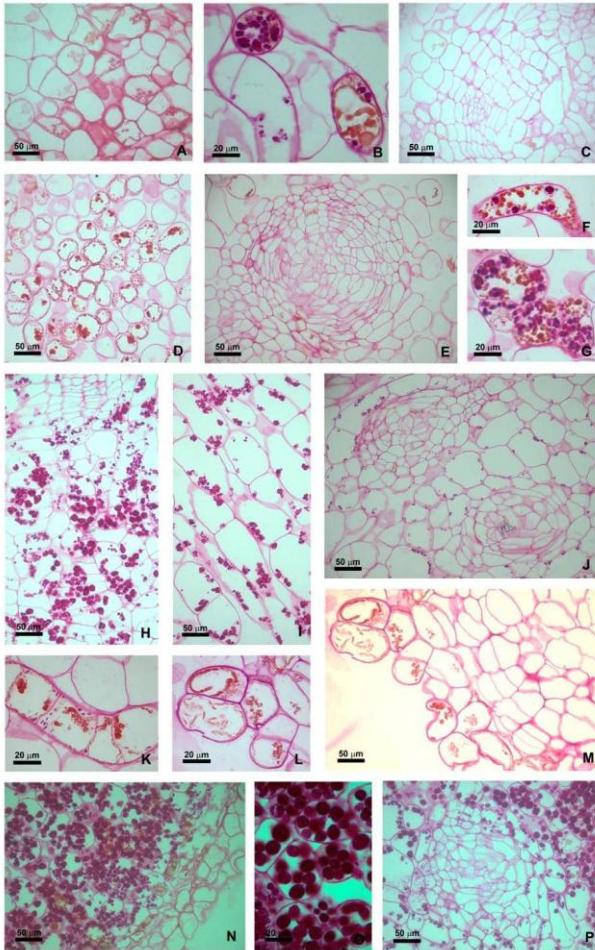
A Figura 12 mostra as amostras de calos de *C. fissilis* quando submetidas à histoquímica AT-O. É possível observar que algumas células dos calos (diferentes tratamentos) apresentaram uma leve reação metacromática, indicando uma pequena concentração de polissacarídeos ácidos nas paredes celulares. O citoplasma destas células apresentou reação ortocromática e a presença de muitos grânulos ortocromáticos.



**Figura 12:** Diferentes morfologias de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA, submetidos à histoquímica com AT-O. A, B, C: Amostra 1 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de glicose); D, E: Amostra 2 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de glicose); F, G, H: Amostra 3 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de frutose); I, J: Amostra 4 (calo crescido em meio de cultura suplementado com 118 mM de glicose e 2,73 mM de glutamina) K, L: Amostra 5 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina).

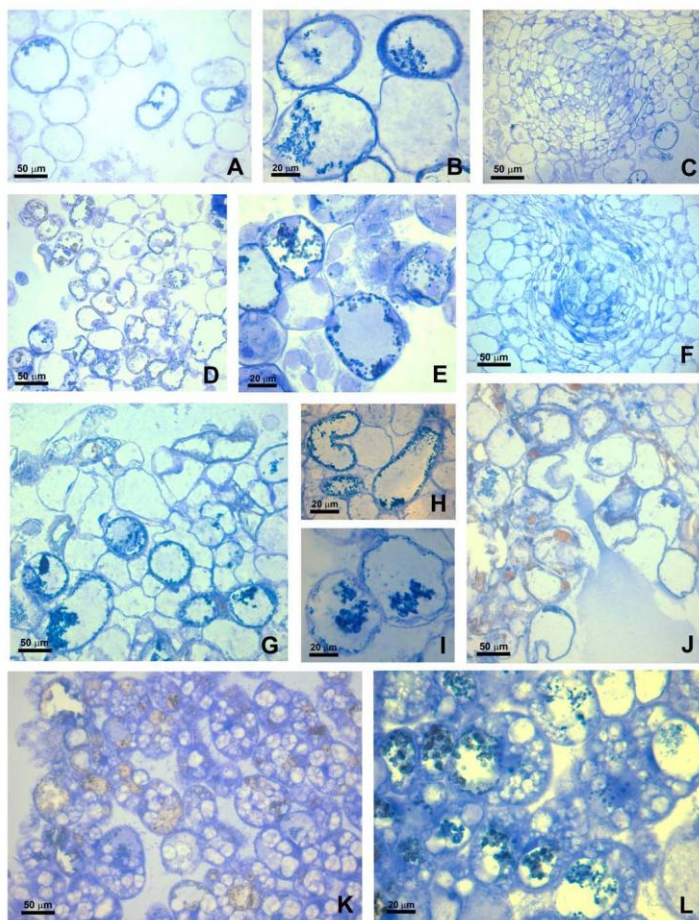
Na Figura 13 é possível observar as amostras de calos de *C. fissilis* submetidas à coloração de PAS. As células dos calos apresentaram reação positiva aos polissacarídeos neutros, após serem submetidas à reação de PAS. As paredes celulares apresentaram coloração rósea, evidenciando a presença de celulose. No citoplasma foi possível verificar a presença de grânulos de amido, localizados na periferia das células. As amostras 1, 2 e 4 apresentam poucas células com grânulos, situadas principalmente na região cortical. Nas amostras 3 e 5, as células contendo grânulos são abundantes e estão situadas logo abaixo da camada cortical, em direção à região medular, e no entorno das formações concêntricas de células.

A Figura 14 mostra as amostras de calos de *C. fissilis* coradas com CBB. As seções dos calos quando submetidas à reação do CBB reagiram levemente com o citoplasma das células, evidenciando uma maior concentração de material protéico. Em algumas células foi verificada a presença de grânulos com reação positiva, indicando a constituição protéica.



**Figura 13:** Diferentes morfologias de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares, cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA, submetidos à histoquímica com PAS. A, B, C: Amostra 1 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de glucose); D, E, F, G: Amostra 2 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de glucose); H, I, J: Amostra 3 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de frutose); K, L, M: Amostra 4 (calo crescido em meio de cultura suplementado com 118 mM de glucose e 2,73 mM de glutamina) N, O, P: Amostra 5 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina).





**Figura 14:** Diferentes morfologias de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotilédonares, cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA, submetidos à reação com CBB. A, B: Amostra 1 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de glicose); C, D, E: Amostra 2 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de glicose); F, G, H: Amostra 3 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de frutose); I, J: Amostra 4 (calo crescido em meio de cultura suplementado com 118 mM de glicose e 2,73 mM de glutamina) K, L: Amostra 5 (calo crescido em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CALOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA

#### 6.1.1. Efeito dos reguladores de crescimento sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis*

Os reguladores de crescimento são compreendidos como um grupo que abrange moléculas de ocorrência natural nos tecidos vegetais e seus análogos sintéticos, que agem como sinalizadores, influenciando o desenvolvimento da planta. Na cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura é necessária para garantir o crescimento e a organogênese celular. Há duas classes de reguladores de crescimento que são mais utilizadas na cultura *in vitro*: as auxinas e as citocininas. As auxinas possuem diversas funções no desenvolvimento vegetal, entre as quais, o alongamento do caule, dominância apical e o enraizamento, e são amplamente utilizadas nas culturas de células e tecidos por induzir a divisão celular. Na planta, as auxinas são produzidas nas regiões de crescimento celular localizadas nos ápices dos ramos e, em menor quantidade, das raízes, e seu transporte ocorre do topo da planta em direção à base. As citocininas estão envolvidas em processos de divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea e são utilizadas nas culturas *in vitro* para a regeneração das plantas. Na planta, a síntese das citocininas ocorre nas raízes e seu transporte é feito da base em direção à parte aérea (HARTMANN *et al.*, 1988; NARAYANASWAMY, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2006;).

No experimento que investigou o efeito de diferentes concentrações da auxina 2,4-D e do tipo de explante na indução de calos em *C. fissilis*, segmentos de hipocótilo e segmentos nodais cotiledonares foram bem sucedidos na calogênese, nas três concentrações de 2,4-D utilizadas. O fato dos segmentos nodais foliares apresentarem taxas mais baixas de calogênese, não formarem calo na concentração de 4,52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e dos segmentos foliares e segmentos cotiledonares não sobreviverem na presença do 2,4-D pode estar relacionados com o balanço endógeno de hormônios desses explantes, que pode ter ficado acima do ótimo, após a absorção do 2,4-D do meio de cultura. Nunes (2000) realizou experimento semelhante, testando as mesmas



concentrações de 2,4-D utilizadas neste experimento (1,13; 2,26; 4,52  $\mu\text{M}$ ) na indução de calos em segmentos de raiz, epicótilo e cotilédone. Após 45 dias de cultivo em meio MS, semi-sólido, suplementado com 20 g/L de sacarose, a frequência de calogênese observada variou entre 50 – 91,6%, valor semelhante ao encontrado no presente trabalho. No entanto, a calogênese ocorreu em todos os tipos de explante, inclusive nos segmentos cotiledonares, diferindo do que foi observado no presente trabalho. O autor não testou a indução de calos a partir de segmentos nodais cotiledonares ou apicais. Cada tecido possui um balanço endógeno de hormônios, definido principalmente pela idade e pela localização do explante, que irá interagir com os reguladores de crescimento fornecidos no meio de cultura, promovendo ou inibindo os processos de divisão e diferenciação celular.

O 2,4-D foi utilizado por KAYIM & KOC (2006) para formar calos embriogênicos em duas variedades de limão (*Citrus limon*) e por Petersen *et al.* (1999), na calogênese a partir de inflorescências, segmentos apicais e foliares de *Miscanthus x ogiformis*. Simões *et al.* (2009) testaram o efeito das auxinas 2,4-D, picloram (PIC), ANA e AIA na indução de calos a partir de segmentos foliares e segmentos de pecíolo de *Cleome rosea*. No experimento, 2,4-D e PIC induziram a calogênese bege claro, friáveis e de crescimento rápido, a partir dos dois tipos de explantes, sendo que calos formados a partir de segmentos de pecíolo, cultivados em meio de cultura contendo 0,90  $\mu\text{M}$  de 2,4-D apresentaram a maior produção de biomassa (12,92g). No entanto, ANA e AIA não produziram resposta de calogênese, porém a presença de ANA no meio de cultura causou rizogênese direta e AIA induziu a multiplicação de ramos. Na indução de calos em explantes de *Calendula officinalis*, o uso de 2,4-D resultou em índices de calogênese entre 64 – 87% a partir de segmentos foliares. No entanto, nem o uso de 2,4-D nem de AIA resultaram em calogênese (GRZELAK & JANISZOWSKA, 2002). Estes resultados evidenciam que a ação da auxina é dependente da interação com características próprias da espécie e do tecido utilizado na cultura e ajudam a justificar os resultados encontrados no experimento com 2,4-D.

Embora a indução de calos seja possível apenas com a adição de uma auxina ao meio de cultura, muitas vezes a utilização de uma auxina em combinação com uma citocinina é necessária para se obter melhores resultados. Esta condição pode estar relacionada à manutenção do apropriado balanço entre auxinas e citocininas, que podem agir sinergisticamente na regulação da divisão celular, processo essencial

para a formação do calo (JOHRI & MITRA, 2001; ROY & BANERJEE, 2002).

Experimentos preliminares conduzidos por Nunes *et al.*, 2002 e por Laudano (2005) demonstraram a ação sinérgica de BAP e ANA na promoção do crescimento em massa seca de calos de *C. fissilis* originados a partir de segmentos nodais cotiledonares durante 45 dias em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 20 g/L de sacarose. Porém, os autores não realizaram estudos com outras fontes de carbono, como os conduzidos no presente trabalho. O fato de apenas para a sacarose, em todas as combinações, terem sido observadas as menores taxas de indução de calos, indica a influência das fontes de carbono sobre o processo, demonstrando que na presença de glucose e frutose o processo de indução de calos pode ser otimizado. Os resultados de crescimento, em termos de massa seca, também indicam a influência das fontes de carbono, uma vez que com frutose não foi possível identificar nenhuma combinação de BAP e ANA que promovesse o crescimento em relação aos demais, enquanto que, para os demais açúcares, ficou demonstrado serem as combinações de 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA (para sacarose e glucose) e de 1,25  $\mu\text{M}$  de BAP e 1,25  $\mu\text{M}$  de ANA (para sacarose) as condições em que foram produzidas as menores quantidades de massa seca de calos. Esses resultados são relevantes, pois demonstram que calos puderam ser induzidos em uma diversidade de condições. Através da influência diferencial no crescimento e no teor de água dos calos é possível deduzir que, certamente, diferenças também devem estar ocorrendo em termos metabólicos, que poderão ser confirmadas em futuros estudos sobre os perfis dos metabolismos primário e secundário dos calos, assim como através dos estudos citoquímicos.

A formação de raízes está ligada à ação das auxinas e depende de sua concentração no meio de cultura. Altas concentrações de auxinas no meio e cultura favorecem a rizogênese direta nos explantes, ou a formação de raízes em calos. Neste trabalho, a formação de raízes em calos ocorreu apenas quando BAP e ANA foram utilizados nas concentrações de 2,5  $\mu\text{M}$  e 5,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Esta resposta deve estar ligada à interação entre o balanço endógeno dos segmentos nodais cotiledonares e a combinação de reguladores fornecida pelo meio de cultura.

Brunetta *et al.* (2006) estudaram a calogênese em segmentos de epicótilo de *S. macrophylla* cultivados durante 40 dias, sob fotoperíodo de 16 horas, em meio de cultura semi-sólido, contendo os sais e

vitaminas do meio cultura MS, suplementado com 100 mg/L de mioinositol, 30 g/L de sacarose, 800 mg/L de PVP (polivinilpirrolidona) e os reguladores de crescimento ANA (1,25; 2,5; 5,0  $\mu$ M) e BAP (2,5; 5,0; 10; 20  $\mu$ M), sozinhos ou combinados. A frequência de calogênese variou de 75 – 91% nos meios de cultura contendo ANA, sendo que a maior porcentagem de calogênese foi obtida com o meio de cultura contendo 1,25  $\mu$ M do regulador. Estes valores são muito parecidos com aqueles encontrados para calos formados em meio de cultura contendo 2,4-D, a partir de epicótilo e hipocótilo de *C. fissilis*, que pertence à mesma família de *S. macrophylla*. No entanto, nos meios de cultura contendo combinações de BAP e ANA não houve calogênese significativa, diferindo dos resultados obtidos com calos de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis* cultivados em meio de cultura contendo combinações de BAP e ANA. Estes resultados reforçam a ideia de que a calogênese decorre da interação de vários fatores, e que a espécie e o tecido de origem podem ser decisivos na formação ou não de calos.

Medina *et al.* (1998) testou o efeito do 2,4-D (9,04; 13,56  $\mu$ M, equivalentes a 2 e 3 mg/L, respectivamente) em combinação com as citocininas cinetina (CIN; 1 e 2 mg/L) e TDZ (1 mg/L), e o efeito do TDZ (0,01; 0,001 mg/L) sozinho, na indução de calos a partir de segmentos cotiledonares, segmentos foliares, pecíolo e segmentos do hipocótilo de *Medicago strasseri*, cultivados durante 4 meses, em meio MS, semi-sólido, sob fotoperíodo de 16 horas. A maioria dos calos obtidos eram friáveis e verdes, sendo que aqueles formados a partir de hipocótilo que cresceram em meio de cultura contendo apenas TDZ ou a combinação de 2,4-D (3 mg/L) e CIN (1 mg/L), e aqueles originados a partir de segmentos cotiledonares que cresceram em meio de cultura contendo apenas TDZ ou a combinação de 2,4-D (2 mg/L) e CIN (2 mg/L), eram verde claro com pontos verde escuro, sugerindo que processos de organogênese ou embriogênese estavam se desenvolvendo. No entanto, houve formação de órgãos (não especificados pelos autores) apenas nos calos originados de segmentos cotiledonares, segmentos foliares e pecíolo cultivados em meio de cultura contendo a combinação de 2,4-D (2 mg/L) e CIN (2 mg/L), que possuíam as mesmas características previamente mencionadas.

Yan *et al.* (2009) estudou o efeito de auxinas e citocininas sozinhas ou combinadas sobre a calogênese a partir da placa basal de *Allium chinese*. Os explantes foram inoculados em meio de cultura B5, semi-sólido, suplementado com 30 g/L de sacarose, BAP e 2,4-D,

sozinhos ou combinados. Também foram testadas combinações de ANA, sozinho ou combinado com 0,5  $\mu\text{M}$  de BAP. O cultivo dos calos foi feito durante 8 semanas, no escuro. Nos meios de cultura que continham apenas 2,4-D, a indução de calos variou entre 18,2 – 38,8%, sendo que a maior frequência foi observada no meio de cultura contendo 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. O aumento na concentração de BAP, quando utilizado sozinho no meio de cultura, resultou em um aumento na frequência de indução de calos, porém apenas até a concentração de 10  $\mu\text{M}$ ; na concentração de 15  $\mu\text{M}$  foi observada uma redução na calogênese. A maior taxa de indução de calos (65,2%) foi observada quando 0,5  $\mu\text{M}$  de BAP foram utilizados em combinação com 4,52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. A calogênese decaiu conforme a concentração de BAP aumentava em combinação com 4,52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Também foi observado um efeito supressivo de altas concentrações de 2,4-D quando combinadas com 0,5  $\mu\text{M}$  de BAP. As combinações de BAP e ANA induziram calo, mas em taxas mais baixas (14,9 – 37%), enquanto que a utilização de ANA sozinho no meio de cultura induziu apenas a formação de ramos nos explantes. Neste experimento, os autores descreveram calos com duas morfologias distintas: um tipo de calo era friável, amarelo esbranquiçado e quebradiço; o outro tipo de calo era compacto, amarelado, com superfície lisa e estruturas globulares.

Roy & Banerjee (2002) testaram o efeito de BAP e ANA sobre brotos da orquídea *Dendrobium fimbriatum*. Os brotos foram cultivados durante 8 semanas, sob fotoperíodo de 10 horas, em meio de cultura Knudson's C (1962), semi-sólido, modificado, suplementado com BAP e ANA, sozinhos ou combinados. Calos compactos, translúcidos, amarelo claro, foram obtidos nos meios de cultura contendo apenas ANA (5,0  $\mu\text{M}$ ) ou ANA em combinação com BAP. A maior taxa de calogênese (66,67%) foi observada no meio de cultura contendo 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, sendo que neste tratamento também foi observada a maior frequência de ramificações (55,56%). Não ocorreu calogênese nos meios de cultura suplementados apenas com BAP.

A brotação de ramos, observada nos experimentos com *Allium chinese* e *Dendrobium fimbriatum*, também foi relatada em outros estudos, como em calos de *C. fissilis* (LAUDANO, 2005), *Pharbitis nil* (TRJGELL *et al.*, 2006) e *Harpagophytum procumbens* (JAIN *et al.*, 2009) e decorre da ação das citocininas sobre o desenvolvimento das células. No entanto, há casos em que a brotação de ramos está relacionada à presença de gemas pré-existentes no explante utilizado. Isto foi observado nos calos de *S. macrophylla* (BRUNETTA *et al.*,

2006) e ocorreu ocasionalmente nos calos de *C. fissilis* do presente trabalho. Este tipo de brotamento não foi levado em consideração ao se avaliar as respostas morfogênicas dos calos por não estar diretamente relacionado à presença dos reguladores de crescimento exógenos.

Uma vez que a combinação de reguladores de crescimento está ligada à resposta morfogênica de uma cultura de tecido, a indução de calos pode ser direcionada para a obtenção de embriões somáticos. Vila *et al.* (2009) produziram calos embriogênicos a partir do cultivo de embriões zigóticos de *C. fissilis* em meio MS, semi-sólido, suplementado com 30 g/L de sacarose, 2,4-D (9,0; 22,5; 45,0; 90,0  $\mu\text{M}$ ) e PIC (8,9; 20,7; 41,4; 82,8  $\mu\text{M}$ ), isoladamente ou em combinação com 0,4  $\mu\text{M}$  de BAP. Após 2 meses de cultivo sob fotoperíodo de 14 horas, formaram-se calos amarelados, nodulares e friáveis nos meios de cultura contendo 2,4-D sozinho (9,0; 22,5; 45,0; 90,0  $\mu\text{M}$ ) e em combinação com BA (9,0; 22,5; 45,0;  $\mu\text{M}$  de 2,4-D), ou PIC sozinho (8,9; 20,7; 82,8  $\mu\text{M}$ ) e em combinação com BAP (82,8  $\mu\text{M}$  de PIC).

### **6.1.2. Efeito da posição do explante sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis***

O efeito da posição do explante na indução de calos ou na organogênese ainda é pouco estudado. Neste trabalho, foi observado que a frequência de calogênese a partir de segmentos nodais cotiledonares inoculados na posição vertical maior do que em explantes inoculados na posição horizontal. Não houve diferença significativa entre valores de massa fresca e seca e teor de água nos dois tratamentos, e foi observada a formação de raízes em alguns calos formados a partir de explantes inoculados na posição vertical. A absorção de nutrientes e reguladores de crescimento pode ter sido facilitada na posição vertical por permitir maior contato entre as células da região seccionada e o meio de cultura. A formação de raízes pode ser atribuída ao balanço de auxinas endógenas, que são translocadas das regiões superiores do explante em direção à base.

Resultados semelhantes foram relatados por Nunes (2000), em um experimento no qual segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis* foram inoculados na posição vertical ou horizontal e cultivados durante em fotoperíodo de 16 horas ou no escuro. Entre os calos cultivados na presença de luz, a maior taxa ocorreu nos explantes inoculados verticalmente. Houve formação de ramos em calos dos dois tratamentos e raízes em calos dos explantes inoculados horizontalmente. Entre os

explantes cultivados no escuro, a calogênese foi de 100% nas duas posições do explante, indicando que a presença ou ausência de luz também exerce influência sobre a indução dos calos.

Outro estudo, realizado por Orlikowska *et al.* (1999), demonstrou que a orientação do explante teve influência na proliferação de ramos em *Codiaeum variegatum*. No experimento, brotos axilares de *C. variegatum* foram inoculados nas posições horizontal, vertical com o ápice para cima e vertical com o ápice para baixo. Os resultados obtidos mostraram que o maior número de brotações foi produzido nos brotos orientados horizontalmente ou verticalmente, com o ápice para baixo. Estes resultados, de acordo com os autores, podem ser explicados como um efeito da diminuição da dominância apical, causada pela perturbação do transporte base-ápice das auxinas, ou porque tais posições facilitaram a absorção dos nutrientes do meio.

A posição de brotos axilares mostrou influenciar a calogênese e a proliferação de ramos em *Vaccinium vitis-idaea*. Os explantes inoculados na posição horizontal formaram calos maiores e favoreceram a formação de ramos (DEBNATH, 2005). Os autores atribuem esse resultado ao efeito que a posição tem na disponibilidade de nutrientes e reguladores de crescimento para as diferentes partes do explante.

No entanto, Jabbarzadeh & Khosh-Khui (2005) não observaram diferença na taxa de proliferação de ramos de *Rosa damascena* a partir de segmentos nodais, quando inoculados horizontal, vertical ou obliquamente.

Estudos sobre o efeito da orientação do explante na calogênese e na organogênese ainda são raros, e os resultados encontrados ainda são conflitantes. Dessa forma, torna-se importante ampliar as investigações para outras espécies, a fim de aumentar o conhecimento que se tem sobre este fator na cultura de tecidos.

### **6.1.3. Efeito do tipo de explante e da presença ou ausência de luz sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis***

No experimento que avaliou a calogênese a partir de diferentes tipos de explante de *C. fissilis*, em fotoperíodo de 16 horas ou na ausência de luz, foi possível perceber que a origem do tecido utilizado tem grande influência sobre a calogênese, mas a fonte de carbono utilizada e a presença ou ausência de luz durante o cultivo também são determinantes.

Os explantes que apresentaram menor frequência de calogênese foram segmentos de folha e de raiz, no meio de cultura suplementado com sacarose, cultivados na presença de luz. Uma das principais diferenças observadas entre os calos formados a partir dos diferentes tipos de explantes foi a formação de raízes nos calos iniciados a partir de segmentos foliares e cotiledonares, que ocorreu com frequência em todos os tratamentos. Esta resposta provavelmente está ligada ao balanço endógeno de fitormônios, já que a síntese de auxinas ocorre na parte aérea das plantas e está relacionada ao enraizamento. Calos com raízes também se formaram a partir de segmento apical e hipocótilo no meio de cultura contendo sacarose, e a partir de segmento nodal cotiledonar e raiz em meio de cultura contendo glucose. Nestes casos, a formação de raízes pode ter sido decorrente da combinação entre o conteúdo endógeno de hormônios e os reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, que formaram as condições favoráveis à rizogênese.

Os calos iniciados a partir de segmentos foliares e raiz apresentaram os menores valores de massa fresca, enquanto que os calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares tiveram os maiores valores de massa fresca. Os menores valores de massa seca foram obtidos de calos formados a partir de segmentos foliares, raiz e hipocótilo. Os calos iniciados a partir de hipocótilo apresentaram também o maior teor de água. Estas respostas diferenciadas a um mesmo tratamento podem ser devido ao tecido de origem do calo. As células dos explantes de segmentos foliares, cotiledonares, raízes e hipocótilos já possuem alto grau de especialização quando são induzidas, pelos reguladores de crescimento do meio de cultura, a se desdiferenciar. Este processo de desdiferenciação provavelmente ativa diferentes rotas metabólicas em cada um dos tecidos. As células de segmentos nodais cotiledonares e de segmentos apicais, por outro lado, possuem grande número de células meristemáticas e balanços hormonais muito diferentes dos explantes vindos de tecidos mais especializados. Isso provavelmente faz com que a formação dos calos ocorra pela ativação de vias metabólicas diferentes daquelas utilizadas pelos tecidos mais diferenciados.

O tipo de explante também teve influência na calogênese em *Allium chinense*. Yan *et al.* (2009) cultivaram a placa basal, segmentos de raiz e de folha em meio B5, e verificaram que a placa basal apresentou a maior frequência de calogênese (47,5%), os segmentos de raiz tiveram 14,7% de calogênese e segmentos de folha formaram a menor

quantidade de calos (0,4%). Soomro & Memon (2007) relataram que a indução de calos a partir de hipocótilos de *Jatropha curcas* chegou a 100%, enquanto que em folhas, a indução foi de apenas 40%. Os autores relataram também que os calos formados a partir de folhas eram verde escuro, compactos e nodulares, diferentemente dos calos formados a partir de hipocótilo, que eram verde claro e friáveis.

A influência do tipo de explante e da luz na calogênese também foi estudada por Medina *et al.* (1998), que utilizou segmentos de folha, cotilédone, hipocótilo e pecíolo de *Medicago strasseri* para indução de calos. Os autores também testaram diferentes combinações de reguladores de crescimento e o cultivo em fotoperíodo de 16 horas ou na ausência de luz. A interação entre o tipo de explante e a combinação de reguladores de crescimento resultou em respostas bem variadas quanto à formação de massa fresca dos calos. O cultivo dos calos no escuro resultou em quantidades inferiores de massa fresca, em comparação aos calos cultivados na presença de luz.

De forma semelhante, os resultados do presente trabalho também mostraram que o cultivo dos calos na ausência de luz resultou em menores valores de massa seca e maior teor de água nos calos em todos os tratamentos. A ausência de luz durante o cultivo também implicou no aumento da formação de raízes nos calos iniciados a partir de segmentos cotiledonares. Foram observados menores valores de massa fresca dos calos cultivados no escuro, nos meios de cultura contendo sacarose ou glucose, porém em meio de cultura contendo frutose o efeito contrário foi observado. Resultados parecidos foram relatados por Nunes (2000), nos quais calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos de raiz, epicótilo e segmento cotiledonar foram formados em maior frequência no escuro. Calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis* apresentaram menores valores de massa seca quando cultivados na ausência de luz (MIOTO, 2007). Estes resultados demonstram que a luz tem grande influência ativação de diversas vias metabólicas pelas células.

O desenvolvimento das células vegetais está intimamente relacionado à ação da luz, não apenas com relação ao processo de autotrofia, mas também a germinação de sementes, formação de ramos e raízes e síntese de metabólitos secundários. A produção de antocianinas em suspensões celulares de *Cleome rosea* foi maior em condições de cultivo com maior luminosidade (SIMÕES *et al.*, 2009). A análise de compostos voláteis em calos iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis* cultivados na presença ou na ausência de luz



mostraram as condições de cultivo têm influência direta na composição fitoquímica dos calos (LAUDANO, 2005).

#### **6.1.4. Efeito das fontes de carbono, da glutamina e da formulação salina do meio de cultura sobre o crescimento de calos de *Cedrela fissilis***

Células e tecidos cultivados *in vitro* não são autotróficos, ainda que possuam pigmentação verde, e a adição de uma fonte externa de carbono ao meio de cultura é necessária para o crescimento e a multiplicação celular (RAZDAN, 2003). Estudos comparando o efeito de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento de calos são numerosos, pois os açúcares atuam não apenas como fonte trófica, mas também como reguladores osmóticos do meio de cultura, influenciando diretamente o crescimento e a morfogênese das culturas (PAIVA NETO & OTONI, 2003).

Embora a sacarose seja o açúcar mais utilizado nos meios de cultura (NARAYANASWAMY, 1994; PAIVA NETO & OTONI, 2003; RAZDAN, 2003), neste trabalho foi observado que a frutose e a glucose foram mais eficientes na indução de calos. Após 8 semanas de cultivo, os meios de cultura contendo frutose ou glucose tiveram 100% de calogênese na maioria das concentrações, enquanto que o máximo observado no meio com sacarose foi de 46% de calogênese. Além disso, a massa fresca dos calos crescidos em meio de cultura contendo glucose ou frutose foi maior do que a massa fresca dos calos crescidos em meio de cultura contendo sacarose. De maneira semelhante, Trejgell *et al.* (2006) relataram que a frutose e a glucose foram mais eficientes na indução de calos a partir de segmentos de hipocótilo, segmentos de cotilédone e botões florais de *Pharbitis nil*, e Fuentes *et al.* (2000) demonstraram que a frutose foi o açúcar que teve melhores resultados na indução de embriogênese somática em dois dos três genótipos de *Coffea canephora* utilizados no experimento.

Petersen *et al.* (1999) obtiveram resultados um pouco diferentes. Ao comparar o efeito de sacarose, glucose, frutose e a mistura de glucose + frutose sobre a calogênese embriogênica a partir de segmentos foliares de *Miscanthus x ogiformis*, os autores relataram que a glucose foi o açúcar que promoveu maior calogênese (65%). A mistura de glucose + frutose teve 59,3% de frequência na calogênese, sacarose formou 55,2% de calos e frutose apresentou o menor índice dentre estes açúcares (48%).

Embora os dados de frequência de indução de calos e de massa fresca indiquem que os monossacarídeos glicose e frutose geram melhores resultados no crescimento dos calos de *C. fissilis*, os dados de massa seca e teor de água revelam que é a sacarose o açúcar que produz o melhor crescimento real, pois os calos crescidos em meio de cultura contendo sacarose apresentaram os maiores valores de massa seca e os menores teores de água. De acordo com Figueiredo *et al.* (2000), a massa seca é uma medida mais precisa do crescimento celular pois um acúmulo de água ocorre depois que a massa seca máxima é atingida, gerando um falso resultado quando se considera a massa fresca como parâmetro de crescimento dos calos. Em experimentos com *Hevea brasiliensis*, a maior massa seca e o menor teor de água em calos também ocorreu em meio de cultura contendo sacarose, enquanto que os calos crescidos em meio de cultura contendo frutose ou glicose apresentaram menores valores de massa seca e maiores teores de água (BLANC *et al.*, 1999).

Outros experimentos de indução de calo realizados com segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis* por Laudano (2005) e Miotto (2007) mostraram que a sacarose foi o melhor carboidrato para promover o crescimento de calos em quantidade de massa. Nenhum dos autores, no entanto, menciona a frequência de calogênese obtida com cada um dos açúcares.

Além disso, este trabalho mostrou que o acúmulo de biomassa nos calos está diretamente relacionado ao aumento na concentração da fonte de carbono. Os maiores valores de massa fresca e de massa seca foram obtidos nos meios de cultura que continham a maior concentração de glicose, frutose ou sacarose (118 mM). O tempo de cultivo também teve influência no crescimento dos calos, como pôde ser observado nos tratamentos com glicose ou frutose, nos quais, após 8 semanas, a massa fresca e a massa seca obtidas foram maiores do que aquelas após 4 semanas de cultivo. Estes resultados estão em acordo com os resultados obtidos por Laudano (2005) e Miotto (2007), que testaram os efeitos do período de cultivo (4 e 8 semanas) e da fonte de carbono (glicose, frutose e sacarose), e os efeitos de diferentes concentrações de sacarose (58,4; 87,6; 116,8 mM) sobre a calogênese a partir de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*.

A adição de 2,73 mM de glutamina ao meio de cultura teve efeitos diferentes com relação à frequência na calogênese, dependendo de cada açúcar utilizado. Nos meios de cultura contendo sacarose, a adição de glutamina resultou em menor taxa de calogênese na menor

concentração de sacarose, mas aumentou a calogênese nas demais concentrações. Quando adicionada nos meios de cultura suplementados com frutose, a glutamina também reduziu a calogênese quando utilizada com a menor concentração de frutose. Nas demais concentrações deste açúcar, a calogênese foi de 100% nos tratamentos com e sem glutamina. Quando utilizada no meio de cultura contendo glucose, a glutamina reduziu a frequência de calogênese em todas as concentrações do açúcar utilizadas. No entanto, a adição de glutamina ao meio de cultura, em todos os tratamentos com as diferentes fontes de carbono, provocou uma redução dos valores de massa fresca e de massa seca, comparados aos tratamentos que não receberam glutamina. Laudano (2005) testou a adição de 2,73 mM de glutamina ao meio de cultura suplementado com três concentrações de sacarose, e observou a mesma tendência, exceto quando a glutamina foi utilizada juntamente com a concentração intermediária de sacarose (87,6 mM), que apresentou um aumento na biomassa, em relação ao mesmo tratamento, sem a glutamina.

Quando duas concentrações de glutamina (2,73; 4,10 mM) foram testadas em combinação com glucose, frutose ou sacarose (118 mM), a calogênese foi de 100% nos meios de cultura contendo apenas glucose ou glucose em combinação com glutamina. Nos meios de cultura suplementados com frutose, ocorreu 100% de calogênese na ausência de glutamina, ou quando usada na menor concentração. Nos meios de cultura contendo sacarose, a maior frequência de calogênese ocorreu na presença de 2,73 mM de glutamina, e a menor frequência ocorreu na maior concentração de glutamina. Nos tratamentos suplementados com sacarose ou glucose, o aumento de glutamina no meio de cultura resultou na redução dos valores de massa fresca e massa seca dos calos. Nos tratamentos com frutose, os menores valores de biomassa ocorreram na presença de 2,73 mM de glutamina, e os maiores valores foram obtidos no meio de cultura sem o aminoácido.

Marques *et al.* (1998) testaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio, arranjasdas em 8 tratamentos, sobre o crescimento de explantes caulinares de *Chrysanthemum morifolium*. Os tratamentos que continham glutamina + uréia ou apenas glutamina apresentaram baixos valores de massa fresca, massa seca, desenvolvimento de raízes e número de folhas. O tratamento que utilizou apenas glutamina apresentou os menores valores dentre os 8 tratamentos testados, sugerindo um efeito inibitório da glutamina, assim como foi observado nos calos de *C. fissilis* no presente trabalho. Razdan (2003) alerta que a utilização de aminoácidos separadamente pode ter efeito inibitório no

crescimento celular, sendo indicado o uso de combinações de aminoácidos.

Neste trabalho também foram investigados os efeitos de diferentes composições de meio de cultura sobre o crescimento de calos a partir de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis*. Foram testadas as formulações MS, WPM, B5, W, SH, K ou AR, suplementadas com 118 mM de glicose, frutose e sacarose. No entanto, apenas no meio de cultura MS houve calogênese satisfatória. Nos demais meios de cultura, ocorreu apenas o intumescimento dos explantes, seguido de oxidação, ou apenas a oxidação.

Estes resultados diferem muito do que foi observado por Nunes (2000), que avaliou o efeito dos mesmos meios de cultura, exceto o meio AR, sobre a calogênese a partir de segmentos cotiledonares e relatou a calogênese nos 6 meios de cultura testados, com frequências que variaram entre 83,3 – 100%, além de ter observado a formação de ramos e/ou raízes em 4 meios de cultura. No entanto, a concentração de sacarose utilizada pelo autor foi de 58,4 mM. É possível que a concentração dos açúcares utilizada no presente trabalho, de 118 mM, em combinação com os demais componentes orgânicos e inorgânicos presentes nos meios de cultura, tenha alterado seu potencial osmótico e interferido negativamente na formação dos calos. A constituição salina dos meios de cultura tem grande influência no crescimento das culturas celulares, como observaram Langezaal & Scheffer (1992). Em seus experimentos, a substituição do meio de cultura B5 por meio de cultura MS inibiu o crescimento de suspensões celulares de lúpulo (*Humulus lupulus*), e atribuíram esse efeito ao aumento de concentração de  $\text{NH}_4^+$  deste meio de cultura.

Outro tipo de efeito, desta vez relacionado ao tipo de explante usado, foi relatado por Mito (2007), que também testou os 7 meios de cultura, porém utilizando segmentos apicais e cotiledonares de *C. fissilis*. Segundo o autor, a calogênese a partir de segmentos apicais não foi satisfatória em nenhum dos meios avaliados. Houve calogênese a partir dos segmentos cotiledonares em 6 dos 7 meios de cultura, sendo que o autor relatou mortalidade de todos dos explantes inoculados no meio W.

Os resultados obtidos confirmam que a calogênese acontece sob a influência e interação de inúmeros fatores, que vão desde a composição do meio de cultura (balanço de reguladores de crescimento, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais minerais) até as características da planta doadora do tecido (espécie, genótipo, órgão de origem, idade),

além das condições de cultivo, como temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo (CHAWLA, 2002; TERMIGNONI, 2005). Estudos mais profundos sobre o metabolismo primário e secundário nas diferentes condições de cultivo podem fornecer subsídios para a seleção e o crescimento de culturas de calos que favoreçam a biossíntese de compostos de interesse econômico.

## **6.2. Dissimilação de açúcares e análise do perfil metabólico de calos de *Cedrela fissilis***

Neste trabalho, o crescimento dos calos foi avaliado através da metodologia das curvas de dissimilação, proposta por Schripsema (1990). Esta metodologia baseia-se no fato de que apenas uma parte do açúcar presente no meio de cultura é convertido em biomassa, enquanto que a outra parte é dissimilado pelas células na respiração, onde o consumo de O<sub>2</sub> gera CO<sub>2</sub> e água. Neste processo, quantidades equimolares de O<sub>2</sub> são substituídas por CO<sub>2</sub>, o que resulta na perda de massa observada nos frascos de cultura que pode ser utilizada para a determinação do crescimento da cultura (SCHRIPSEMA, 1990; LANGEZAAL & SCHEFFER, 1992).

O crescimento normal de culturas celulares é caracterizado por um perfil sigmoidal, composto por uma fase de adaptação das células ao meio de cultura, conhecida como fase *lag*, seguida de um crescimento exponencial, de uma fase estacionária, e, por fim, de um período onde a cultura entra em declínio. As curvas de crescimento obtidas nas culturas de calos de segmentos nodais de *C. fissilis* validam a utilização do método de dissimilação para a avaliação do crescimento dos calos e também para a comparação entre os diferentes tratamentos.

Os 6 tratamentos avaliados neste trabalho revelaram que modificações no meio de cultura resultam em expressivas diferenças no crescimento de calos. Os calos crescidos em meio contendo frutose apresentaram uma fase *lag* de aproximadamente 3 dias, e um crescimento exponencial de 5 dias. A partir do 9º dia de cultura, o ritmo de crescimento diminui e parece atingir a fase estacionária por volta do 25º dia de cultivo, embora algum crescimento ainda possa ser notado. A curva de dissimilação da glicose também possui uma fase *lag* que dura 4 dias, porém depois disso a cultura inicia um crescimento com tendência linear até o final do período de cultivo, sem apresentar uma fase exponencial e uma fase estacionária bem definidas. Esse perfil sugere que em 8 semanas, período que durou o experimento, os calos

crescidos em meio contendo glucose ainda não atingiram seu crescimento máximo. A curva de dissimilação dos calos cultivados em meio de cultura contendo sacarose não apresenta uma fase *lag* bem definida, exibindo um crescimento com tendência linear ao longo de todo o período de cultivo e iniciando uma fase estacionária nos últimos dias. As curvas de dissimilação dos três tratamentos indicam que sacarose, glucose e frutose são absorvidos e metabolizados de maneiras e em taxas diferentes pelas células. A frutose aparentemente proporciona um crescimento mais rápido, porém os calos atingem o máximo crescimento muito antes dos calos crescidos nos outros tratamentos. O crescimento dos calos em meio de cultura suplementado com glucose ou sacarose parece ser mais lento, porém mais prolongado.

Além de serem fonte de energia e carbono, os açúcares atuam nas células como moduladores na expressão gênica e na regulação metabólica. As células possuem capacidade de perceber alterações no status dos açúcares e responderem a essas alterações ativando ou reprimindo genes que irão agir na divisão celular, na diferenciação e no metabolismo (KRETZSCHMAR *et al.*, 2007; GEORGE *et al.*, 2008). A suplementação do meio de cultura apenas com glucose ou frutose pode interferir na homeostase endógena, levando as células a ativar diferentes rotas metabólicas em resposta à presença de cada um dos açúcares, gerando diferença no crescimento dos calos.

Outro processo que pode influenciar no crescimento dos calos é a absorção diferencial entre os açúcares pelas células. Para ser absorvida, a sacarose precisa ser convertida em glucose e frutose ainda no meio de cultura, e isso ocorre tanto pelo efeito da autoclavagem do meio de cultura, quanto pela ação de invertases localizadas nas membranas celulares das células. Neste processo, a glucose é absorvida primeiramente. (MEDINA *et al.*, 1998; PETERSEN *et al.*, 1999; RAZDAN, 2003). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a frutose e a glucose, disponíveis no meio de cultura para utilização imediata, favorecem o crescimento dos calos, enquanto que o tempo exigido para a hidrólise da sacarose e a absorção diferencial que ocorre entre os monossacarídeos resultantes dessa quebra implicam em diferenças nos processos de indução e de crescimento dos calos.

Ao final do período de cultivo, os calos crescidos em meio de cultura contendo glucose ou frutose apresentaram massa fresca maior do que os calos crescidos na presença de sacarose. No entanto, quando se consideram os resultados dos experimentos prévios, em que os calos crescidos na presença de glucose ou frutose continham também maiores

teores de água em relação aos calos crescidos em meio de cultura contendo sacarose, mas que estes possuíam maior massa seca, é possível perceber que a sacarose estimula o metabolismo de forma diferente da glucose e da frutose. Blanc *et al.* (1999) encontraram resultados similares em culturas de calos de *Hevea brasiliensis* e atribuem o maior acúmulo de massa seca à sacarose devido ao fato de que, após sua hidrólise, as células têm a sua disposição o dobro de hexoses do que os meios que contêm glucose ou frutose, quando a molaridade inicial dos três açúcares é a mesma. Dessa forma, os calos cultivados em meio de cultura contendo os monossacarídeos não conseguem crescer tanto quanto aqueles cultivados na presença da sacarose. Figueiredo *et al.* (2000) observou que, durante a fase estacionária de suspensões celulares de *Rollinia mucosa*, um aumento na razão MF/MS estava relacionado à dissimilação dos estoques intracelulares de carboidratos e ao aumento do conteúdo de água nas células. Dessa forma, nos calos de *C. fissilis* crescidos em meio de cultura contendo glucose ou frutose, os altos teores de água e baixos valores de massa seca podem estar ligados à depleção dos açúcares do meio de cultura e à necessidade da utilização das reservas endógenas de carboidratos para sustentar o crescimento.

A adição de glutamina ao meio de cultura, como já foi demonstrado em experimentos anteriores, leva a uma redução do crescimento dos calos. Isso foi confirmado através das curvas de dissimilação, onde os tratamentos com glutamina apresentaram valores de dissimilação menores em relação à dissimilação ocorrida nos tratamentos sem o aminoácido. Nos calos cultivados em meio de cultura contendo frutose ou sacarose, a adição de glutamina resultou em um aumento na fase *lag*, sugerindo que a adaptação do metabolismo das células ao meio contendo a glutamina demanda mais tempo, atrasando o início do crescimento dos calos. Nos calos cultivados em meio contendo glucose, a fase *lag* sofreu uma pequena redução em relação ao tratamento sem glutamina, porém o ritmo de crescimento das culturas começou a diminuir por volta do 33º dia, entrando no período estacionário no 46º dia. Isso indica que o balanço entre moléculas de glucose e de glutamina pode ter sido benéfico para o crescimento dos calos, mas que, ao longo tempo, o consumo de ambas as moléculas acaba por antecipar o período estacionário e o cessamento de crescimento dos calos.

A glutamina é precursora do glutamato, que é uma molécula chave para a síntese de inúmeras moléculas orgânicas, como ácidos nucléicos, aminoácidos e metabólitos secundários. Seu metabolismo,

assim como o de outros aminoácidos, está relacionado à assimilação de nitrogênio, à fixação de carbono e ao metabolismo secundário, e depende de uma fina regulação onde, muitas vezes, o produto final regula positiva ou negativamente a via biossintética. A adição de glutamina ao meio de cultura pode, dessa forma, inibir alguma via metabólica, levando à depleção de outras moléculas. Uma vez que as vias metabólicas são interdependentes, a alteração em uma via ocasionará a alteração de outras, podendo modificar por completo o metabolismo de uma cultura (PRATELLI & PILOT, 2007; KISSEN *et al.*, 2010).

Isso fica muito evidente quando se observa a quantidade de compostos fenólicos totais dos calos. Os calos crescidos em meio de cultura contendo glutamina apresentaram valores de compostos fenólicos significativamente maiores do que os calos que cresceram na ausência da glutamina. Isso demonstra que a presença da glutamina no meio de cultura induz as células à formação destes compostos em maior quantidade. Ainda que a glutamina não seja precursora direta dos compostos fenólicos, pode estar promovendo alterações em uma via metabólica que, indiretamente, leva à ativação das vias biossintéticas dos fenólicos. Os compostos fenólicos constituem um grupo heterogêneo de moléculas que possuem diversas funções nas plantas, como proteção contra herbivoria e patógenos, atração de polinizadores e proteção contra danos da radiação ultravioleta. Durante a cultura de células e tecidos *in vitro*, a produção de fenólicos e sua excreção no meio de cultura costumam acontecer como resposta à injúria sofrida pelos explantes no momento em que são excisados da planta. A presença dos compostos fenólicos no meio de cultura é tóxica às células e acaba inibindo o crescimento das culturas e pode ter sido responsável pela diferença no crescimento dos calos observada nos experimentos realizados neste trabalho.

A dosagem de compostos secundários dos calos revelou também a produção de flavonóides, uma classe de compostos fenólicos que abrange as antocianinas, os flavonóis, as flavonas e as isoflavonas. Embora não tenha sido possível dosar compostos fenólicos e flavonóides nos calos cultivados em meio de cultura contendo sacarose, sem glutamina, a comparação entre os tratamentos contendo glucose ou frutose no meio de cultura e os tratamentos equivalentes contendo glutamina, demonstrou que a produção de flavonóides ocorreu em maior quantidade nos tratamentos sem glutamina, enquanto que a quantidade de fenólicos totais foi maior nos tratamentos com glutamina. Isso



demonstra que a presença da glutamina no meio de cultura está, de fato, levando à ativação de vias biossintéticas diferentes. A atividade biológica dos compostos fenólicos faz com que sejam muito utilizados como compostos medicinais e sua biossíntese é alvo de interesse industrial. Identificar quais compostos fenólicos são produzidos em diferentes condições de cultivo dos calos de *C. fissilis* e verificar possíveis atividades biológicas podem abrir mais uma possibilidade de produção de compostos secundários a partir de culturas *in vitro* de calos.

A dosagem de clorofilas totais evidenciou diferenças entre o conteúdo deste metabólito entre os calos crescidos nos diferentes tratamentos. Calos crescidos em meio de cultura suplementado com frutose ou glucose apresentaram maior quantidade de clorofila. Esses dados confirmam o que já havia sido observado ao longo dos experimentos, em que calos completamente verdes ou bege com porções esverdeadas eram a maioria nestes tratamentos. A presença de glutamina no meio de cultura novamente mostrou influenciar o metabolismo, diminuindo a formação da clorofila. O conteúdo de clorofila dos calos crescidos em meio de cultura com sacarose não diferiu significativamente do teor de clorofila dos calos crescidos na presença de sacarose e glutamina, porém foi significativamente menor do que os conteúdos de clorofila dos calos crescidos em meio de cultura contendo frutose ou glucose. Sabe-se que a sacarose reduz a formação de clorofila em culturas celulares e acredita-se que isso decorre da inibição da atividade da enzima ALA-sintase, responsável pela síntese do ácido 5-aminolevulínico, precursor das moléculas de porfirina, que compõe a clorofila (GEORGE *et al.*, 2008).

A presença de clorofila nas culturas celulares não está relacionada à capacidade autotrófica das células, mas indica que processos de diferenciação celular estão ocorrendo. Essa diferenciação muitas vezes não é desejada em culturas de calos e suspensões celulares, pois o início da diferenciação celular leva a uma redução na divisão celular e, conseqüentemente, no crescimento das culturas (GRZELAK & JANISKOWSKA, 2002). O início da fase estacionária nas culturas de calos cultivados em meio de cultura suplementado com frutose, ocorrido praticamente na metade do período total de cultivo, pode estar associado ao início da diferenciação celular e síntese de clorofila, encontrada em maior quantidade nos calos deste tratamento.

A espectroscopia de varredura em UV-vis mostrou ser uma ferramenta extremamente útil na identificação das classes de metabólitos secundários majoritárias nas culturas, auxiliando no direcionamento das

análises de quantificação dos metabólitos que foram realizadas posteriormente. A identificação das diferentes classes de compostos secundários através das regiões de absorbância foi feita com base em Harborne (1998).

Os espectros apresentaram a formação de uma grande banda da região de comprimento de onda entre 280 – 400 nm, onde ocorre a absorção da luz UV por compostos fenólicos. Os tratamentos que apresentaram maior absorbância nessa região foram de calos crescidos em meio de cultura contendo sacarose, sacarose e glutamina e glucose e glutamina, sugerindo que nestes tratamentos, a quantidade de compostos fenólicos poderia ser superior aos tratamentos dos calos crescidos em meio e cultura contendo glucose, frutose e frutose e glutamina. As dosagens de fenólicos totais e flavonóides confirmaram a presença desses compostos nos calos e permitiu identificar que os compostos fenólicos ocorreram em maior quantidade nos tratamentos que tinham glutamina no meio de cultura, embora a quantidade de flavonóides tenha sido maior nos tratamentos que não tinham glutamina no meio de cultura.

Picos de absorbância na região de absorção da clorofila (470 – 480 e 659 – 670 nm) também puderam ser identificados claramente, e a comparação entre os valores de absorbância dos tratamentos corroboraram com os conteúdos de clorofila dosados posteriormente. Nos espectros foi possível identificar também picos de absorbância referentes aos carotenóides (470 – 480 nm), antocianinas (530 – 540 nm) e citocromos (605 – 614 nm). Embora estes compostos não tenham sido dosados por metodologias mais específicas e precisas neste trabalho, fazê-lo se mostra importante para a composição mais precisa do perfil de metabólitos secundários produzidos pelos calos nos diferentes tratamentos.

A espectroscopia vibracional de infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR) permite identificar vários grupos funcionais nas estruturas orgânicas devido a frequências de vibrações características de cada grupo quando interagem com a radiação eletromagnética. Por ser uma metodologia rápida e simples, e por requerer pequenas quantidades de material para a análise, a FTIR tem sido utilizada na caracterização e diferenciação de metabólitos primários e secundários em células vegetais, tais como ceras, proteínas e carboidratos, uma vez que é possível identificar no espectro bandas específicas que caracterizam componentes individuais (SÉNÉ *et al.*,

1994; DUBIS *et al.*, 1999; KACURÁKOVÁ & WILSON, 2001; YANG & YEN, 2002).

Neste trabalho, a FTIR foi utilizada para comparar o perfil metabólico de calos crescidos em diferentes condições de cultivo. Nos espectros analisados foi possível identificar a ocorrência de diferentes grupos funcionais que constituem moléculas do metabolismo primário e secundário. Picos de transmitância em  $1000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$  identificam ligações C - C - OH, C - O - C, C - O e C - C, encontradas em moléculas de amido, sacarose, celulose e terpenos. As ligações CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, presentes em moléculas de lipídeos e em terpenos, formam picos em  $1300 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ . Picos em  $1400 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  identificam as ligações C = C, C = O e amidas primárias da estrutura de proteínas, lipídeos, compostos aromáticos e terpenos. Picos na região de  $2700 - 2900 \text{ cm}^{-1}$  correspondem às ligações CO - C - H de aldeídos.

Não foram encontrados na literatura estudos fitoquímicos semelhantes ao realizado neste trabalho, exceto o trabalho de Mito (2007), que também analisou por FTIR o perfil metabólico de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos apicais e segmentos nodais cotiledonares. O perfil fitoquímico dos calos também apresentou picos de transmitância na região de 1000, 1200, 1600, 1700, 2800, 2900 e  $3200 \text{ cm}^{-1}$ .

Embora todos os espectros tenham apresentado formação de picos nas mesmas regiões de comprimento de onda, o ponto do comprimento de onda exato onde ocorreram as formações dos picos diferem entre os tratamentos, indicando que, apesar de possuírem constituição muito parecida, ocorrem diferenças de nível qualitativo. Essas diferenças de estrutura em moléculas podem ser usadas como marcadores, identificando substâncias específicas sintetizadas em calos cultivados em diferentes condições. O chamado *fingerprinting* é baseado na ideia de que a composição molecular de uma determinada substância ou de uma mistura complexa, como é o caso do material celular vegetal, produz um perfil espectroscópico único, que permite sua caracterização e identificação. A habilidade de monitorar rápida e simultaneamente vários componentes torna este método ideal para selecionar espécies e linhagens de células de interesse e acompanhar a produção de metabólitos ao longo do cultivo (SCHULZ & BARANSKA, 2007). Dessa forma, a espectroscopia de FTIR pode ser utilizada como ferramenta no estudo de crescimento dos calos para se avaliar alterações metabólicas ao longo do período de cultivo e

também identificar a síntese de compostos de interesse em diferentes tratamentos.

### **6.3. Caracterização morfológica e histoquímica de calos de *Cedrela fissilis***

Nos experimentos de indução de calos de *C. fissilis*, a partir de segmentos nodais cotiledonares inoculados em meio de cultura MS suplementado com sacarose, frutose ou glicose, com ou sem glutamina, várias morfologias de calos foram identificadas. Em um mesmo tratamento foram observados calos com diferentes morfologias, variando principalmente a pigmentação e a textura.

Uma característica comum a todos os calos formados neste experimento, independente da fonte de carbono ou da presença ou ausência da glutamina no meio de cultura, foi a compacidade. Por outro lado, a influência de fatores genéticos na calogênese pode ajudar a explicar a razão de, em um mesmo tratamento, calos com diferentes morfologias terem sido formados. Embora a idade das plântulas doadoras dos segmentos nodais cotiledonares utilizados fosse a mesma, cada explante vinha de uma plântula diferente, ou seja, cada um tinha um genótipo diferente. Calos verde escuro, bege-esverdeado ou bege foram observados com frequência nos calos crescidos em meio de cultura contendo frutose ou glicose. Os calos crescidos em meio de cultura contendo sacarose geralmente tinham coloração bege e frequentemente apresentavam porções mais escuras, decorrentes da oxidação do tecido.

De acordo com Narayanaswamy (1994), a pigmentação dos calos pode ser uniforme ou desigual, e algumas regiões podem permanecer sem pigmentação. Geralmente, a pigmentação do calo é igual à do tecido que o originou, mas a pigmentação pode também ser perdida durante a cultura. O desenvolvimento de pigmentação verde, devido às clorofilas, está associado ao desenvolvimento de cloroplastos, que ocorre na presença de luz. Sabe-se que a disponibilidade de ferro, auxinas e citocininas, e a sacarose também afetam o conteúdo de clorofilas.

Albarello *et al.* (2007) relataram que, após 7 dias de cultivo de calos iniciados a partir de segmentos de pecíolo de *Cleome spinosa*, foram observados cloroplastos e grãos de amidos, além de elementos traqueias parcialmente diferenciados contendo pigmentos. Após 30 dias de cultivo, os calos apresentavam coloração alaranjada, e intensificou-se

a formação e o acúmulo de corpos de beta-caroteno no apoplasto e de corpos lipídicos nas células. Mudanças na estrutura e na organização celular ocorrem durante o desenvolvimento do calo. Os arranjos concêntricos de células, observados em todas as amostras submetidas à análise microscópica no presente experimento, podem constituir centros com atividade meristemática, indicando que os calos já estariam em um estágio de desenvolvimento tardio, quando as células começam a se rediferenciar e originar estruturas e órgãos.

Narayanaswamy (1994) descreve que, em calos compactos, as células são justapostas, de maiores dimensões e vacuoladas. Essas características foram observadas em todas as amostras analisadas neste experimento. Quando os calos foram corados com Azul de Toluidina (AT-O), as paredes celulares de algumas células apresentaram leve reação metacromática, produzindo uma coloração violácea. A coloração é produzida por polissacarídeos com grupo carboxil e sulfatados se corados com pH 4.4; em pH com valor igual ou menor que 1.0 somente os grupos sulfatos têm carga elétrica e resultam em metacromasia (McCULLY, 1968). Esta reação indica a presença de polissacarídeos ácidos, ainda que em pequena quantidade, na parede celular dos calos. Também em algumas células foram observados inúmeros grânulos que reagiram ortocromaticamente à coloração.

A coloração com PAS é utilizada para a identificação de polissacarídeos neutros, porque requer a presença de grupos 1,2-glicol que são oxidados para aldeídos pelo ácido periódico (TRICK & PUESHEL, 1990). A parede celular das células dos calos analisados reagiu positivamente a esta coloração, devido à presença de celulose em sua constituição. De acordo com Narayanaswamy (1994), a quantidade total de polissacarídeos da parede celular é alta nos calos compactos. A reação do ácido periódico ocorreu também no citoplasma das células, corando intensamente grânulos de amido. Nas amostras 1, 2 e 4 a frequência dos grânulos de amido foi menor, ocorrendo principalmente nas células mais externas da região cortical dos calos. Por outro lado, as células das amostras 3 e 5 apresentaram grande quantidade de grânulos de amido. Na amostra 3, os grãos de amido puderam ser observados na periferia dos citoplasmas, ao redor dos volumosos vacúolos. Na amostra 5, grande parte do citoplasma das células era ocupado pelos grânulos. Segundo Medina *et al.* (1998), o acúmulo de amido nas células dos calos é comum e a quantidade acumulada varia de acordo com o tipo de calo formado. O acúmulo intenso deste carboidrato pode ser indicativo de desenvolvimento tardio e de diferenciação ocorrendo no calo, já que

a organogênese requer uma considerável quantidade de energia e que esta poderia derivar da degradação do amido. Em experimentos de indução de calo a partir de segmentos apicais de *Lycopodiella inundata*, Atmane *et al.* (2000) perceberam que a atividade mitótica das células estava intimamente ligada à quantidade de grãos de amido no citoplasma. Grãos de amido foram observados se acumulando na região perinuclear de pro-embriões de trigo cultivados *in vitro*. Além do amido, as células situadas na periferia da região meristemática dos embriões eram ricas em citoplasma e vacúolo (BAKOS *et al.*, 2009).

A alta afinidade de ligação a proteínas que o Azul Brillante de Coomassie (CBB) possui faz com que seja o corante mais utilizado na identificação e quantificação de proteínas totais (CAWOOD *et al.*, 1978). As proteínas são os principais constituintes das organelas e estão presentes no citoplasma como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas (BOUZON, 1999). As células dos calos analisados foram uniformemente marcadas pelo CBB, indicando que os componentes protéicos estão distribuídos em todo o citoplasma. Grânulos com forte coloração também foram observados em algumas células, indicando sua composição protéica. Grânulos de proteínas de reserva também foram observados em células de embriões somáticos de *Ocotea catharinensis* e em embriões zigóticos de *Theobroma cacao* (ALEMANNO *et al.*, 1997; SANTA CATARINA, 2001).

Os resultados obtidos neste experimento indicam que o tipo de calo formado depende de fatores externos, tais como a composição do meio de cultura e as condições de cultivo, mas também depende de fatores endógenos, como o genótipo da planta-mãe. Os testes histoquímicos mostraram que as diferenças entre os tipos de calos não se limita ao aspecto externo, mas que células com constituições e estágios metabólicos distintos podem habitar um mesmo calo, o que resulta na diversidade de morfologias de calos observada. Estudos bioquímicos futuros podem trazer maior conhecimento sobre o metabolismo dos diferentes tipos de calo, contribuindo para a otimização da cultura de calos de *C. fissilis* e suas possíveis aplicações.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com os experimentos de crescimento de calos, espectroscopia por UV-vis e FTIR e análise histoquímica dos calos de *Cedrela fissilis* permitem as seguintes conclusões:

1. A calogênese está relacionada diretamente à combinação de fatores genéticos e ambientais. A escolha da fonte de carbono, da formulação salina do meio de cultura, da combinação de reguladores do crescimento, do tipo de explante e das condições de cultivo, dentre outros fatores, induzem diferenças morfológicas e bioquímicas nos calos formados. Tais fatores podem, portanto, ser manipulados de forma a se obter calos com diferentes características de interesse.
2. Quando tomados juntos os resultados obtidos pela avaliação de crescimento das culturas através das curvas de dissimilação, espectrofotometria de UV-vis, espectroscopia de FTIR, dosagem de clorofila, compostos fenólicos totais e flavonóides, e análises histoquímicas, foi possível compreender melhor como os diferentes açúcares e a glutamina atuam sobre o crescimento de calos de *C. fissilis*.
3. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o estudo dos efeitos de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento de calos deve abranger diferentes métodos analíticos, tais como a avaliação de crescimento através de curvas de dissimilação, análises espectroscópicas, dosagem de metabólitos e histoquímica. Esta abordagem permite que se tenha conhecimento não apenas do efeito final de um fator sobre a cultura, mas também que se compreenda sua ação ao longo do período de cultivo, possibilitando a otimização das culturas de calos de *C. fissilis* e a obtenção de compostos de interesse.

## 8. REFERÊNCIAS

AITCHINSON, P. A.; MACLEOD, A. J.; YEOMAN, M. M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: **Plant Tissue and Cell Culture**. STREET, H. E. (ed) Blackweel Scientific Publications. 1977.

ALBARELLO, N.; RIBEIRO, I. G.; SIMÕES, C.; CASTRO, T. C.; GIANFALDONI, M. G.; CALLADO, C. H.; KUSTER, R. M.; COELHO, M. G. P.; MANSUR, E. Histological analysis of calluses form *in vitro* propagated plants of *Cleome spinosa* Jacq. **Revista Brasileira de Biociências**, vol. 5, n. 2: 699-701. 2007.

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explantes. **In vitro Cell Development Biology**, vol. 33: 163-172. 1997.

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, vol 3, n. 17: 542 – 547. 2006.

ANDERSON, W.C. Tissue culture propagation of rhododendrons. **In vitro**, n. 14: 133 – 139. 1978.

ARNOLD, W.; MITRENGA, D. & MAYRESBACH, H. Gefriertro und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA)- Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. **Acta Histochemica**, vol. 14: 271 – 277. 1975.

Arnon, D.I. Copper enzyme in isolated chloroplast. **Plant Physiology**, vol. 24: 1 – 15. 1949.

ATMANE, N.; BLERVACQ, A. S.; MICHAUX-FERRIERE, N.; VASSEUR, J. Histological analysis of indirect somatic embryogenesis in the Marsh clubmoss *Lycopodiella inundata* (L.) Holub (Pteridophytes). **Plant Science**, vol. 156: 159–167. 2000.

BAKOS, F.; SZABÓ, L.; OLMEDILLA, A. Histological comparison between wheat embryos developing *in vitro* from isolated zygotes and those developing *in vivo*. **Sex Plant Reprod**, vol. 22: 15–25. 2009.



BENSON, E. E. Cryopreservation. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.) – **Plant Cell Culture – A Practical Approach**. Oxford University Press, 2<sup>nd</sup> Ed. Ch. 7: 147 – 167. 1994.

BLANC, G.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; TEISSON, C.; LARDET, L.; CARRON, M. P. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 59: 103 – 112. 1999.

BOTTA, B.; SILVESTRI, A.; VITALLI, A.; MONACHE, G.D. Cultura de Células Vegetais: Doze Anos de Experiência. In: YUNES, RA & CALIXTO JB (Eds.) – **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos Editora Universitária. Ch. 10: 353 – 381. 2001.

BOUZON, Z.L. **Aspectos histoquímicos e ultraestruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales- Rhodophyta)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR. 1993.

BRUNETTA, J. M. F. C.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n. 71: 19 – 24. 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras – Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo, PR. EMBRAPA-CNPQ/SPI. 1994. 639p.

CAWOOD, A.; POTTER, U. & DICKINSON, H.G. An evaluation of coomassie brilliant blue as a stain for quantitative microdensitometry of protein in sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 76: 645-650, 1978.

CERDAS, L.V., DUFOUR, M. & VILLALOBOS V. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). **Revista de Biologia Tropical**, vol. 46: 225 – 228. 1998.

CÉSPEDES, C. L.; CALDERÓN, J. S.; GOMEZ-GARIBAY, F.; SEGURA, R.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. Phyto growth

properties of limonoids isolated from *Cedrela ciliolata*. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 25, n. 12: 2665 – 2676. 1999.

CÉSPEDES, C. L.; CALDERÓN, J. S.; SALAZAR, J. R.; LOTINAHENNSSEN, B.; SEGURA, R. Plant-growth inhibitory activity of cedrelanolide from *Cedrela salvadorensis*. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 27, n. 1: 137 – 149. 2001

CHAWLA, H. S. **Introduction to Plant Biotechnology**. Science Publishers, Inc. 2002.

De PAULA, J. R.; VIEIRA, I. J. C.; Da SILVA, M. F. G. F.; FO, E. R.; FERNANDES, J.; VIEIRA, P. C.; PINHEIRO, A. L.; VILVELA, E. F. Sesquiterpenes, triterpenoids, limonoids and flavonoids of *Cedrela odorata* graft and speculations of the induced resistance against *Hypsipyla grandella*. **Phytochemistry**, vol 44, n. 8: 1449-1454. 1997.

DEBNATH, S. Micropropagation of lingonberry: Influence of genotype, explant orientation, and overcoming TDZ-induced inhibition of shoot elongation using zeatin. **HortScience**, vol. 40, n. 1: 185 – 188. 2005.

DUBIS, E. N.; DUBIS, A. T.; MORZYCKI, J. W. Comparative analysis of plant cuticular waxes using HATR FTIR reflection technique. **Journal of Molecular Structure**, vol. 511–512: 173 – 179. 1999.

DUNN, W. B. & ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 24, n. 4: 285 – 294. 2005.

EASON H. M.; SETZER, W. N. Bark Essential Oil Composition of *Cedrela tonduzii* C. DC. (Meliaceae) from Monteverde, Costa Rica. **Records of Natural Products**, vol. 1 (2-3): 24 – 27. 2007.

FIGUEIREDO, S. F. L.; SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. *Rollinia mucosa* cell suspension cultures: Establishment and growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 63: 85 – 92. 2000.

FUENTES, S. R. L.; CALHEIROS M. B. P.; MANETTI-FILHO, J.; VIEIRA, L. G. E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 60: 5 – 13. 2000.

GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. Academic Press. London. 301 pp. 1984.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrients requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, n. 50: 151 – 158. 1968.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; De KLERK, G. Plant Propagation by Tissue Culture – Vol. 1: The Background. 3<sup>rd</sup> ed. Springer. 2008.

GIANOTTI, R. L.; BOMBLIES, A.; DAFALLA, M.; ISSA-ARZIKA, I.; DUCHEMIN, J-B.; ELTAHIR, E. A. B. Efficacy of local neem extracts for sustainable malaria vector control in an African village. **Malaria Journal**, 7:138. 2008.

GORDON, E.M. & McCANDLESS, E.L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. **Proceedings of Nova Scotia Institute of Science**, vol. 27: 111 – 133. 1973.

GOULART, H. R.; KIMURA, E. A.; PERES, V. J.; COUTO, A. S.; AQUINO DUARTE, F. A.; KATZIN, A. M. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol 48, n. 7: 2502 – 2509. 2004.

GRZELAK, A.; JANISZOWSKA, W. Initiation and growth characteristics of suspension cultures of *Calendula officinalis* cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 71: 29 – 40. 2002.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**. 3<sup>rd</sup> ed. Chapman & Hall. 1998.

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

HISCOX, J. D & ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Botany**, vol. 57: 1332 – 1334. 1979.

ISHII, K. Recent developments in vegetative propagation techniques and their application for Tropical Forest trees. In: SUZUKI, K.; ISHII, K. SAKURAI, S.; SASAKI, S. (Ed) – **Plantation Technology in Tropical Forest Science**. Tokyo: Springer-Verlag. Ch. 3: 31 – 39. 2006.

JABBARZADEH, Z.; KHOSH-KHUI, M. Factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). **Scientia Horticulturae**, vol. 105: 475 – 482. 2005.

JAIN, N.; BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; VAN STADEN, J. The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. **South African Journal of Botany**, vol. 75: 117 – 121. 2009.

JIMENEZ, A.; MATA, R.; PEREDA-MIRANDA, R.; CALDERON, J.; ISMAN, M. B.; NICOL, R.; ARNASON, J. T. Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. **Journal of Chemical Ecology**, vol. 23, n. 5: 1225 – 1234. 1997.

JOHRI, M. M.; MITRA D. Action of plant hormones. **Current Science**, vol. 80, n. 2: 199 – 205. 2001.

KACURÁKOVÁ, M.; WILSON, R. H. Developments in mid-infrared FTIR spectroscopy of selected carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**, vol. 44: 291 – 303. 2001.

KAO, K. N.; MICHAYLUK, M. R. Nutritional requirements of growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. **Planta**, n. 126: 105 – 110. 1975.

KAYIM, M.; KOC, N. K. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. **Scientia Horticulturae**, vol. 109: 29 – 34. 2006.

KISSEN, R.; WINGE, P.; TRAN, D. H. T.; JØRSTAD, T. S.; STØRSETH; T. R.; CHRISTENSEN, T.; BONES, A. M. Transcriptional profiling of an Fd-GOGAT1/GLU1 mutant in *Arabidopsis thaliana* reveals a multiple stress response and extensive reprogramming of the transcriptome. **BMC Genomics**, vol. 11: 190. 2010.

- KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catatinense – Meliáceas**. Itajaí, SC. 1984.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orquid Society Bulletin**, n.14: 214 – 217. 1946.
- KRETZSCHMAR, F. S.; OLIVEIRA JR., C. J. F.; BRAGA, M. R. Differential sugar uptake by cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, vol. 43: 71 – 78. 2007.
- KUMAR, G. H.; PRIYADARSINI, R. V.; VINOTHINI, G.; LETCHOUMY, P. V.; NAGINI, S. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit cell proliferation and induce apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. **Invest New Drugs**, vol. 28: 392 – 401. 2010.
- LAGO, J. H. G.; ÁVILA, P.; AQUINO, E. M.; MORENO, P. R. H.; OHARA, M. T.; NIMBERGER, R. T.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T. Volatile oils from leaves and stem barks of *Cedrela fissilis* (Meliaceae): chemical composition and antibacterial activities. **Flavour and Fragrance Journal**, n. 19: 1 – 4. 2004.
- LANGEZAAL, C. R.; SCHEFFER, J. J. C. Initiation and growth characterization of some hop cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 30: 159 – 164. 1992.
- LAUDANO, W. S. **Cultura de calos e criopreservação de sementes de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2005.
- LEE, S.K.; RAO, A.N. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* through tissue culture. **Garden Bulletin Singapore**, vol. 41: 11 – 18. 1988.
- LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; OLIVEIRA, C. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. DA SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M. Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, vol. 16 (6B): 1391 – 1395. 2005.

LEITE, A. C.; AMBROZIN, A. R. P.; CASTILHO, M. S.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; OLIVA, G.; SILVA, M. F. G. F.; THIEMANN, O. H.; LIMA, M. I.; PIRANI, J. R. Screening of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enzyme inhibitors. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol. 19 (1A): 1 – 6. 2009.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, n. 30: 421 – 437. 1981.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Ed. Plantarum: Nova Odessa, SP. 1992.

LUO, X.; WU, S.; MA, Y.; WU, D. Limonoids and phytol derivatives from *Cedrela sinensis*. **Fitoterapia**, 71: 492 – 496. 2000.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, vol 31, n.2: 117 – 124. 2010.

MAIA, B. H. L. N. S.; DE PAULA, J. R.; SANT'ANA, J.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; COSTA, M. S. S.; OHASHIB, O. S.; SILVA, J. N. M. Essential oils of *Toona* and *Cedrela* species (Meliaceae): taxonomic and ecological implications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 11, n. 6: 629 – 639. 2000.

MARQUES, D. A.; SHEPHERD, S. L. K.; CROCOMO O. J. Influência de fontes de nitrogênio sobre o desenvolvimento das gemas axilares de explantes caulinares de *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivado *in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 21, n. 2: 141-147. 1998.

MARUYAMA, E.; KINOSHITA, I.; ISHII, K.; OHBA, K.; SAITO, A. Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot

tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12–25°C. **Plant Cell Reports**, vol. 16: 393 – 396. 1997.

MARUYAMA, E.; ISHII, K. Somatic embryogenesis in big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. **Somatic embryogenesis of woody plants**. Ch. 3: 45 – 62. 1999.

MARZALINA, M.; KRISHNAPILLAY, B. Recalcitrant seed Biotechnology applications to rain forest conservation. In: BENSON, E. E. (Ed.) – **Plant Conservation Biotechnology**, London: Taylor and Francis Ltd., Ch. 17: 265 – 276. 1999.

McCULLY, M.E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 175: 702 – 711. 1970.

MEDINA, M.; VILLALOBOS, N.; DE LA CRUZ, P. J.; DORADO, A.; GUERRA, H. Effect of culture medium and light conditions on the morphological characteristics and carbohydrate contents of *Medicago strasserii* calli. **Acta Physiologiae Plantarum**, vol. 20, n. 4: 383 – 392. 1998.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Instrução Normativa nº 06, de 23 de setembro de 2008**. Brasil. 2008.

MIOTO, P. T. **Crescimento e análise preliminar do perfil fitoquímico de calos de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”. **Physiology Plantarum**, n.15: 473 – 497. 1962.

NARAYANASWAMY, S. **Plant cell and tissue culture**. Nova Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. 1994.

NUNES, E. C. **Sistemas de cultura e conservação *in vitro* para *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2000.

NUNES, E. C.; CASTILHO, C. V.; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 70: 259 – 268. 2002.

NUNES, E. C.; BENSON, E. E.; OLTRAMARI, A. C.; ARAUJO, P. S.; MOSER, J. R. and VIANA, A.M. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 12: 837 – 848. 2003.

NUNES, E. C. *et al.* Micropropagation of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). In: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (Ed) – **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer. Ch. 27: 221 – 235. 2007.

ORLIKOWSKA, T.; SABALA, I.; KUCHARSK, D. The effect of leaf and shoot tip removal and explant orientation on axillary shoot proliferation of *Codiaeum variegatum* Blume var. *pictum* Muell. Arg. cv. Excellent. **Scientia Horticulturae**, vol. 85: 103 – 111. 2000.

PAIVA NETO, V. B.; OTONI, W. C. Carbon sources and osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, vol. 97: 193 – 202. 2003.

PETERSEN, K. K.; HANSEN, J.; KROGSTRUP, P. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus x ogiformis* Honda ‘Giganteus’. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 58: 189 – 197. 1999.

PILATTI, F. K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E. E.; VIANA, A. M. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, vol. 27: 82-98. 2010.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos: a aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 4: 12 – 15. 1998.

PRATELLI, R; PILOT, G. Altered Amino Acid Metabolism in *Glutamine Dumper1* Plants. **Plant Signaling & Behavior**, vol. 2, n.3: 182 – 184. 2007.



RAMOS, D. F.; LEITÃO, G. G.; COSTA, F. N.; ABREU, L.; VILLARREAL, J. V.; LEITÃO, S. G.; FERNÁNDEZ, S. L. S.; DA SILVA, P. E. A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, vol 44, n. 4: 669 – 674. 2008.

RANDHIR, R; PREETHI, S; KALIDAS, S. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, vol. 37: 1247 – 1256. 2002.

RAZDAN, M. K. **Introduction to plant tissue culture**. 2<sup>nd</sup> ed. India: Science Publishers Inc. 2003.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Madeiras do Brasil**. Florianópolis: Ed. Lunardelli. 1979.

RIZZINI, C. T. **Árvores e Madeiras Úteis do Brasil – Manual de Dendrologia Brasileira**. Edgard Blücher. São Paulo, 1987.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. São Paulo: Ed. EPU. 1976.

ROBINS, R. J. Secondary products from cultured cells and organs: I. Molecular and cellular approaches. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.) – **Plant Cell Culture – A Practical Approach**. Oxford University Press, 2<sup>nd</sup> Ed. Ch. 8: 169 – 198. 1994.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 2, n. 29: 191 – 201. 2006.

ROY, J.; BANERJEE, N. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tips explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f. **Scientia Horticulturae**, vol. 97: 333 – 340. 2003.

SANTA CATARINA, C. **Crescimento *in vitro* e caracterização bioquímica, morfológica e histoquímica de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2001.

SCHENK, R. U.; HILDEBRAND, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, n. 50: 199 – 204. 1972.

SCHMIDT, E. C. **Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfisiologia de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty Ex P. Silva (Gigartinales) variantes pigmentares verde e vermelha.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2009.

SCHRIPSEMA, J.; MEIJER, A. H.; VAN IREN, F.; TEN HOOPEN, H. J. G.; VERPOORTE, R. Dissimilation curves as a simple method for the characterization of growth of plant cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 22: 55 – 64. 1990.

SÉNÉ, C. F. B.; McCANN, M. C.; WILSON, R. H.; GRINTER, R. Fourier-transform and Raman-transform infrared spectroscopy: an investigation of five higher plants cell walls and their components. **Plant Physiology**, vol. 106: 1623 – 1631. 1994.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, vol. 43: 13 – 25. 2007.

SIMÕES, C.; BIZARRI, C. H. B.; CORDEIRO, L. S.; CASTRO, T. C.; COUTADA, L. C. M.; SILVA, A. J. R.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 47: 895 – 903. 2009.

SOOMRO, R.; MEMON, R. A. Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. **Pakistan Journal of Botany**, vol. 39, n.7: 2431 – 2441. 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 4ª Ed., Artmed, Porto Alegre, 2009.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2005.

TREJGELL, A.; JARKIEWICZ, M.; TRETYN, A. The effect of carbon source on callus induction and regeneration ability in *Pharbitis nil*. **Acta Physiologiae Plantarum**, vol. 28, n. 6: 619 – 626. 2006.

TRICK, H. N.; PUESCHEL, C. Cytochemical of pit plugs in *Bossiela californica* (Corallinales, Rhodophyta). **Phycologia**, vol. 29: 403-409. 1990.

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. Engenharia do Metabolismo de Plantas Medicinais. In: YUNES, RA & CALIXTO JB (Eds.) – **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos Editora Universitária. Ch. 11: 381 – 432. 2001.

VIANA, A. M.; MAZZA, M. C.; MANTELL, S. Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian Rain Forest. In: BENSON, E. E. (Ed.) – **Plant Conservation Biotechnology**, London: Taylor and Francis Ltd. Ch. 18: 277 – 299. 1999.

VIEGAS JR., C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, vol. 26, n. 3: 390 – 400. 2003.

VILA, S.; GONZALEZ, A.; REY, H.; MROGINSKI, L. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cedrela fissilis*. **Biologia Plantarum**, vol. 53, n. 2: 383 – 386. 2009.

WEWETZER, A. Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of azadirachtin. **Phytoparasitica**, vol. 26, n. 1: 47 – 52. 1998.

WHITE, P. R. **The cultivation of animal and plant cell**. New York: Rolland Press, p. 57 – 63. 1963.

YAN, M.; XU, C.; KIM, C.; UMC, Y.; BAH, A. A.; GUO, D. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Chinese jiaotou* (*Allium chinense*). **Scientia Horticulturae**, vol. 123: 124 – 128. 2009.

YANG, J.; YEN, H. E. Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of ice plant and Arabidopsis: a Fourier Transform infrared spectroscopy study. **Plant Physiology**, vol. 130: 1032 – 1042. 2002.

ZACARIAS, A.A., MORESCO, H.H., HORST, H., BRIGHENTE, I.M.C., MARQUES, M.C.A. & PIZZOLLATI, M.G. Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. In: **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Santa Maria, Rio Grande do Sul. Setembro/1999**. 2007.