

**INFLUÊNCIA DOS SUBCULTIVOS E DA QUALIDADE DA LUZ NA
MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM *Cedrela fissilis* VELL. (Meliaceae)**

TADEU DOS REIS DE OLIVEIRA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO – 2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

022/2017

O48 Oliveira, Tadeu dos Reis de.

Influência dos subcultivos e da qualidade da luz na morfogênese *in vitro* em *Cedrela fissilis* vell. (Meliaceae) / Tadeu dos Reis de Oliveira – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.
112 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Bibliografia: f. 93 – 104.

Orientadora: Claudete Santa Catarina.

1. Micropropagação. 2. Fotomorfogênese. 3. Enraizamento. 4. Proteômica. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.95

INFLUÊNCIA DOS SUBCULTIVOS E DA QUALIDADE DA LUZ NA MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM *Cedrela fissilis* VELL. (Meliaceae)

TADEU DOS REIS DE OLIVEIRA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudete Santa Catarina

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO – 2017

INFLUÊNCIA DOS SUBCULTIVOS E DA QUALIDADE DA LUZ NA MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM *Cedrela fissilis* VELL. (Meliaceae)

TADEU DOS REIS DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 28 de Março de 2017.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Antônia Elenir Amâncio Oliveira (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof. Carlos Frederico de Menezes Veiga (D.Sc., Produção Vegetal) – UFRRJ

Prof. Vanildo Silveira (D.Sc., Biotecnologia) - UENF

Prof^a. Claudete Santa Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF
(Orientadora)

A Deus, pela força e coragem durante toda esta caminhada;
A meus pais, João e Francisca pelo amor, confiança e exemplo de vida.
DEDICO E OFEREÇO ESTA CONQUISTA

AGRADECIMENTO

A Deus, por permitir que eu chegasse até aqui;

À Professora Claudete Santa Catarina pelos ensinamentos, orientação, compreensão e confiança no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Professor Vanildo Silveira pelo auxílio, incentivo e disponibilidade sempre que precisei para a realização das análises proteômicas;

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Francisca e ao meu pai João, aos meus irmãos Ivanildo, Romildo, Rogéria, Roseane, Marluce, Silonilda e Mateus por acreditarem e torcerem sempre pelo meu sucesso;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) pelo apoio nas dificuldades em todos os momentos deste trabalho e por todos os momentos de descontração vividos durante a realização;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de qualificação;

A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa de mestrado;

Aos professores do curso, que contribuíram positivamente para a minha formação acadêmica, pela oportunidade de aprendizagem, confiança e incentivo;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Mata Atlântica	5
2.2. Espécie estudada	6
2.3. Micropropagação	7
2.4. Subcultivos na organogênese <i>in vitro</i>	10
2.5. Fotomorfogênese.....	11
2.6. Proteômica em plantas	12
3. OBJETIVO	14
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. CAPÍTULOS	15
4.1. INFLUÊNCIA DO SUBCULTIVO SOBRE A INDUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES <i>IN VITRO</i> E ENRAIZAMENTO <i>EX VITRO</i> DE <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)	15
RESUMO	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Material vegetal.....	19
2.2. Assepsia das sementes	19
2.3. Germinação <i>in vitro</i>	19
2.4. Efeito do número de subcultivos sobre a regeneração e crescimento de brotações	20
2.5. Efeito do número de subcultivo sobre o enraizamento <i>ex vitro</i> das brotações e aclimatização das mudas.....	22

2.6. Análise estatística dos dados	22
3. RESULTADOS.....	23
3.1. Efeito do número de subcultivos sobre a regeneração e crescimento de brotações <i>in vitro</i>	23
3.2. Influência do número de subcultivos sobre a taxa de multiplicação de brotações de <i>C. fissilis</i>	26
3.3. Efeito dos subcultivos no alongamento das brotações	26
3.4. Efeito do número de subcultivos sobre o enraizamento <i>ex vitro</i> das brotações e aclimatização das mudas.....	28
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
4.2. A INFLUÊNCIA DA LUZ NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO E A ABUNDÂNCIA DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EM BROTAÇÕES DE <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae)	43
RESUMO	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAIS E MÉTODOS	48
2.1. Material vegetal.....	48
2.2. Germinação <i>in vitro</i>	49
2.3. Efeito de diferentes espectros de luz azul no desenvolvimento de brotações <i>in vitro</i>	49
2.4. Análise da matéria fresca e seca	50
2.5. Análise proteômica	51
2.6. Análise estatística dos dados	54
3. RESULTADOS.....	54
3.1. Efeito do tipo de luz sobre a morfogênese de brotações	54
3.2. Análise proteômica	60
4. DISCUSSÃO.....	74
5. CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

RESUMO

OLIVEIRA, Tadeu dos Reis de. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2017. Influência dos subcultivos e da qualidade da luz na morfogênese *in vitro* em *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Orientadora: Dr^a. Claudete Santa Catarina.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito dos subcultivos sobre a regeneração e o desenvolvimento de brotações *in vitro* e enraizamento *ex vitro*, bem como avaliar o efeito da qualidade da luz sobre o desenvolvimento das brotações e sobre a abundância diferencial de proteínas na organogênese *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell. Segmentos nodais cotiledonares e apicais foram excisados de plântulas germinadas *in vitro* e utilizados como explantes. Estes explantes foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L⁻¹), fitagel (2,0 g.L⁻¹) e 2,5 µM de benziladenina (BA). Foram efetuados quatro subcultivos, com intervalos de 45 dias de cultura e ao final de cada subcultivo, foi analisado a taxa de multiplicação, indução, número e comprimento de brotações. Brotações em cada subcultivo foram utilizadas para o enraizamento *ex vitro* em substrato florestal e vermiculita (2:1; v/v) e após 45 dias foi avaliado a indução, número e comprimento de raízes. As mudas enraizadas foram transferidas para a casa de vegetação e avaliado a taxa de sobrevivência após 90 dias. Para avaliar a qualidade do espectro de luz sob o crescimento e desenvolvimento das brotações de *C. fissilis*, segmentos nodais cotiledonares e apicais foram inoculados em seis lâmpadas de diodo

emissor de luz (LED) com diferentes combinações de espectro de luz, e na lâmpada fluorescente (FLU). Após 45 dias de incubação, avaliou-se a indução, número e comprimento de brotações. Amostras de brotações obtidas nos tratamentos que possibilitaram o melhor resultado e o resultado inferior, bem como os explantes iniciais (antes da inoculação *in vitro*) foram coletadas para análises proteômicas. Os subcultivos afetaram significativamente o desenvolvimento da organogênese *in vitro*, o enraizamento *ex vitro* das brotações, e aclimatização das mudas. Os melhores resultados para os parâmetros analisados foram obtidos no primeiro subcultivo, com redução constante a partir do segundo subcultivo, em ambos os segmentos nodais. Brotações com tamanho $\geq 0,5$ e $\leq 1,49$ apresentaram melhores resultados no enraizamento. A qualidade da luz teve uma influência direta no desenvolvimento de brotos, com melhores resultados obtidos quando utilizados segmentos nodais cotiledonares na presença de BA. A combinação da lâmpada de LED BAmV com os espectros de luz branco, azul médio e vermelho afetou significativamente o alongamento das brotações. A análise proteômica por shotgun possibilitou a identificação de 761 proteínas. Deste total, 342 proteínas identificadas mostraram uma abundância diferencial nas brotações mantidas sob lâmpadas de LED BAmV e fluorescente (FLU), e nos explantes antes da incubação. Brotações incubadas em lâmpada de LED BAmV apresentou regulação positiva de importantes proteínas de fixação do carbono e fotossíntese, como Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, proteínas do fotossistema I P700, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NADP, e também àquelas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, tais como glutamina sintetase. Estes resultados são inéditos para a morfogênese *in vitro* em *C. fissilis* e são fundamentais para futuros estudos relacionados com a competência organogênica nesta espécie, assim como para outras arbóreas nativas.

Palavras-chave: Micropropagação, Fotomorfogênese, Enraizamento, Lâmpadas de LED, Proteômica, Segmentos nodais.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Tadeu dos Reis de. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2017. Influence of subcultures and light quality on *in vitro* morphogenesis in *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Advisor: Dr^a. Claudete Santa Catarina.

The aim of this work was to study the effects of subcultures on *in vitro* shoots regeneration and development and *ex vitro* rooting, as well as evaluate the effect of light quality on shoot development and differential abundance of proteins on *in vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. Cotyledonary nodal segments and apical were excised from seedlings germinated *in vitro* and used as explants. These explants were inoculated into MS culture medium supplemented with sucrose (20 g L⁻¹), Phytigel (2,0 g.L⁻¹) and 2.5 uM 6-benzyladenine. Four subcultures were performed with intervals of 45 culture days and, at end of each subculture, the shoot regeneration through of multiplication rate, induction, number and lengths of shoot were analyzed. Shoots developed throughout the subcultures were used to the *ex vitro* rooting in substrate Basaplant and vermiculite (2:1; v/v) and after 45 days, was evaluated the induction, number and length roots, the rooted shoots were transferred to greenhouse and evaluated the survival rate after 90 day. For evaluate the light spectrum quality under the growth and development of the shoots of *C. fissilis*, cotyledonary and apical nodal segments were incubated in six light-emitting diode (LED) lamps with different combinations of light spectrum and in fluorescent lamp (as control). After 45 days of incubation, the induction, number, and length of

shoots were evaluated. Samples of shoots obtained in the treatments with the highest and lowest results, as well as explants (before *in vitro* inoculation) were collected for proteomic analysis. Subcultures significantly affected the development of organogenesis *in vitro*, *ex vitro* rooting of shoots, and acclimatization of the plantlets. The best results for the analyzed parameters was obtained in the first subculture with constant reduction from the second subculture, for both segments. Shoots with size ≥ 0.5 and ≤ 1.49 showed better results in rooting. The quality of the LED light had a direct influence on the development of shoots, with better results when cotyledonar nodal segments was used in the presence of BA. The LED WBmR lamps combination with light spectrum of white, medium blue and red significantly affected the shoots elongation. In this total, 342 identified proteins showed a differential abundance comparing LED WBmR lamps and fluorescent lamps (control), and explants before of the inoculation. Shoots incubation under the LED WBmR lamps induced a higher presented positive regulation of important proteins of carbon fixation, photosynthesis, such as ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, proteins photosystem I P700 and also those related with nitrogen metabolism, such as glutamine synthetase. These results are unpublished for *in vitro* morphogenesis of *C. fissilis* and are fundamental for future studies related to organogenic competence in this species, as well as for other native tree species.

Keywords: Micropropagation, Photomorphogenesis, Rooting, LED lamps, Proteomics, Nodal segments.

1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos biomas que apresentou uma grande redução da área original ao longo dos anos, principalmente por ações antrópicas relacionadas a retirada da madeira de forma ilegal, expansão da agricultura e pecuária, urbanização, levando, desta forma, a ameaça de várias espécies florestais nativas (Oliveira et al., 2004; Fundação SOS Mata Atlântica, 2017). Entretanto, este bioma ainda apresenta uma grande diversidade de espécies vegetais, e uma das áreas que possui um extenso número de espécies endêmicas, sendo considerado um *hotspot* para conservação da biodiversidade no planeta (Myers et al., 2000; Oliveira et al., 2004; Mittermeier et al., 2005). Tendo em vista a importância da Mata Atlântica, há a necessidade de políticas para a conservação dos remanescentes deste bioma que atualmente encontram-se altamente fragmentados, bem como o restabelecimento de metodologias alternativas de propagação *in vitro* das espécies nativas ameaçadas de extinção, visando à reposição destas nas áreas de ocorrência (Carvalho, 2003; Ruschel et al., 2005; Fundação SOS Mata Atlântica, 2017).

Cedrela fissilis Vell (Meliaceae) é uma espécie arbórea nativa na Mata Atlântica, e atualmente, encontra-se ameaçada de extinção em decorrência da sua importância econômica na produção de madeira de qualidade, e possui potencial para a utilização em programas de reflorestamento e conservação (Carvalho, 2003; Ruschel et al., 2005; Valério et al., 2009). Além das ações antrópicas, o ataque de patógenos, a perda da viabilidade e capacidade de germinação das sementes

quando armazenadas por longos períodos são fatores que dificultam a propagação e a conservação de *C. fissilis* (Cherobini et al., 2008; Martins e Lago, 2008). Neste sentido, a propagação *in vitro* desta espécie, pela micropropagação, pode ser uma alternativa às metodologias convencionais (como a estaquia) para produção de mudas desta espécie (Nunes et al., 2002; Aragão et al., 2016).

A micropropagação é uma das técnicas mais utilizadas dentre a cultura de tecidos, em que apresentam importante impacto na multiplicação clonal em várias espécies, incluindo arbóreas (Soares et al., 2007; Pijut et al., 2012). Na micropropagação podem ser utilizados como fonte de explantes meristemas, embriões zigóticos ou somáticos, folhas, segmentos caulinares e raízes (Quiroz-Figueroa et al., 2002; Grafi, 2004; Aasim et al., 2008; Moura et al., 2012; Rathore et al., 2014; Siwach et al., 2014; Zuraida et al., 2017). Estes explantes quando inoculados sem condições assépticas, em meio de cultura e com condições ambientais controladas podem expressar a capacidade de formar novos órgãos como brotos e raízes (Roussos et al., 2016; Bianchetti et al., 2017). Esta característica é possível pela totipotência da célula vegetal, a qual possui potencial genético para gerar um novo indivíduo multicelular em meio de cultura adequado, resultando na formação de uma planta completa (Vogel, 2005).

A organogênese *in vitro* tem sido aplicada à propagação de várias espécies, incluindo arbóreas (Alves et al., 2004; Mohebalipour et al., 2012; Pijut et al., 2012; Aragão et al., 2016). Neste processo, as gemas axilares preexistentes em segmentos nodais possibilitam o desenvolvimento das brotações (Pijut et al., 2012; Aragão et al., 2016). Vários fatores, como tipo de explante, concentração de reguladores, meio de cultura adequado e condições ambientais controladas, assim como as sinalizações influenciam o sucesso da resposta morfogênética *in vitro*, como na organogênese (Mohebalipour et al., 2012; El-showk et al., 2013; Aragão et al., 2016).

Em espécies arbóreas segmentos nodais apicais ou cotiledonares têm sido utilizados como fonte de explante para estudos da organogênese *in vitro* por apresentar melhores respostas aos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, e pela presença de gemas axilares que podem ser induzidas ao crescimento de brotações *in vitro* (Nunes et al., 2002; Alves et al., 2004; Duclercq et al., 2011; Moura et al., 2012).

A capacidade para o desenvolvimento da organogênese pode ser influenciada por sucessivos subcultivos, levando a alterações no crescimento e desenvolvimento de brotações *in vitro* (Tiwari et al., 2002; Moura et al., 2012). O subcultivo é utilizado em várias espécies visando à multiplicação clonal, bem como em espécies arbóreas (Hamad e Taha 2008; Fermino Júnior et al., 2011), com a utilização de segmentos caulinares (Shimizu-Sato et al., 2001; Moura et al., 2012; Uzelac et al., 2012). Deste modo, o monitoramento visando avaliar o número de subcultivos que pode ser realizado é determinante para identificar o potencial de formação de brotações (Tiwari et al., 2002; Rocha et al., 2007; Fermino Júnior et al., 2011; Moura et al., 2012). Neste sentido, estudos sobre os fatores associados à capacidade de regeneração de brotações ao longo dos subcultivos são importantes para entender as bases fisiológicas e moleculares que modulam a organogênese *in vitro*.

Adicionalmente, a quantidade e qualidade da luz fornecida na propagação *in vitro* afetam a resposta morfogênética, uma vez que regulam a fotomorfogênese e a produção de energia pela fotossíntese em plantas (Gupta e Jatothu, 2013; Olle e Virsile, 2013). Nos últimos anos tem sido proposto a utilização de lâmpadas de diodo emissor de luz (LED) na cultura *in vitro* sendo, convencionalmente, utilizadas lâmpadas fluorescentes. As lâmpadas de LED possuem faixa espectral específica de luz, e têm demonstrado seus efeitos significativos em melhoria da morfogênese das plantas como alongamento do caule e entrenós (Poudel et al., 2008), e aumento da matéria seca e fresca (Nhut et al., 2001). Espectro de luz vermelho, vermelho extremo e azul têm sido utilizados para analisar os seus efeitos sob o crescimento e desenvolvimento de plantas e respostas morfogênicas *in vitro* (Poudel et al., 2008; Gupta e Jatothu, 2013; Heringer et al., 2017).

Devido à importância do espectro de luz na morfogênese *in vitro*, o estudo dos aspectos fisiológicos e bioquímicos associados com a organogênese é fundamental para entender os mecanismos de sinalização neste processo. Neste sentido, a proteômica apresenta um potencial para a compreensão dos fatores associados à morfogênese, possibilitando identificar proteínas diferencialmente abundantes em uma determinada resposta de crescimento e desenvolvimento vegetal (Hochholdinger et al., 2006; Baginsky, 2009; Takac et al., 2011; Heringer et al., 2017). Estudos relacionando o efeito do espectro de luz sobre alterações no proteoma possibilitaram a identificação de proteínas associadas aos efeitos

fisiológicos da luz nas plantas (Deng et al., 2014; Heringer et al., 2017). No entanto, são poucos os estudos relacionados com as respostas morfogenéticas *in vitro* sob diferentes espectros de luz, em espécies arbóreas.

Adicionalmente, estudos visando elucidar o efeito de subcultivos e do espectro de luz são fundamentais para o conhecimento básico sobre a sinalização das rotas morfogenéticas *in vitro*, bem como para o conhecimento aplicado relacionado à utilização de metodologias alternativas para a propagação de espécies arbóreas nativas, especialmente em *C. fissilis*.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito dos subcultivos sobre a regeneração e o desenvolvimento de brotações *in vitro* e o enraizamento *ex vitro*, bem como avaliar o efeito da qualidade da luz sobre o desenvolvimento das brotações e sobre a abundância diferencial de proteínas na organogênese *in vitro* de *C. fissilis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um bioma situado na costa litorânea do Brasil, de ocorrência do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, apresentando atualmente apenas 12,5% da área original (164.432,5 km²) somando todos os fragmentos de floresta nativa acima de 3 ha (Fundação SOS Mata Atlântica, 2017). Esta fragmentação é visível no Sudeste brasileiro, e o Estado do Rio de Janeiro exibe apenas 30,7% da área original da Mata Atlântica (Fundação SOS Mata Atlântica, 2017).

A diversidade biológica da Mata Atlântica tem sido ameaçada ao longo dos anos por atividades antrópicas desde a colonização, como a retirada da madeira de forma irregular, expansão da agricultura e pecuária, e urbanização favorecendo a fragmentação das áreas originais deste bioma (Oliveira et al., 2004; Peixoto et al., 2004; Mittermeier et al., 2005; Carvalho et al., 2006; Sobrinho et al., 2010). Apesar da intensa devastação, a Mata Atlântica ainda apresenta uma grande biodiversidade, e com alta concentração de espécies vegetais endêmicas, estando entre os cinco *hotspots* de biodiversidade mundial que necessitam ser preservados (Myers et al., 2000; Mittermeier et al., 2005; Bruno et al., 2014).

Tendo em vista a importância da Mata Atlântica quanto às suas riquezas naturais, há a necessidade de mecanismos de regeneração das áreas fragmentadas, bem como o restabelecimento das espécies nativas (Ruschel et al., 2005; Fundação SOS Mata Atlântica, 2017).

Esta intensa devastação e fragmentação da Mata Atlântica resultou além da fragmentação da floresta, também a ameaça de extinção de várias espécies arbóreas nativas listadas na *Red List da International Union of Conservation IUCN* (2017), como a *C. fissilis*.

2.2. Espécie estudada

Cedrela fissilis (Meliaceae) é popularmente conhecida como cedro ou cedro rosa. É uma árvore de porte arbóreo com potencial de atingir até 40 metros de altura (Carvalho, 2003; Valério et al., 2009). No Brasil *C. fissilis* possui ampla distribuição (Figura 1), com ocorrência do Rio Grande do Sul até Minas Gerais com maior quantidade nas formações de Floresta Ombrófila Densa Submontana (Floresta Atlântica e Floresta Amazônia) e em menor quantidade nas demais regiões do país (Carvalho, 2003; Biernaski et al., 2012; CNCFlora, 2012).

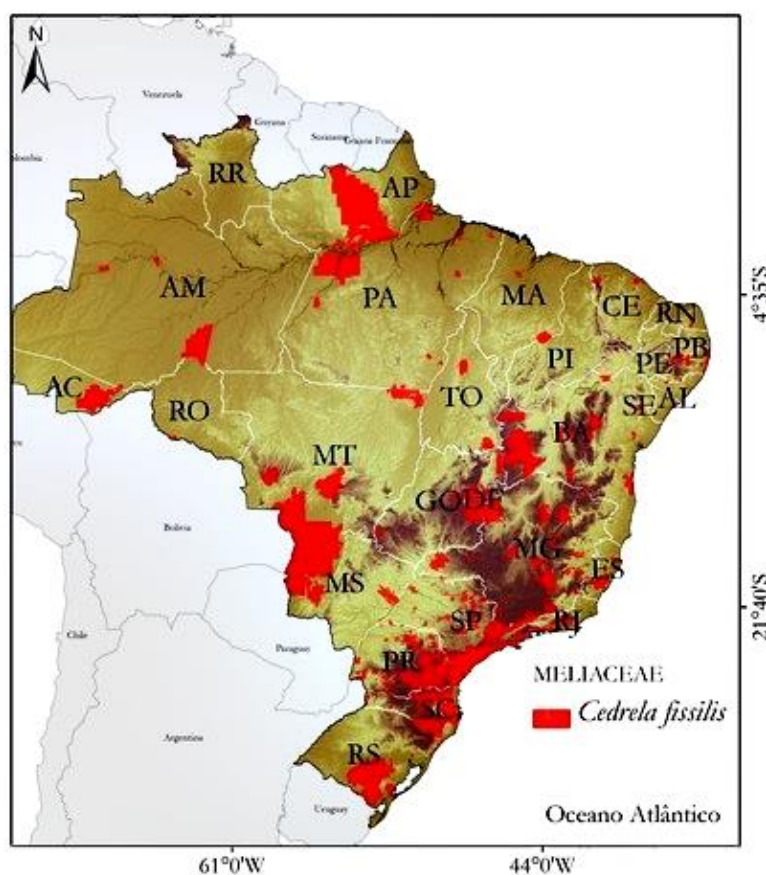


Figura 1: Mapa de distribuição de *C. fissilis* no Brasil. Fonte: CNCFlora, (2012), com modificações.

A floração e frutificação de *C. fissilis* ocorre em períodos distintos no Brasil dependendo da região em que está inserida, ocorrendo no Estado do Rio de Janeiro (Carvalho, 2003). As sementes são aladas (Beltrati et al., 1985), com

disseminação anemocórica, sendo classificadas como ortodoxas e a germinação das sementes foi caracterizada como epígea tendo em média 60% de germinação (Cavalcante, 2003). Fatores como, temperatura e ataque de patógenos, estão associados à perda da viabilidade e capacidade de germinação das sementes e conseqüentemente, afetam o tempo de armazenamento das sementes, dificultando a propagação e a conservação de *C. fissilis* (Cherobini et al., 2008; Martins e Lago, 2008).

A espécie de *C. fissilis* destaca-se pela utilização de sua madeira nobre na produção de móveis, construção civil, naval, formulação de óleos essenciais, alimentação de animais e na medicina popular (Carvalho, 2003; Ruschel et al., 2005; Valério et al., 2009). Atualmente, esta espécie encontra-se ameaçada de extinção na categoria em perigo (*Endangered*), ou seja, com perspectiva de diminuição de 50% dos indivíduos adultos dentro de dez anos (IUCN, 2017). Neste sentido, metodologias alternativas às convencionais, como a micropropagação, podem ser uma possibilidade para propagar espécies arbóreas ameaçadas de extinção (Pijut et al., 2012), como a *C. fissilis* (Nunes et al., 2002; Aragão et al., 2016).

2.3. Micropropagação

Cultura de tecidos vegetais é a cultura asséptica *in vitro* de células, tecidos, órgãos ou plantas inteiras, em condições nutricionais e ambientais controladas (Altman e Loberant, 1998; Thorpe, 2007). Uma das técnicas mais utilizadas na cultura de tecidos *in vitro* é a propagação vegetativa ou micropropagação, denominada assim devido ao tamanho utilizado dos explantes, que podem ser células, meristemas (Aasim et al., 2008), embriões zigóticos (Zuraida et al., 2017) ou somáticos (Quiroz-Figueroa et al., 2002), segmentos foliares (Siwach et al., 2014), caulinares (Moura et al., 2012) e raízes (Rathore et al., 2014). Em condições assépticas e em meio nutritivo adequado com presença ou não de reguladores de crescimento, bem como controle das condições ambientais, estes explantes, que contenham a capacidade de desdiferenciação e rediferenciação, possibilitam a indução e expressão de uma rota morfogênica *in vitro*, resultando na formação de novos órgãos como brotos e raízes (Grafi, 2004; Vogel, 2005). Esta resposta é possível devido à totipotencialidade das células vegetais, que se refere à capacidade de uma única célula para expressar o genoma completo quando

mantida em meios nutritivos e condições de incubação adequados e controlados, e por divisão celular origina um novo indivíduo multicelular, resultando na formação de uma planta completa (Grafi, 2004; Vogel, 2005; Thorpe, 2007).

A micropropagação se divide em várias fases. Nas fases 0 e 1 ocorre a escolha do explante e o estabelecimento da cultura asséptica. Na fase 2, denominada multiplicação, ocorre o desenvolvimento dos propágulos em meio de cultura contendo os nutrientes adequados para o crescimento *in vitro*. Na fase 3 ocorre o enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* das brotações, sendo necessário ou não o uso de regulador de crescimento indutor da formação de raízes, as auxinas (Lall et al., 2006).

No enraizamento *ex vitro*, as brotações são transferidas para substrato, ocorrendo simultaneamente, o enraizamento das brotações e a aclimatização das mudas (Yan et al., 2010). Alguns fatores podem tornar o enraizamento *ex vitro* vantajoso comparativamente ao *in vitro*, como a redução de etapas do processo de micropropagação e conseqüentemente, a redução de custos (Yan et al., 2010; Benmahioul et al., 2012; Ranaweera et al., 2013). Para *C. fissilis* foi obtida alta taxa de enraizamento das brotações *ex vitro* em substrato florestal e vermiculita (1:1; v/v) sem o uso deste regulador de crescimento ácido indol butírico (AIB) utilizando brotações obtidas no primeiro subcultivo (Ribeiro, 2015). Desta forma, a utilização de enraizamento *ex vitro* constitui uma alternativa viável para a propagação de plantas, especialmente a espécie em *C. fissilis*.

Na propagação *in vitro*, a organogênese tem sido utilizada em estudos de regeneração de plantas (Alves et al., 2004; Giri et al., 2004; Mohebalipour et al., 2012; Pijut et al., 2012). A resposta organogenética, tanto na formação de brotos quanto de raízes, pode ser obtida de forma indireta (passando pela formação de calo) (Flores et al., 2006; Duclercq et al 2011) ou direta (sem a formação de calo) (Nunes et al., 2002 Moura et al., 2012; Rathore et al., 2014). Para espécies arbóreas a mais comumente utilizada é a organogênese via direta, e pela presença de gemas axilares nos explantes pode ser estimulado seu crescimento gerando novas brotações *in vitro* com menor variação somaclonal (Alves et al., 2004; Giri et al., 2004; Nicioli et al., 2008; Carvalho et al., 2011).

A aquisição da competência é um passo chave para que ocorra o desenvolvimento da organogênese *in vitro* (Che et al., 2002; Duclercq et al., 2011). Vários fatores têm influência no potencial de organogênese *in vitro*, como origem

do explante, concentração de reguladores do crescimento vegetal, meio de cultura com nutrientes adequados e condições de cultura (temperatura e luz) controlados, bem como os mecanismos de interação que regulam eventos e sinalizações durante o desenvolvimento de brotações (Mohebalipour et al., 2012; El-showk et al., 2013; Aragão et al., 2016; Duclercq et al., 2011; Moura et al., 2012).

O tipo e a idade do explante são importantes para a obtenção da resposta morfogênica (Pijut et al., 2012). Tais explantes apresentam melhor resposta à sinalização oferecida por reguladores de crescimento exógenos, estimulando o desenvolvimento de brotações a partir de gemas axilares existentes nos explantes (Moura et al., 2012; Alves et al., 2004; Pijut et al., 2012).

Além do tipo de explante, o meio de cultura e os reguladores de crescimento são fatores fundamentais para a indução da resposta morfogênica desejada. Dentre os meios de cultura para plantas, o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) é o mais amplamente utilizado para a propagação de arbóreas em várias espécies, incluindo *C. fissilis* (Nunes et al., 2002; Aragão et al., 2016). Entretanto, outros meios de cultura, como Wood plant medium (WPM) (Loyd e McCown 1981) foi desenvolvido com uma formulação contendo menos nitrogênio especificamente para propagação de arbóreas como mangabeira (Soares et al., 2009) e cerejeira (Junior et al., 2012).

Auxinas e citocininas são dois grupos de reguladores de crescimento vegetal envolvidos na sinalização da organogênese *in vitro*, as quais interagem modulando e regulando divisão celular, formação de tecidos ou órgão (El-showk et al., 2013). Alguns trabalhos descrevem a utilização destes hormônios na formação de órgãos específicos da planta, ressaltando a importância em processos organogênicos (Nunes et al., 2002; Fett-Neto et al., 2001). Para a formação de brotos *in vitro*, se destaca o uso da 6-benziladenina (BA), uma citocinina utilizada para modular sinais necessários à reprogramação e proliferação de células de gemas laterais, e também atua na superação da dominância apical exercida por auxinas, estimulando o desenvolvimento de gemas axilares, e conseqüentemente, a formação de brotações (Nunes et al., 2002; Alves et al., 2004; Giri et al., 2004; Santos et al., 2004; Mohebalipour et al., 2012; El-showk et al., 2013; Uzelac et al., 2012; Shimizu-Sato et al., 2001).

Ademais, para o enraizamento, destaca-se a importância do uso de auxinas, por estimular divisões celulares e a formação e raízes a partir das brotações (Fet-

Neto et al., 2001). Para o enraizamento *in vitro* é necessário, antes da transferência para o solo, a indução das raízes adventícias nas brotações (Verstraeten e Beeckman, 2013).

Além destes fatores, o número de subcultivos e o tipo e a quantidade de luz são fatores importantes a serem considerados para a resposta morfogênica *in vitro*.

2.4. Subcultivos na organogênese *in vitro*

Subcultivo é a subdivisão de material já estabelecido *in vitro* e sua transferência para o novo meio e subsequente incubação, em condições controladas (Carvalho et al., 2011a; Moura et al., 2012). Este procedimento é utilizado para a multiplicação clonal das brotações na cultura *in vitro* (Hamad e Taha 2008; Fermino Júnior et al., 2011).

Estudos mostram que a competência para o desenvolvimento da organogênese pode ser influenciada pelo subcultivo, desencadeando alterações no crescimento e desenvolvimento de brotações (Tiwari et al., 2002; Moura et al., 2012). Uma vez induzida, a capacidade de desenvolvimento de brotações *in vitro* ao longo do subcultivos pode ser monitorada, visando avaliar quantos subcultivos podem ser realizados e que possibilitem a manutenção do potencial de formação de brotações (Tiwari et al., 2002; Rocha et al., 2007; Fermino Júnior et al., 2011; Moura et al., 2012). Em *Ananas comosus* L. Merr foi observado um elevado número de brotações no decorrer de subcultivos sucessivos (Hamad e Taha 2008). Diferentemente, em espécies arbóreas como *Cabralea canjerana* (Vell.), visando à multiplicação de segmentos nodais em três subcultivos foi observado a perda da capacidade de gerar novas brotações (Rocha et al., 2007). Em *Tectona grandis* L. foi mostrado que, mesmo com a adição de elevada concentração da citocinina 6-benzilaminopurina, não foi verificada uma boa resposta quando utilizados segmentos nodais para o subcultivos (Tiwari et al., 2002). Em espécies arbóreas como *T. grandis* e *C. canjerana* o número de brotos obtidos nos subcultivos foi menor, afetando também o desenvolvimento de raízes (Tiwari et al., 2002; Rocha et al., 2007) comparativamente a outras espécies (Hamad e Taha 2008).

Neste sentido, é fundamental estudos visando identificar o número de subcultivos que permitem manter a capacidade de regeneração de brotações *in vitro*, especialmente em arbóreas.

2.5. Fotomorfogênese

Na propagação *in vitro*, além da composição do meio de cultura e efeito do tipo de explante, o controle dos fatores ambientais, como temperatura e luz, é fundamental para a resposta morfogenética. Entre os fatores externos, a luz tem destaque fundamental para espécies fotoautotróficas, atuando na produção de energia pela fotossíntese, e também atuando como estímulo percebido por fotorreceptores que desencadeiam a fotomorfogênese em plantas (Gupta e Jatothu, 2013; Olle e Virsile, 2013).

As diferentes fontes de radiação têm sido o centro de várias pesquisas ao longo dos anos em especial quanto aos efeitos de espectro de luz vermelho e vermelho distante sobre o desenvolvimento e a fisiologia das plantas (Britz e Sager, 1990; McMahon et al., 1991; Demotes-Mainard et al., 2016). A radiação no espectro de luz azul também é de grande importância para a fotomorfogênese, atuando no alongamento do caule e folhas (Hoenecke et al., 1992). Estudos têm centrado esforços nas respostas estimuladas *in vitro* com utilização de fontes artificiais de luz (Poudel et al., 2008; Heringer et al., 2017). O uso das lâmpadas artificiais, como as fluorescentes, tem sido comumente utilizados na cultura *in vitro*, pois emitem fótons em ampla faixa espectral, sendo essencial para a fotomorfogênese. No entanto, este tipo de lâmpada apresenta um maior consumo de energia elétrica, comparativamente à lâmpada de diodo emissor de luz de (LED), e produz calor que limita a quantidade de luz disponibilizada (Bula et al., 1991; Gupta e Jatothu, 2013).

Nos últimos anos tem sido proposto a utilização de lâmpadas de LED em cultura *in vitro*. Este sistema apresenta vantagens comparado aos sistemas convencionais de luz (lâmpada fluorescente), como possibilidade de selecionar e utilizar espectros de luz com comprimento de onda específico, durabilidade relativamente longa quando instalada corretamente, e alta eficiência, pois a maior parte da energia elétrica é convertida em radiação com a produção mínima de calor, o que favorece a instalação das lâmpadas com maior proximidade das culturas sem a indução de dano ou fotoestresse (Gupta e Jatothu, 2013). O tamanho de LED também é um fator positivo, pois pode facilitar a montagem de sistemas de culturas (Gupta e Jatothu, 2013).

Investigações sobre o efeito do espectro de luz em diversas espécies demonstraram que o vermelho, vermelho extremo e azul, isoladamente ou combinados, atuam significativamente em melhorias na morfogênese das plantas (Nhut, D. et al., 2001; Poudel et al., 2008; Li et al., 2010). Os efeitos influenciados pelo uso de lâmpadas de LED são positivos, incluindo alongamento do caule e entrenós em diferentes genótipos de *Vitis riparia* × *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (Poudel et al., 2008), aumento da matéria seca e fresca em bananeira (Nhut et al., 2001), morangueiro (Nhut et al., 2003) e algodoeiro (Li e Tang, 2010). Também foi promovido a organogênese de brotos em *Anthurium andreanum* L. pela exposição ao vermelho em conjunto com azul, porém com maior percentual de vermelho (Budiarto, 2010). Estas respostas observadas no desenvolvimento das plantas são controladas por programas genéticos complexos (Hochholdinger et al., 2006), por ações endógenas e interação com reguladores de crescimento (Kutschera e Wang, 2016) e em resposta a estímulos ambientais, como temperatura, umidade e luz (Deng et al., 2014).

O uso de lâmpadas de LED em culturas *in vitro* com os diferentes comprimentos de ondas tem demonstrado ser um método vantajoso para a regulação de processos fisiológicos de crescimento, como a fotomorfogênese (Gupta e Jatothu, 2013). Neste sentido, estudos para melhor compreensão dos fatores associados a respostas à organogênese de espécies arbóreas sob o efeito de luz são necessários, visto que a qualidade do espectro de luz tem sido considerada como um sinal importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas durante a morfogênese *in vitro* (Poudel et al., 2008; Deng et al., 2014).

2.6. Proteômica em plantas

A análise proteômica tem como objetivo estudar o padrão de proteínas diferencialmente expressas em uma amostra biológica de órgãos, tecidos, populações celulares, sob diversas condições de desenvolvimento (Baginsky, 2009; Deng et al., 2014; Takac et al., 2011). A abordagem proteômica tem sido utilizada em estudos relacionados com processos de crescimento e desenvolvimento, pois fornece informações sobre alterações em proteínas com diferenças na abundância e expressão durante as respostas na morfogênese, possibilitando a comparação fisiológica e análise de influência de sinais exógenos em um órgão ou em uma planta (Hochholdinger et al., 2006; Takac et al., 2011).

A proteômica vegetal possibilitou nos últimos anos muitos estudos comparativos relacionados ao crescimento e desenvolvimento de plantas, com abordagens em maturação de sementes, germinação e embriogênese somática (Jorrín-Novo et al., 2009; Yin et al., 2008). Estudos relacionando alterações no proteoma decorrentes da influência da qualidade da luz também têm sido realizados, possibilitando a identificação de proteínas associadas aos efeitos fisiológicos da luz na planta (Heringer et al., 2017). Todavia, são poucos os estudos relacionados ao efeito da luz sobre alterações na abundância de proteínas na organogênese em espécies arbóreas.

Estudos em *Pinus sylvestris* L. com o objetivo de elucidar os mecanismos de indução e liberação da dormência de brotações mostraram que 58% das proteínas identificadas estão envolvidas em processos metabólicos, e 27% em processos celulares (Bi et al., 2011). Dentre estas, proteínas heat shock estiveram presentes sugerindo uma relação com a indução das brotações e alterações no metabolismo de carboidratos (Bi et al., 2011). Em cana-de-açúcar cv. SP80-3280, comparando as proteínas diferencialmente expressas sob o efeito de diferentes espectros de luz de LED, foi possível identificar proteínas relacionadas a processos de diferenciação e desdiferenciação celular, como metiltransferases e cadeia pesada da clatrina 1 (Heringer et al., 2017) Desta forma, a espectrometria de massa (MS) surge como uma ferramenta para estudos de identificação de proteínas e suas interações em sistemas biológicos complexos e sob diversas condições de desenvolvimento vegetal (Baginsky, 2009; Takac et al., 2011; Deng et al., 2014; Petrovská et al., 2015).

Deste modo, visando entender o efeito dos espectros de luz sobre o desenvolvimento da organogênese *in vitro*, são fundamentais estudos que permitam relacionar alterações na abundância diferencial de proteínas em resposta a determinado tipo de luz. Estudos neste sentido ainda não foram realizados em *C. fissilis*, e serão importantes para obtenção de conhecimento básico sobre a sinalização envolvida na resposta morfogênética, assim como, conhecimento aplicado, identificando qual o melhor espectro de luz para a organogênese *in vitro*.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Estudar o efeito dos subcultivos sobre a regeneração e o desenvolvimento de brotações *in vitro* e enraizamento *ex vitro*, bem como avaliar o efeito da qualidade da luz sobre o desenvolvimento das brotações e sobre a abundância diferencial de proteínas na organogênese *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell

3.2. Objetivos específicos

- Analisar os efeitos do subcultivo sobre desenvolvimento de brotações *in vitro* e enraizamento *ex vitro* das brotações em *Cedrela fissilis*;
- Avaliar o efeito de diferentes espectros de luz no desenvolvimento da organogênese *in vitro* e alterações no perfil de proteínas diferencialmente abundante em brotações de *C. fissilis*.

4. CAPÍTULOS

4.1. INFLUÊNCIA DO SUBCULTIVO SOBRE A INDUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES *IN VITRO* E ENRAIZAMENTO *EX VITRO* DE *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)

RESUMO

A organogênese *in vitro* tem sido bastante utilizada para propagação clonal de espécies vegetais, permitindo a regeneração de uma planta por completo. Estudos visando o potencial de subcultivos podem ser uma alternativa para compreender os fatores associados à perda da capacidade de regeneração de uma planta ao longo de vários subcultivos. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do subcultivo sobre o desenvolvimento de brotações *in vitro* e enraizamento *ex vitro* de *Cedrela fissilis* Vell. Segmentos nodais cotiledonares e apicais foram excisados de plântulas germinadas *in vitro* e utilizados como explante, inoculados em meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L⁻¹), fitigel (2 g.L⁻¹) e 2,5 µM de benziladenina. Foram efetuados quatro subcultivos, com intervalos de 45 dias de cultura cada, e ao final de cada subcultivo, foi analisado taxa de multiplicação, indução, número e comprimento de brotações. Brotações em cada subcultivo foram utilizadas para o enraizamento *ex vitro* em substrato florestal e vermiculita (2:1; v/v) e após 45 dias

foi avaliado indução, número e comprimento de raízes. As mudas enraizadas foram transferidas para a casa de vegetação e avaliada a taxa de sobrevivência após 90 dias. A melhor taxa de multiplicação, indução, número e comprimento das brotações foi obtida no primeiro subcultivo para ambos os explantes, com redução constante a partir do segundo subcultivo, em ambos os segmentos. O enraizamento também foi afetado pelos subcultivos, sendo observado melhor indução, número e comprimento de raízes no primeiro subcultivo. Brotações com tamanho $\geq 0,5$ e $\leq 1,49$ cm apresentaram melhores resultados no enraizamento *ex vitro*. A sobrevivência das mudas também foi afetada pelos subcultivos, sendo maior no primeiro subcultivo, seguido de declínio constante nos demais subcultivos. Estes resultados indicam a influência do subcultivo sobre o potencial de regeneração de brotações para a propagação clonal de *C. fissilis* e são fundamentais para futuros estudos relacionados com a competência organogênica em espécies arbóreas nativas.

ABSTRACT

In vitro organogenesis has been widely used for the clonal propagation of plant species, allowing a completely plant regeneration. Studies targeting the potential of subcultures may be an alternative to understand the factors associated to loss of plant regeneration capacity over along several subcultures. The aim of this work was to study the effects of subculture on *in vitro* shoots development and *ex vitro* rooting in *Cedrela fissilis*. Cotyledonary and apical nodal segments were excised from plantlets germinated *in vitro* and used as explants. These explantes were inoculated in MS culture medium supplemented with sucrose (20 g L⁻¹), Phytigel (2 g.L⁻¹) and 2.5 μ M 6-benzyladenine. Four subcultures with intervals of 45 days each were performed, being analyzed at the end of each subculture the multiplication rate, induction, number and length of shoots. Shoots from each subculture were used for *ex vitro* rooting in substrate containing Basaplant and vermiculite (2:1; v/v) and after 45 days the induction (%), number and length of roots were analyzed. The rooted seedlings were transferred to greenhouse and evaluated the survival rate after 90 day. The best multiplication rate, induction, number and lengths of shoots

were obtained in the first subculture for both type of explants. Rooting was also affected by the subcultures, with better induction, number and roots length in the first subculture. Shoots with size ≥ 0.5 and ≤ 1.49 showed better results in *ex vitro* rooting. The survival of the seedlings was also affected by the subcultures, being higher in the first subculture, followed by constant decline in the other subcultures. These results indicate the influence of subculture on the shoot regeneration potential for clonal propagation of *C. fissilis*, being fundamental for future studies related to organogenic competence in native tree species.

1. INTRODUÇÃO

A capacidade de totipotência das células vegetais, que é propriedade inerente das células para desenvolver novos órgãos (brotos, raízes) permite a propagação *in vitro* de espécies vegetais, levando a regeneração de uma planta completa sob estímulos apropriados (Batygina, 1999). Neste processo, explantes obtidos da planta são utilizados para a multiplicação clonal em condições assépticas e em meio nutritivo adequado, com presença ou não de reguladores de crescimento (Soares et al., 2007; Silva et al., 2005). Estes fatores, interagem e regulam os eventos de sinalizações celulares que resultam na resposta morfogênética durante a organogênese vegetal (Moura et al., 2001; Silva et al., 2005; Nicioli et al., 2008; Carvalho et al., 2011).

A aquisição da competência morfogênica é um dos fatores cruciais para que ocorra o desenvolvimento da organogênese *in vitro* (Che et al., 2002). Este processo é complexo, e envolve a interação entre vários fatores relacionados com o tipo de explante, meio de cultura, os reguladores de crescimento vegetal adicionados ao meio de cultura e as condições de cultura *in vitro*, como luz e temperatura, os quais afetam significativamente a competência para a indução e regeneração de novas brotações (Skirvin et al., 1994; Duclercq et al., 2011; Shemer et al., 2015).

O uso de reguladores de crescimento vegetal é fundamental para a sinalização e obtenção de respostas morfogênicas *in vitro*. Entre os principais reguladores de crescimento envolvidos na sinalização durante o desenvolvimento

de brotações destacam-se as auxinas e citocininas, as quais interagem modulando e regulando diversos processos de crescimento tais como, divisão celular, formação de tecidos ou órgão, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento de processos organogênicos (Alves et al., 2004; Giri et al., 2004; Santos et al., 2004; Mohebalipour et al., 2012; El-showk et al., 2013).

Ademais, o tipo de explante é fundamental para a resposta morfogênética (Skirvin et al., 1994) sendo explantes oriundos de segmentos nodais uma alternativa viável para a propagação de espécies arbóreas (Moura et al., 2012; Pijut et al., 2012), incluindo a propagação *in vitro* em *Cedrela fissilis* Vell. (Aragão et al., 2016). Nesta espécie, o desenvolvimento de brotações é obtido via organogênese direta, utilizando como explantes segmentos nodais (Nunes et al. 2002; Aragão et al. 2016). Este tipo de explante apresenta meristemas axilares preexistentes que possibilitam a formação de novas brotações, permitindo melhor resposta morfogênética *in vitro* especialmente em arbóreas (Silva et al., 2005; Nicioli et al., 2008; Nunes et al., 2002; Carvalho et al., 2011a, Pijut et al., 2012).

Além do tipo de explante e reguladores de crescimento, estudos mostram que a competência para o desenvolvimento da organogênese pode ser influenciado pelo subcultivo, desencadeando alterações no crescimento e desenvolvimento de brotações (Tiwari et al., 2002). Isto tem sido verificado em espécies arbóreas, tais como *Tectona grandis* L., *Cabralea canjerana* (Vell.) em que o subcultivo afetou a competência para a regeneração de brotações e o enraizamento no processo de propagação *in vitro* (Tiwari et al., 2002; Rocha et al., 2007). Entretanto, estudos neste sentido ainda não foram descritos para a *C. fissilis* Vell., uma espécie arbórea da Mata Atlântica ameaçada de extinção (IUCN, 2017).

C. fissilis é uma espécie arbórea pertencente à família Meliaceae, popularmente conhecida como cedro ou cedro rosa (Carvalho, 2003). Esta espécie possui ampla distribuição no território brasileiro (Biernaski et al., 2012), e tem sido intensamente explorada devido ao valor econômico de sua madeira (Ruschel et al., 2005; Valério et al., 2009). Aliado aos fatores econômicos, a redução da viabilidade das sementes durante o armazenamento, são fatores que influenciam a propagação desta espécie por métodos convencionais, e demonstram a necessidade do uso de técnicas biotecnológicas como metodologia alternativa para propagação desta espécie nativa da Mata Atlântica. Desta forma, a utilização da técnica de micropropagação com ênfase na organogênese é promissora para a

utilização em espécies arbóreas (Giri et al., 2004; Mohebalipour et al., 2012), especialmente em *C. fissilis* (Nunes et al., 2002; Aragão et al., 2016).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do subcultivo sobre desenvolvimento de brotações *in vitro* e enraizamento *ex vitro* das brotações em *C. fissilis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram utilizados como fonte de explantes segmentos nodais cotiledonares a apicais obtidos de plântulas de *C. fissilis* germinadas *in vitro* de acordo com o item 2.3. As sementes utilizadas para a germinação *in vitro* foram obtidas do viveiro Sementes Caiçara, Brejo Alegre, Brasil (21° 10' S e 50° 10' W), coletadas em agosto de 2014.

2.2. Assepsia das sementes

Antes de inoculadas *in vitro*, as sementes foram submetidas a uma etapa de desinfestação de acordo com a metodologia descrita por Santa-Catarina et al. (2001) com algumas modificações. As sementes foram lavadas em água corrente utilizando-se detergente neutro (Limpol Bombril®, São Bernardo do Campo, Brasil). Em seguida, as sementes foram imersas em álcool 70 % por 1 min, e depois em solução de água sanitária comercial (Qboa®, Osasco, Brasil) contendo de 2 a 2,5 de cloreto ativo acrescida de fungicida (100 µL/500 mL⁻¹) (Derosal®, São Paulo, Brasil) por 2 h. Por fim, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas por cinco vezes com água destilada autoclavada e em seguida inoculadas *in vitro*.

2.3. Germinação *in vitro*

As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) (Phyto technology Laboratories®, Overland Park, USA) suplementado com sacarose (20 g L⁻¹) (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil) e Fitagel (2 g L⁻¹) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121° C, sob 1,5 atm, por 15 min. Após a inoculação, as

sementes foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, com intensidade luminosa de $55 \mu\text{mol. m}^2 \text{s}^{-1}$, a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 60 dias as plântulas foram utilizadas como fonte de explantes para os experimentos (Figura 1).

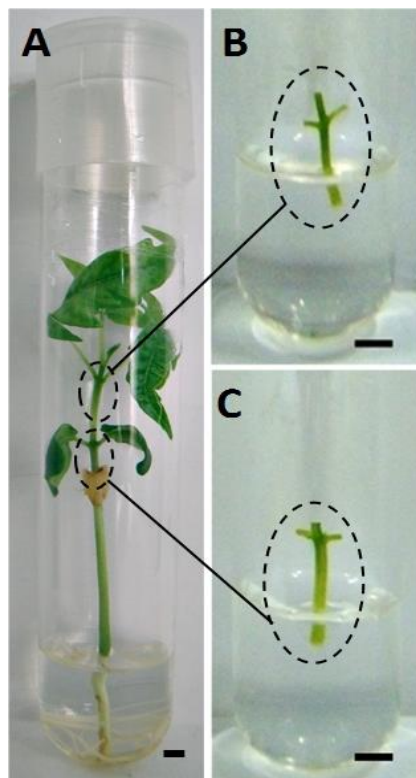


Figura 1: Aspectos morfológicos da plântula de *C. fissilis* após 60 dias de crescimento *in vitro* em meio de cultura MS (A), e dos explantes separados em segmentos nodal apical (B) e nodal cotiledonar (C) utilizados no primeiro subcultivo. Barras = 5 mm.

2.4. Efeito do número de subcultivos sobre a regeneração e crescimento de brotações

Os segmentos nodais apicais e cotiledonares (aproximadamente 1,5 cm) foram inoculados em meio de cultura MS, suplementado com sacarose (20 g L^{-1}), fitagel (2 g.L^{-1}) e benziladenina (BA; $2,5 \mu\text{M}$) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, sob $1,5 \text{ atm}$, por 15 min.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $55 \mu\text{mol.m}^2 \text{s}^{-1}$, a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Cada segmento nodal (cotiledonar e apical) passou por quatro ciclos de repicagens consecutivos (Figura 2). As brotações desenvolvidas em cada subcultivo após 45 dias foram avaliadas quanto aos parâmetros de indução (brotações acima de 0,3

cm com folhas), número e comprimento das brotações. Após foram repicadas e inoculadas nos cultivos subsequentes, observando-se os efeitos sobre a regeneração de brotações ao longo do crescimento dos subcultivos.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 4, sendo dois tipos de explantes (segmentos nodais cotiledonares e apicais) e quatro subcultivos. Cada tratamento foi constituído por oito repetições contendo cinco explantes cada.

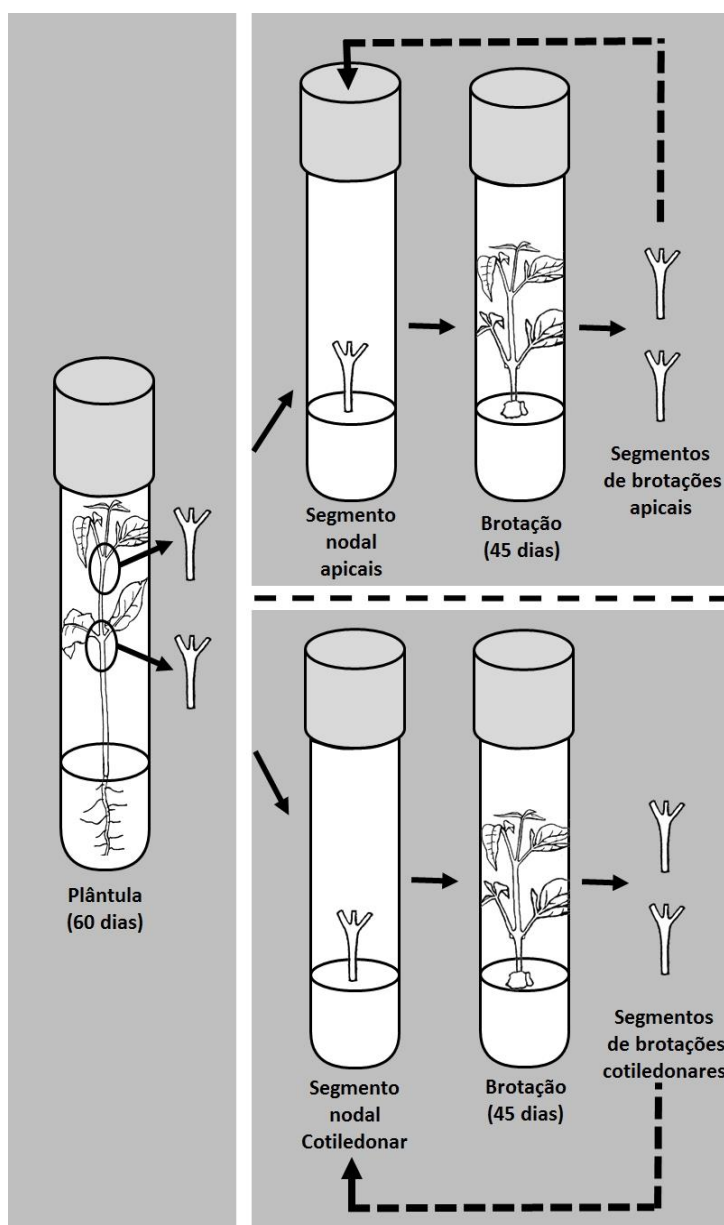


Figura 2: Esquema ilustrando a fonte de explantes de segmentos nodais cotiledonares e apicais de *C. fissilis* para os subcultivos. O primeiro subcultivo foi realizado com explantes obtidos das plântulas com 60 dias de crescimento *in vitro*. Os outros três subcultivos foram realizados utilizando-se brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares com 45 dias de incubação *in vitro* como fonte de explante.

2.5. Efeito do número de subcultivo sobre o enraizamento *ex vitro* das brotações e aclimatização das mudas

Para estudo do efeito do número de subcultivos sobre o enraizamento *ex vitro*, utilizou-se as brotações oriundas dos quatro subcultivos a partir de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis*.

Para tanto, as brotações desenvolvidas a partir de cada subcultivo, com 45 dias de incubação, foram retiradas do meio de cultura e colocadas para enraizar *ex vitro* em potes plásticos (50 mL) contendo substrato florestal (Basaplant®, Artur Nogueira, Brasil) e vermiculita na proporção de 2:1 (v/v). Estes potes contendo as microestacas foram mantidos em bandejas plásticas (50 x 60 x 10 cm) cobertas com filme plástico, mantendo-se em alta umidade por quinze dias, e reduzindo gradativamente a umidade através de perfurações do filme plástico até a sua retirada total aos 25 dias. Estas bandejas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de $55 \mu\text{mol. m}^2 \text{s}^{-1}$, a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Após trinta dias foram avaliados parâmetros de indução (raízes acima de 0,3 cm), número e comprimento das raízes. Em seguida, as mudas foram transferidas para potes plásticos (250 mL) contendo substrato florestal, permanecendo por 15 dias nas condições de 16 h de luz, a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, as mudas foram transferidas para casa de vegetação com umidade relativa do ar superior a 85% e temperatura entre 20 e 30°C, sendo avaliado o percentual de sobrevivência após 90 dias.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 4, sendo brotações oriundas de tipos de explantes (segmentos nodais cotiledonares e apicais) e quatro subcultivos. Cada tratamento foi constituído por oito repetições com cinco explantes cada.

Todas as imagens foram editadas em software Adobe Photoshop versão CS2 9.0.2 para melhor corte e montagem das imagens (<https://www.adobe.com/br>).

2.6. Análise estatística dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (Sokal e Holhf, 1995) em 5% de probabilidade, com o auxílio do software R® versão 3.3.1 (R Development Core Team, 2016).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do número de subcultivos sobre a regeneração e crescimento de brotações *in vitro*

Observou-se diferenças significativas na indução de brotações ao longo das repicagens, sendo o maior percentual observado no primeiro subcultivo em ambos os segmentos nodais (cotiledonar e apical), sem diferenças significativas entre eles (Figura 3 A). Verificou-se um decréscimo na indução de brotações, tanto nos segmentos nodais cotiledonares quanto em apicais, a partir do segundo subcultivo, prosseguindo até o quarto subcultivo. Em adição, segmentos nodais cotiledonares apresentam menores valores de indução de brotações comparativamente com os apicais no quarto subcultivo (Figura 3 A).

Adicionalmente, foi observada uma redução significativa no número de brotações com o aumento do número de subcultivos nos segmentos nodais cotiledonares a partir do segundo subcultivo. Por outro lado, em segmentos nodais apicais este efeito foi observado a partir do terceiro subcultivo. Contudo, os melhores resultados para número de brotações foram obtidos no primeiro e segundo subcultivo para segmentos nodais apicais e no primeiro subcultivo para segmentos nodais cotiledonares (Figura 3 B).

Quanto ao comprimento de brotações, pode-se observar que houve uma diminuição significativa no tamanho das brotações com o decorrer do número de subcultivos em ambos os tipos de explantes (segmentos nodais cotiledonar e apical) (Figuras 3C e 5). O maior comprimento de brotações foi obtido em segmentos nodais cotiledonares no primeiro subcultivo, seguido de diminuição ao longo dos demais subcultivos. Por outro lado, em segmentos nodais apicais não houve diferenças significativas entre o primeiro e segundo subcultivos, no entanto, no terceiro e quarto subcultivos seguintes houve um declínio significativo no tamanho das brotações (Figura 3C).

De modo geral, os segmentos nodais cotiledonares obtiveram melhores resultados quanto ao número e comprimento de brotações em comparação com os segmentos nodais apicais no primeiro subcultivo. Nos demais subcultivos houve um declínio significativo em ambos os tipos de explantes para os respectivos parâmetros (Figura 3).

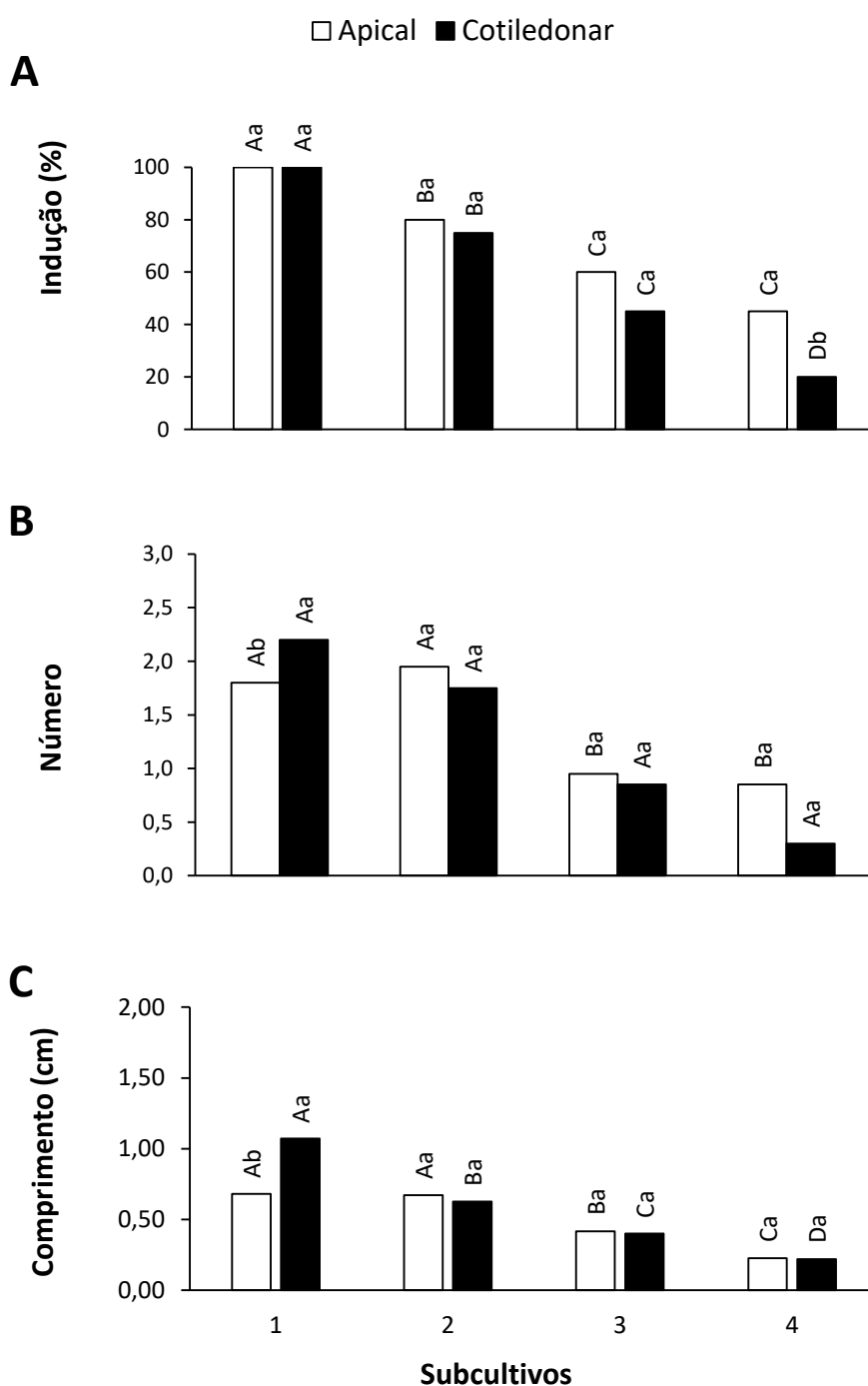


Figura 3: Percentagem de indução **(A)**, número **(B)** e comprimento **(C)** de brotações obtidas de segmentos nodais cotiledonares e apicais de *C. fissilis* em quatro subcultivos, com intervalos de 45 dias de incubação em meio de cultura MS suplementado com 2,5 μ M de benziladenina. Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os subcultivos. Letras minúsculas representam diferença estatística entre os segmentos nodais cotiledonares e apicais no mesmo subcultivo. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n = 5$, CV Indução = 23,31%, CV número = 22,12%, CV comprimento = 30,68%).

Morfologicamente, verificou-se a diminuição de tamanho e número das brotações no decorrer dos subcultivos (Figura 4). Verificou-se diferença no crescimento e desenvolvimento das brotações de acordo com o tipo de explante, sendo verificadas as melhores respostas para segmentos nodais cotiledonares comparativamente aos apicais.

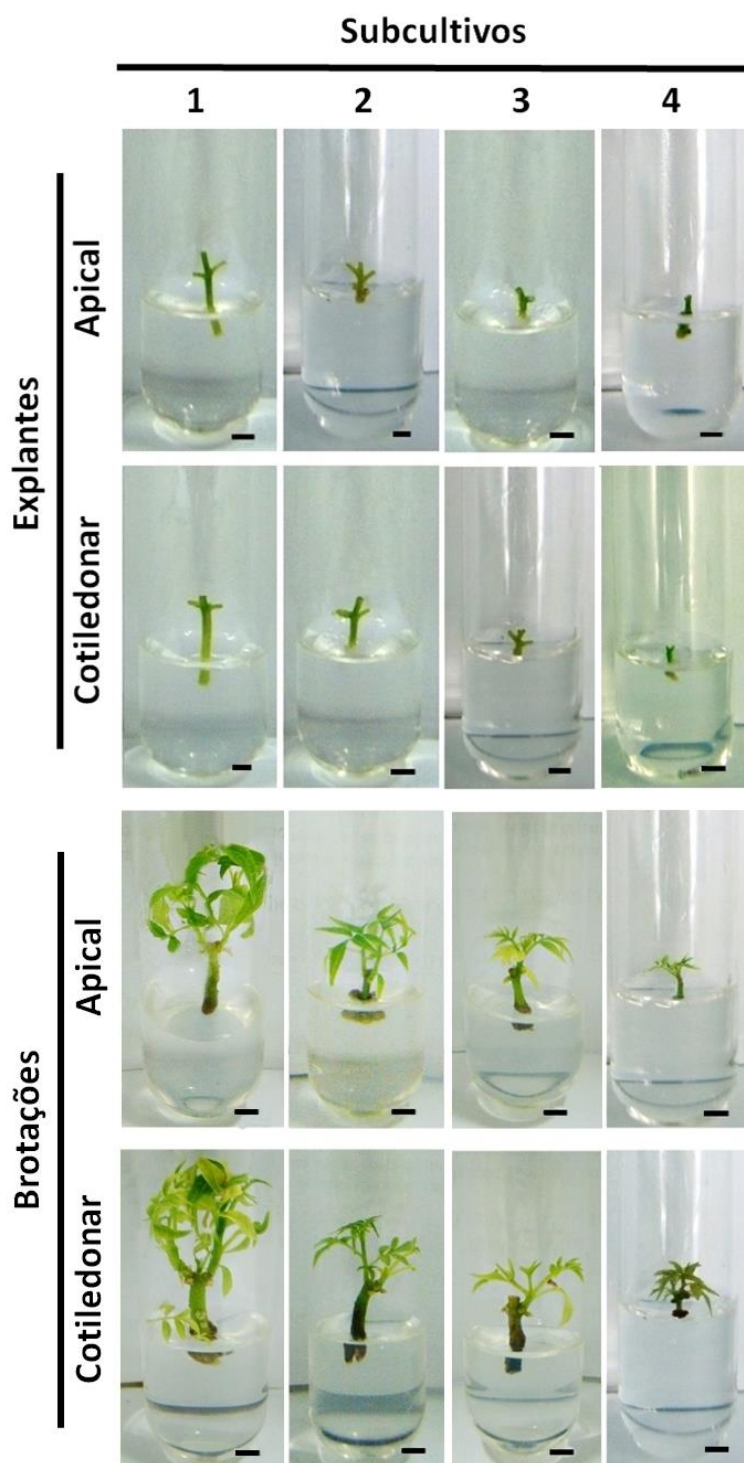


Figura 4: Aspectos morfológicos do tamanho dos explantes (segmentos nodais cotiledonares e apicais) e das brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares e apicais de *C. fissilis* em quatro subcultivos com intervalos de 45 dias de cultura entre cada subcultivo em meio de cultura MS suplementado com 2,5 μM de benziladenina. Barras = 5 mm.

3.2. Influência do número de subcultivos sobre a taxa de multiplicação de brotações de *C. fissilis*

Os dados referentes à taxa de multiplicação mostraram que o melhor resultado foi obtido no primeiro subcultivo (45 dias), sendo significativamente superior aos demais (Figura 6). A partir do segundo subcultivo pode-se visualizar um declínio significativo, de aproximadamente 50%, na taxa de multiplicação nos dois tipos de explantes, segmentos nodais cotiledonar e apical, comparativamente ao primeiro subcultivo. Este declínio foi mantido nos demais subcultivos (Figura 5).

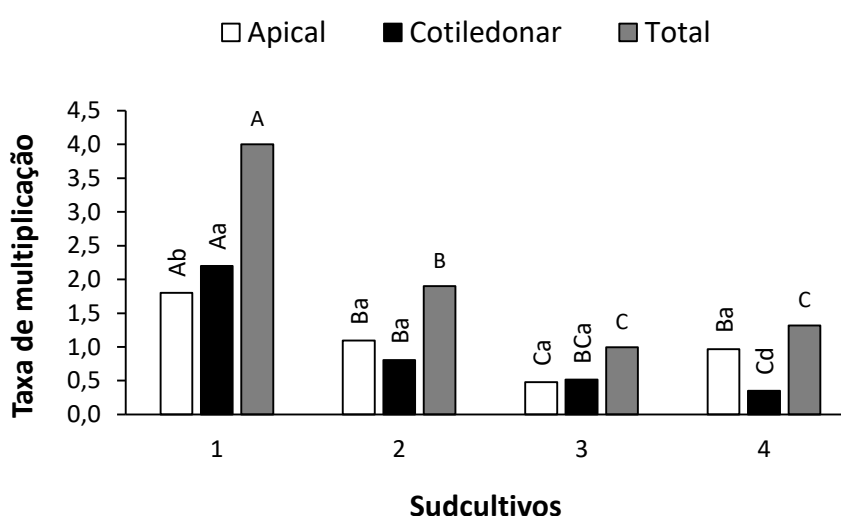


Figura 5: Taxa de multiplicação de brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares e apicais em *C. fissilis* nos quatro subcultivos com intervalos de 45 dias de cultivo em meio de cultura MS suplementado com 2,5 μ M de benziladenina. Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os subcultivos. Letras minúsculas representam diferença estatística entre os segmentos nodais cotiledonares e apicais no mesmo subcultivo. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$) ($n = 5$, $CV = 24,03\%$ para comparação entre os segmentos e $CV = 19,56\%$ - para total).

3.3. Efeito dos subcultivos no alongamento das brotações

Foi analisado o número de brotações obtidas em três classes de tamanho: $\leq 0,49$ cm; entre 0,5 e 1,49 cm; e $\geq 1,5$ cm, para os dois tipos de explantes, segmentos nodais cotiledonar e apical. Verificou-se uma variação no tamanho das brotações nos quatro subcultivos realizados (Figura 6).

Observou-se um declínio no tamanho das brotações obtidas a partir de segmentos nodais cotiledonar e apical no decorrer dos subcultivos (Figura 6). Brotações maiores a 1,5 cm foram obtidas no primeiro subcultivo, sendo

significativamente maiores brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares (Figura 6). Entretanto, houve uma redução significativa do número de brotações maiores que 1,5 cm ao longo dos subcultivos, não sendo verificado este tamanho de brotações em ambos os segmentos no último subcultivo (Figura 6 A). Brotações com tamanhos entre 0,5 e 1,49 cm (Figura 6 B) foram observadas em maior quantidade comparativamente aos demais tamanhos, com valor maior no primeiro e segundo subcultivo. No terceiro e quarto subcultivo houve uma redução significativa do número de brotações formadas com tamanhos entre 0,5 e 1,45 cm (Figura 6 B), sendo observado no quarto subcultivo o desenvolvimento de brotações somente em explantes oriundos de segmentos nodais cotiledonares comparativamente aos apicais (Figura 6 B).

No entanto, as brotações com menor tamanho ($\leq 0,49$ cm), apresentaram valores similares nos vários subcultivos, sem apresentar redução significativa ao longo das repicagens (Figura 6 C).

Considerando a soma do número de brotos oriundos dos segmentos nodais cotiledonar e apical por classes de tamanho pode-se visualizar que as maiores médias foram observadas no tamanho maior ou igual a 0,5 e menor ou igual a 1,49 cm, em que apresentam maiores números de brotos no primeiro e segundo subcultivos, porém no terceiro e quarto, pode-se visualizar um declínio acentuado nos resultados (Figura 6 D).

Por outro lado, verificou-se um aumento significativo do número de brotações com tamanho menor a 0,49 cm a partir do terceiro subcultivo, obtendo-se os maiores valores no último subcultivo. Contrariamente, verificou-se uma redução significativa do número de brotos na classe de maior tamanho (maior ou igual a 1,5 cm), durante os subcultivos, verificando-se a menor média no quarto subcultivo.

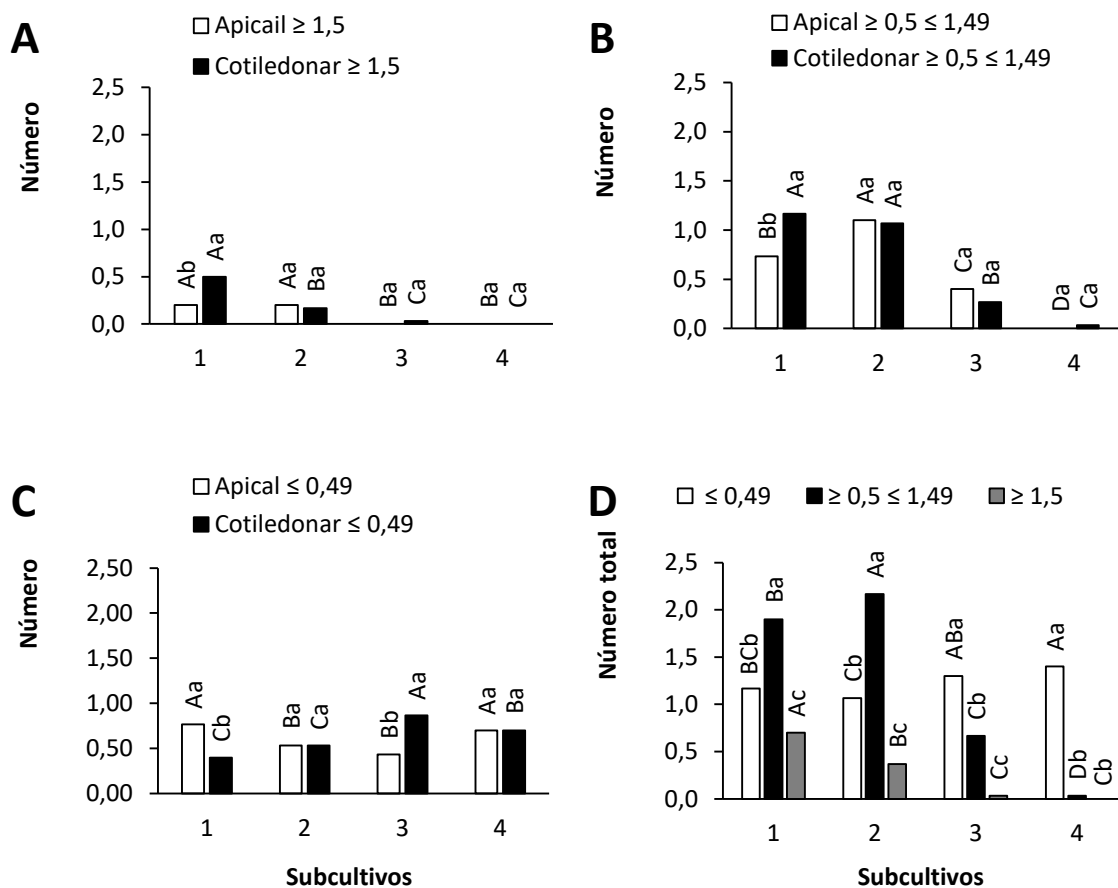


Figura 6: Número de brotos oriundos de segmentos nodais apicais e cotiledonares nas classes de tamanho $\geq 1,5$ (A), entre 0,5 e 1,49 cm (B), e $\leq 0,49$ cm (C), bem como o número total de brotos cotiledonares e apicais nas três classes (D) em *C. fissilis* durante os quatro subcultivos, com intervalos de 45 dias de cultura, em meio de cultura MS suplementado com 2,5 μM de benziladenina. Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os subcultivos. Letras minúsculas representam diferença estatística nas classes de tamanho no mesmo subcultivo. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n = 5$, CV A = 61,6 %, CV B = 24,4 %, CV C = 22,2 %, CV D = 18,4).

3.4. Efeito do número de subcultivos sobre o enraizamento *ex vitro* das brotações e aclimatização das mudas

Os subcultivos afetaram significativamente o enraizamento das brotações obtidas, observando-se redução significativa no desenvolvimento de raízes em brotações de segmentos nodais cotiledonar e apical (Figura 7).

Brotações obtidas de segmentos nodais cotiledonares apresentaram uma redução significativa na indução de enraizamento (Figura 7 A) e no número de raízes formadas (Figura 7 B) no terceiro e quarto subcultivo, enquanto àquelas obtidas de segmentos nodais apicais, a redução significativa foi observada a partir do segundo subcultivo para ambos os parâmetros. Comparando os tipos de

explantes, observou-se que brotações oriundas dos dois tipos de explantes (segmentos nodais apicais e cotiledonares) não apresentaram diferença significativa no potencial de enraizamento (Figura 7 A) e no número de raízes formadas (Figura 7 B) no primeiro subcultivo. Porém, a partir do segundo subcultivo, brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares apresentam indução de enraizamento e número de raízes significativamente superiores àquelas oriundas de segmentos nodais apicais (Figura 7 A).

Observou-se uma diminuição significativa no comprimento das raízes com o aumento no número de subcultivos realizados em brotações oriundas dos dois tipos de explantes (Figura 7 C). Comparando-se os dois tipos de explante, verificou-se que brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares apresentaram maior comprimento das raízes comparativamente aos nodais apicais, com maiores valores até o terceiro subcultivo (Figura 7 C).

As maiores taxas de sobrevivência das mudas foram obtidas a partir de brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares e apicais no primeiro subcultivo, não havendo diferenças significativas entre dois tipos de explantes. No segundo subcultivo, a taxa de sobrevivência foi significativamente maior em brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares comparativamente ao apical. Nos demais subcultivos (terceiro e quarto), um declínio significativo na sobrevivência de mudas ocorreu em brotações oriundas de ambos os tipos de explante (segmentos nodais cotiledonares e apicais) (Figura 7 D).

Comparando-se os parâmetros referentes ao comprimento de brotações em três classes de tamanho (Figura 6), e o enraizamento (Figura 7), pode-se verificar a influência do tamanho das brotações adquiridas *in vitro* sobre o processo de enraizamento *ex vitro*. Neste sentido, no primeiro e segundo subcultivos foram obtidos melhores resultados para o enraizamento em decorrência de maior número de brotações com comprimento entre 0,5 e 1,49 cm. (Figura 6 D). No quarto subcultivo ocorre uma redução de brotações neste intervalo de tamanho, restando assim maior número de brotações com tamanho menor a 0,5 cm, as quais apresentam menor potencial de enraizamento. Deste modo, as brotações desenvolvidas com tamanho entre igual ou superior a 0,5 cm apresentam melhor potencial para o enraizamento *ex vitro* em *C. fissilis*.

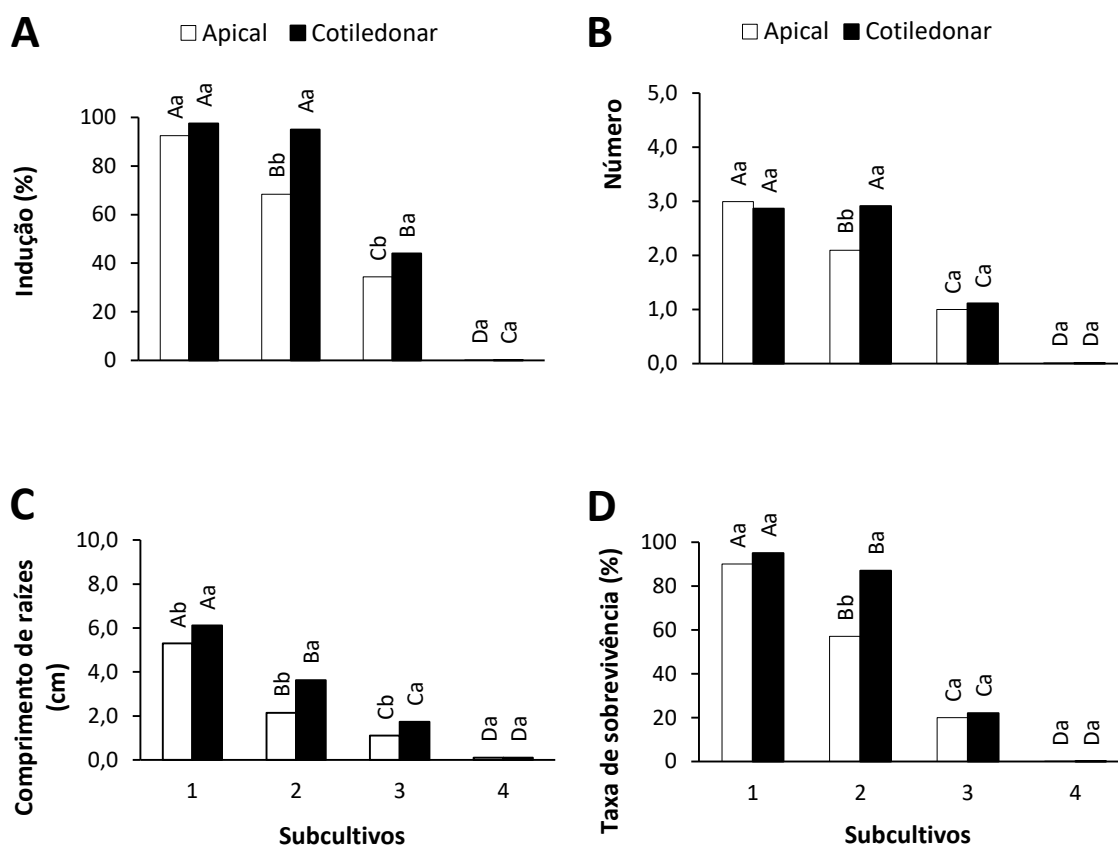


Figura 7: Percentagem de indução (A), número (B) e comprimento (C) de raízes em brotações e percentagem de sobrevivência das mudas (D) obtidas a partir de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* em quatro subcultivos. Letras maiúsculas representam a diferença estatística comparando-se os diferentes subcultivos no mesmo tipo de explante. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas comparando-se os diferentes explantes no mesmo subcultivo. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$) ($n = 8$, CV indução de raiz = 10,4%, CV número de raiz = 16,3%, CV comprimento de raiz = 14,47%, CV sobrevivência = 14,3%).

Na figura 8 pode-se observar os aspectos morfológicos das mudas obtidas após 30 dias de enraizamento em cada subcultivo. Verificou-se redução significativa no tamanho das mudas obtidas ao longo dos subcultivos, com redução significativa da capacidade de desenvolvimento da parte aérea assim como, da regeneração das raízes nos diferentes subcultivos.

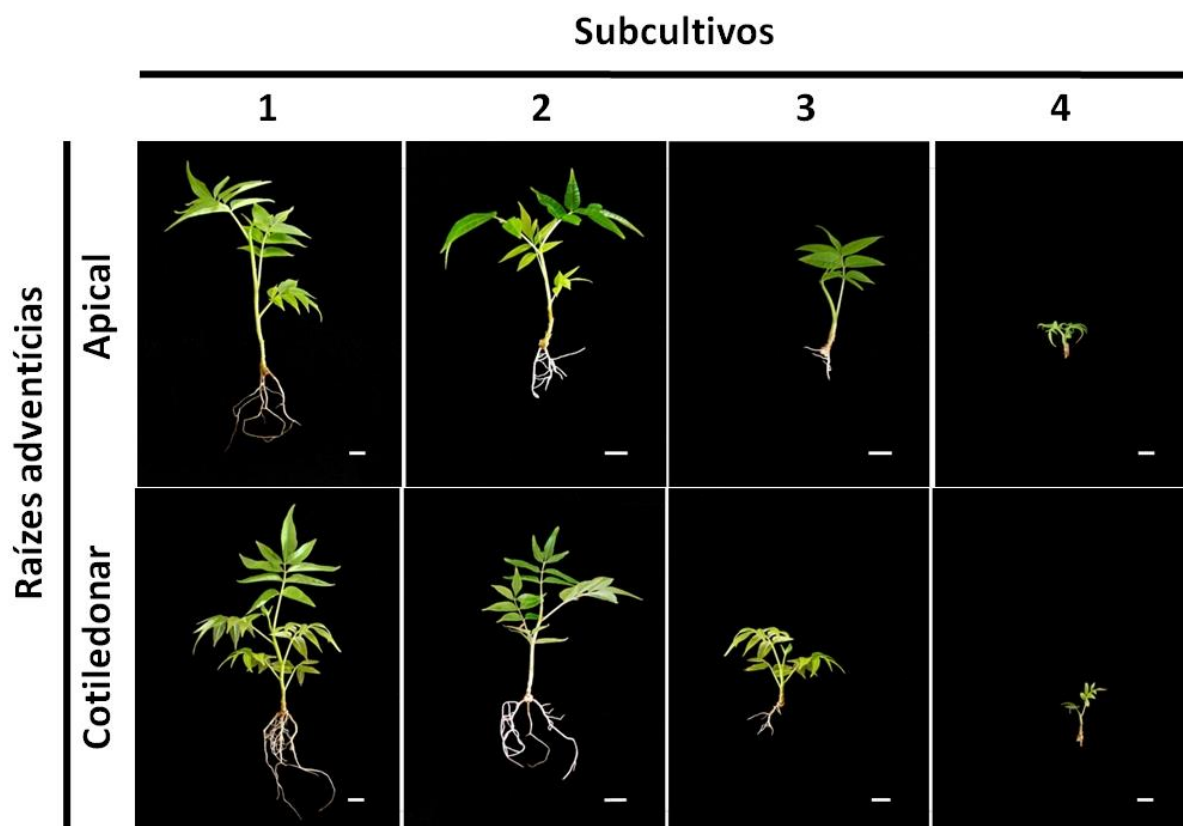


Figura 8: Aspectos morfológicos do desenvolvimento de raízes *ex vitro* em brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares e apical de *C. fissilis* ao longo de subcultivos, avaliado após 30 dias de enraizamento. Barras = 1cm.

Todas as mudas oriundas dos experimentos realizados para avaliar a influência do subcultivo sobre a indução e o desenvolvimento de brotações *in vitro* e enraizamento *ex vitro* de *C. fissilis* foram encaminhadas para a Reserva Biológica União (Rebio União), localizada nos municípios de Casimiro de Abreu, Macaé e Rio das Ostras - RJ, em que foram utilizadas para a construção de corredores ecológicos entre os fragmentos de Mata Atlântica existentes. Nesta fase do trabalho em campo, o Prof. Dr. Marcelo Trindade Nascimento e sua equipe também utilizaram as mudas propagadas *in vitro* para estudos futuros comparativamente com mudas obtidas via seminífera.

4. DISCUSSÃO

Estudos visando estabelecer as melhores condições para a micropropagação *in vitro* (Nunes et al., 2002) e a relação do metabolismo endógeno de poliaminas e carboidratos no desenvolvimento da organogênese (Aragão et al., 2016) foram realizados para *C. fissilis*. Entretanto, estudos visando entender o efeito dos subcultivos no potencial de desenvolvimento da organogênese *in vitro* nesta espécie ainda não foram realizados. Os resultados obtidos neste estudo mostram que o desenvolvimento de brotações em *C. fissilis* é afetado pelos subcultivos (Figuras 3 a 5). Estudos similares foram realizados em *Cabralea canjerana* (Vell.) utilizando-se segmentos nodais submetidos a três subcultivos (Rocha et al., 2007). Os autores mostraram que a taxa de multiplicação foi maior no segundo subcultivo, sendo esta inferior a dois, seguido por declínio no terceiro subcultivo (Rocha et al., 2007). Diferentemente do observado em *C. canjerana*, em *C. fissilis* verificou-se uma taxa de multiplicação superior a dois no primeiro subcultivo utilizando segmentos nodais cotiledonares, com declínio a partir do segundo subcultivo. Resultados similares para a taxa de multiplicação de *C. fissilis* também foram observados no primeiro subcultivo em *Tectona grandis* L. (Fermino Júnior et al., 2011), mostrando uma taxa de multiplicação similar à de *C. fissilis* no primeiro subcultivo com utilização da secção das porções cotiledonares e apical. No entanto, os autores não realizaram esta análise em comparando-se subcultivos posteriores (Fermino Júnior et al., 2011). Em *T. grandis*, mesmo com a adição de elevada concentração de citocinina (6-benzilaminopurina), explantes obtidos de segmentos nodais não mostraram uma boa resposta quanto aos subcultivos (Tiwari et al., 2002). Por outro lado, em *A. comosus* é observado elevado número de brotos em subcultivo sucessivo (Hamad e Taha 2008). Neste sentido, estudos mostram que em espécies arbóreas, como *T. grandis* e *C. canjerana* o número de brotos obtidos em subcultivos é menor (Tiwari et al., 2002), comparativamente com outras espécies, como *Ananas comosus* L. Merr (Hamad e Taha 2008).

A indução de brotações *in vitro* é influenciada por vários fatores, como reguladores de crescimento vegetal, tipo de explante (Moura et al., 2001; Prakash et al., 2006), bem como genótipo da planta (Shekhawat et al., 1993). Possivelmente esta variação na competência para regeneração de determinadas espécies ou

tecidos da mesma planta estejam associados a resposta aos estímulos de reguladores de crescimento exógenos, bem como decorrente das variações dos níveis endógenos de reguladores de crescimento das brotações desenvolvidas (Skirvin et al., 1994). Assim, sugere-se que variações no conteúdo endógeno de hormônios de crescimento vegetal possam estar associadas com a redução da capacidade de regeneração das brotações na morfogênese *in vitro* de *C. fissilis* com o decorrer dos subcultivos (Figuras 3 e 4) influenciando no declínio na taxa de multiplicação (Figura 5). Um balanço adequado entre os níveis de auxina e citocinina é necessário para o desenvolvimento das brotações. A auxina é sintetizada nos tecidos jovens, especialmente meristema apical, sendo, transportada de forma polar, ao longo do caule (Mattsson et al., 1999; Teale et al., 2006), resultando em um diferente gradiente de concentrações ao longo do tecido caulinar (Ljung et al., 2001). A suplementação do meio de cultura com BA é fundamental para o sucesso da proliferação clonal utilizando segmentos nodais como fonte de explantes, pois esta citocinina atua na promoção da morfogênese a partir de tecidos da parte aérea vegetal modulando sinais para reprogramação e proliferação de células de gemas laterais, e também atua na superação da dominância apical exercida por auxinas (Uzelac et al., 2012; Shimizu-Sato et al., 2001). Possivelmente, pode haver um maior conteúdo de auxinas em explantes utilizados no primeiro subcultivo, oriundos das plântulas germinadas, e o mesmo pode ter favorecido o balanço auxina/citocinina, pela adição exógena de BA ao meio de cultura, favorecendo significativamente a taxa de multiplicação obtida no primeiro subcultivo comparativamente aos demais (Figura 5). Adicionalmente, a suplementação de BA ao meio de cultura durante os subcultivos pode ter favorecido um balanço entre auxina/citocinina que permitiu um maior número e comprimento de brotações em segmentos nodais cotiledonares, comparativamente aos apicais, nos demais subcultivos (Figura 3B e C). Outro fator que possivelmente tenha influenciado nesta diferença, é a biossíntese de citocinina nos explantes após a decapitação, retirada do meristema apical. As citocininas podem também ser sintetizadas nos segmentos nodais (Tanaka et al., 2006). Assim, pode inferir que há uma concentração diferenciada nos dois tipos de explantes (cotiledonar e apical) tanto de auxinas quanto de citocininas, influenciando o crescimento das brotações. Este fato é de grande importância, pois o balanço endógeno destes hormônios pode estar associado à melhoria de desenvolvimento dos brotos. Estudos futuros

analisando o conteúdo endógeno de auxinas e citocininas são fundamentais para conhecer o conteúdo destes compostos em cada tipo de explante e entender como um balanço endógeno atua na morfogênese *in vitro* desta espécie.

O tamanho e a quantidade de gemas axilares dos explantes utilizados para a morfogênese *in vitro* podem influenciar a resposta no desenvolvimento de brotações *in vitro*, como descrito por Pereira et al., (2005) ao avaliar o desenvolvimento de brotações em segmentos nodais cotiledonares e apicais de *Solanum tuberosum* L. Estes autores observaram que o menor tamanho de explantes apresentou crescimento mais lento quando comparado aos explantes maiores, assim como explantes contendo mais de uma gema axilar foi melhor para a organogênese *in vitro*. Em *C. fissilis* a variação no tamanho das brotações desenvolvidas influenciou o desenvolvimento das brotações nos subcultivos sucessivos (Figuras 6 e 7). Os dois primeiros subcultivos desenvolveram maior número de brotações com tamanho igual ou maior a 0,5 e menor ou igual a 1,49 cm (Figura 6 D). Este tamanho de brotação possibilita um melhor desenvolvimento de novas brotações nos subcultivos sucessivos quando utilizadas como explantes em *C. fissilis*. Por outro lado, as brotações desenvolvidas com intervalo menor ou igual a 0,49 cm não são indicadas para a produção de mudas nesta espécie, pois não possibilitam o desenvolvimento adequado de novas brotações assim como o enraizamento *ex vitro* (Figuras 6 C e 7 C). Desta forma, para esta espécie os dados sugerem o uso de explantes com tamanho igual ou superior a 0,5 cm para melhor produção de brotos assim como, para o melhor enraizamento das brotações, possibilitando maior sobrevivência das mudas.

Adicionalmente, o maior comprimento das brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares comparativamente aos apicais no primeiro subcultivo de *C. fissilis* (Figura 3 C) pode estar associado a diferenças no conteúdo endógeno de carboidratos. Estudos realizados em explantes de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* oriundos de plântulas germinadas *in vitro* (utilizados para o primeiro subcultivo) mostram um maior conteúdo endógeno de glicose em segmentos nodais cotiledonares comparativamente aos apicais, em que foi potencialmente influenciada pela suplementação de BA ao meio (Aragão et al., 2016). Este resultado sugere que a interação entre o metabolismo bioquímico de carboidratos e hormônios é importante para a resposta morfogenética em *C. fissilis*. Futuras análises bioquímicas do conteúdo endógeno de poliaminas, carboidratos,

e de auxina nos dois tipos de explantes e ao longo dos quatro subcultivos são fundamentais para entender a influência do metabolismo destes compostos nos subcultivos com o potencial organogênético *in vitro* nesta espécie.

Além do efeito no desenvolvimento da organogênese, verificou-se que os subcultivos das brotações afetaram também os parâmetros de indução, número e comprimento de raízes (Figuras 7 e 8). Dentre os fatores que afetam a competência para o enraizamento, destaca-se a excisão adequada da base da brotação, visando manter a integridade dos tecidos no local de indução de raízes, sendo importante para as respostas a estímulos externos e internos durante o enraizamento (Noiton et al., 1992; Fleck et al., 2009; Costa et al., 2013). Adicionalmente, a perda da competência de regeneração de raízes pode estar relacionada ao balanço inadequado de auxina e citocinina endógenas nas brotações (Noiton et al., 1992; Moubayidin et al., 2009). Neste sentido, a redução no enraizamento das brotações ao longo dos subcultivos em *C. fissilis* (Figura 8) pode estar ligada a uma alteração hormonal endógena de auxina e citocinina nas brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares. Entretanto, não é bem compreendido alterações endógenas no conteúdo de auxina ao longo de vários subcultivos, sendo necessárias análises futuras do conteúdo endógeno destes reguladores de crescimento, assim como de poliaminas, aminoácidos e perfil de proteínas diferencialmente abundantes, visando elucidar o envolvimento destes compostos com a redução do enraizamento das brotações em *C. fissilis*.

O uso de auxina exógena é importante para o desenvolvimento de raízes, especialmente em arbóreas (Fett-Neto et al., 2001). A aplicação de auxina é fundamental para melhor indução e desenvolvimento do enraizamento *ex vitro* em *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. (Perveen et al., 2013). Estudos realizados em *C. fissilis* mostraram que a indução de raízes não foi afetada significativamente pela presença de auxina no enraizamento *in vitro* em brotações oriundas de segmentos nodais com um subcultivo (Nunes et al., 2002). Adicionalmente, para esta espécie também foi obtida alta taxa de enraizamento *ex vitro* em substrato florestal e vermiculita (1:1; v/v) sem o uso do regulador de crescimento, em brotações obtidas no primeiro subcultivo (Ribeiro, 2015). Neste sentido, no presente estudo realizou-se o enraizamento *ex vitro* sem a utilização de auxina (Figuras 7 e 8). Entretanto, estudos visando à utilização de auxinas no segundo e terceiro subcultivos podem

ser utilizados para verificar a necessidade deste regulador de crescimento no enraizamento *ex vitro* de brotações de *C. fissilis* oriundas de vários subcultivos.

Além da concentração exógenas e endógena de auxina nos tecidos vegetais, a competência para o enraizamento depende também do tipo de explante (Carvalho et al., 2015). Em *C. fissilis*, brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares apresentam enraizamento significativamente superior nos parâmetros avaliados, especialmente no segundo subcultivo em comparação com os segmentos nodais apicais (Figura 7). Este resultado pode estar associado com uma diferença no conteúdo endógeno de auxina nestes tipos de brotações. Esta hipótese está baseada nos estudos mostrados por Pereira e Fortes (2001), os quais mostraram que o declínio mais acentuado dos parâmetros na indução de raízes oriundas de segmentos apicais pode ter ocorrido por um elevado nível endógeno de auxina presente em explantes apicais devido à proximidade da região meristemática apical deste explante. Adicionalmente, estudos mostram que não é somente a concentração de auxina endógena alterada no decorrer do subcultivo, mas também o envolvimento de outros hormônios, como ácido abscísico (ABA), com redução de seu teor endógeno, pode estar associado à melhoria do enraizamento *in vitro*, como observado em brotações oriundas de segmentos de macieira (Noiton et al., 1992).

Além de auxinas e citocininas, os melhores resultados na formação de raízes em segmentos nodais cotiledonares podem ser decorrentes de um conteúdo de carboidratos endógeno diferenciados presentes nas brotações oriundas deste tipo de explante em *C. fissilis*. Fontes de carboidratos são importantes para a formação de novas raízes (Romano et al., 1995). Estudos realizados por Aragão et al., (2016) mostram que maiores concentrações de sacarose endógena foram observadas em brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares no decorrer de 30 dias de cultura comparativamente aos nodais apicais em *C. fissilis*. Estes resultados sugerem que esta diferença no conteúdo deste carboidrato em brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares pode ser um fator chave para a promoção do enraizamento neste tipo de explante, conforme observado em *C. fissilis* (Figura 8). Esta associação de maior teor de açúcares e melhor resposta ao enraizamento também foi observada em microestacas de *Eucalyptus globulus* Labill., em que teor de açúcares endógenos favoreceu a maior resposta ao enraizamento (Ruedell et al., 2013). De acordo com Sairanen et al., (2012), os açúcares atuam tanto como

fonte de energia e também como moléculas de sinalização. Em *Arabidopsis* a disponibilidade de açúcares livres demonstra uma associação na regulação da biossíntese e degradação de auxina, sendo um dos fatores para a regulação de crescimento (Sairanen et al., 2012). Em *Petunia hybrida* cv. Mitchell, os açúcares estão diretamente ligados ao metabolismo do carbono que fornece fonte de energia essencial para as etapas de proliferação, diferenciação e crescimento das células da raiz (Ahkami et al., 2013). Futuros estudos com análises do conteúdo de carboidratos, durante os sucessivos subcultivos são fundamentais para entender o envolvimento destes compostos com o potencial de enraizamento das brotações de *C. fissilis*.

Adicionalmente, é importante ressaltar que o enraizamento *ex vitro* apresenta vantagens em comparação ao *in vitro*, como menor custo laboratorial e maior eficiência na produção de raízes, as quais são morfologicamente semelhantes às aquelas de origem seminífera (Borkowska, 2001; Yan et al., 2010) possibilitando a melhoria da taxa de sobrevivência das plantas (Augusto et al., 2006). O enraizamento *ex vitro* das brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares e apicais foi estabelecido para *C. fissilis* (Ribeiro, 2015), e apresentou bons resultados no presente estudo (Figuras 7 e 8). Resultados similares também foram demonstrados para outras espécies com a utilização desta metodologia (Pruski et al., 2000; Bhatia et al., 2002), especialmente em arbórea com utilização de segmentos nodais juvenis, como em *Tectona grandis* L. (Fermino Júnior et al., 2011), *Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith (Junior e Scherwinski-Pereira, 2012), *Alnus glutinosa* [L.] Gaertn (Bajji et al., 2013), *Handroanthus chrysotrichus* Mart. (ex A. DC.) Mattos (Pereira et al., (2015).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram o efeito significativo dos subcultivos no potencial organogenético *in vitro*, assim como no enraizamento *ex vitro*, abrindo perspectivas de estudos futuros para entender as bases fisiológicas, bioquímicas e moleculares associadas com estas respostas morfogenéticas em *C. fissilis*.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- O número de subcultivo afeta significativamente o desenvolvimento de brotações *in vitro* e o potencial de enraizamento *ex vitro* destas brotações;
- Os segmentos nodais cotiledonares apresentaram melhores resultados para o desenvolvimento de brotações comparativamente aos apicais no primeiro subcultivo;
- Brotações de tamanho igual ou superior a 0,5 cm possibilitam o melhor desenvolvimento de novas brotações assim como o enraizamento destas;
- A percentagem de sobrevivência das mudas obtidas foi maior nos dois primeiros subcultivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahkami, A. H., Melzer, M., Ghaffari, M. R., Pollmann, S., Javid, M. G., Shahinnia, F., Hajirezaei, M. R., Druege, U. (2013) Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta*, 238: 499-517.
- Alves, E. C. S. D. C., Xavier, A., Campos, W. O. (2004) Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X *E. urophylla* ST Blake. *Revista Árvore*, 28: 643-653.
- Aragão, V. P. M., de Souza Ribeiro, Y. R., Reis, R. S., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., Silveira, V., Santa-Catarina, C. (2016) *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124: 611-620.
- Augusto, C. S. S., Biasi, L. A., Telles, C. A. (2006) Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28: 473-476.
- Bajji, M., Thunissen, C., Druart, P. (2013) Adventitious shoot regeneration from *in vitro* juvenile explants of black alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 17: 12.
- Batygina, T. B. (1999) Embryogenesis and morphogenesis of zygotic and somatic embryos. *Russian journal of plant physiology*, 46: 774-788.
- Bhatia, N. P., Bhatia, P., Ashwath, N. (2002) *Ex vitro* rooting of micropropagated shoots of *Stackhousia tryonii*. *Biologia plantarum*, 45: 441-444.

- Biernaski, F. A., Higa, A. R., Silva, L. D. (2012) Genetic variability for juvenile characters of *Cedrela fissilis* Vell. Progenies: a subsidy for definition of seed collection zone. *Revista Árvore*, 36: 49-58.
- Borkowska, B. (2001) Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. *Scientia Horticulturae*, 89: 195-206.
- Carvalho, A. C. P., Torres, A.C., BRAGA, E. J. B., Lemos, E. E. P., Souza, F. V. D., Peters, J. A., Willadino, L., Câmara, T. R. (2011a) Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant cell culture e micropropagation*, 1: 22-29.
- Carvalho, D. C. D., Silva, A. L. L. D., Tanno, G. N., Purcino, M., Biasi, L. A. (2011) Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:108-114.
- Carvalho, J. S. B., Nunes, M. F. P. N., Campos, G. P. A., Goes, M. D. C. C. (2015) Influence of different types of cuttings and substrates on vegetative propagation of *Hyptis pectinata*. *Revista de Ciências Agroveterinárias (Journal of Agroveterinary Sciences)*, 14: 89-91.
- Carvalho, P. E. R. (2003) *Espécies arbóreas brasileiras*. Colombo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1039p.
- Che, P., Gingerich, D. J., Lall, S., Howell, S. H. (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14: 2771-2785.
- Costa, C. T., Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. D. S., Fett-Neto, A. G. (2013) When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in plant science*, 4: 133.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., Sangwan, R. S. (2011) De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends in plant science*, 16: 597-606.
- El-showk, S., Ruonala, R., Helariutta, Y. (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development*, 140: 1373-1383.
- Fermino Júnior, P. C. P., Raposo, A., Scherwinski-Pereira, J. E. (2011) *Ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated plantlets of *Tectona grandis*. *Floresta*, 41: 79-86.
- Fett-Neto, A. G., Fett, J. P., Goulart, L. W. V., Pasquali, G., Termignoni, R. R., Ferreira, A. G. (2001) Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*, 21: 457-464
- Fleck, J. D., Schwambach, J., Almeida, M. E., Yendo, A. C., de Costa, F., Gosmann, G., Fett-Neto, A. G. (2009) Immunoadjuvant saponin production in seedlings and micropropagated plants of *Quillaja brasiliensis*. *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 45: 715-720.
- Giri, C. C., Shyamkumar, B., Anjaneyulu, C. (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18:115-135.
- Hamad, A. M., Taha, R. M. (2008) Effect of sequential subcultures on *in vitro* proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. *Scientia Horticulturae*, 117: 329-334.
- IUCN. International Union for Conservation of Nature. (2017) *IUCN red list of threatened species*, 2017. Disponível em: <

- <http://www.iucnredlist.org/details/33928/0> >. Acesso em: 23 de janeiro de 2017.
- Junior, P. C. P. F., Scherwinski-Pereira, J. E. (2012) Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). *Ciência Florestal*, 22: 1-9.
- Ljung, K., Bhalerao, R. P., Sandberg, G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, 28: 465-474.
- Mattsson, J., Sung, Z. R., Berleth, T. (1999) Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development*, 126: 2691-2979.
- Mohebalipour, N., Aharizad, S., Mohammadi, S., Motallebiazar, A., Arefi, H. (2012) Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10: 280-286.
- Moubayidin, L., Di Mambro, R., Sabatini, S. (2009) Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends in plant science*, 14: 557-562.
- Moura, T. L., Almeida, W. A. B., Madalena, B., Mendes, J., Filho, F. D. A. A. M. (2001) Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23: 240-245.
- Moura, L. C., Titon, M., Miranda, N. A., Moreira, T. P., de Oliveira, M. L. R. (2012) *In vitro* multiplication and elongation of vinhatico (*Plathymentia reticulata*). *Scientia Forestalis*, 40: 499-505.
- Nicoli, P.M., Paivall, R., Nogueirall, R. C., Santanal, J. R. F., Silval, L. C., Silva, D. P. C., Porto, J. M. P. (2008) Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. *Ciencia Rural*, 38: 685-689.
- Noiton, D., Vine, J. H., Mullins, M. G. (1992) Effects of serial subculture *in vitro* on the endogenous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid and rootability in microcuttings of 'Jonathan'apple. *Plant growth regulation*, 11: 377-383.
- Nunes, E. C., Benson, E. E., Oltramari, A. C., Araujo, P. S., Moser, J. R., Viana, A. M. (2003) *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, 12: 837-848.
- Nunes, E. C., Castilho, C. V., Moreno, F. N., Viana, A. M. (2002) *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell tissue and Organ Culture*, 70: 259-268.
- Pereira, J. E. S., França, R. B., Dantas, A. D. M., Fortes, G. R. (2005) Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. *Horticultura Brasileira*, 23: 86-89.
- Pereira, J. E. S., Fortes, G.R.L. (2001) Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de enraizamento. *Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal*, 23: 417-420.
- Pereira, M. O., Navroski, M. C., Reiniger, L. R. S. (2015) *In vitro* multiplication of *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex A. DC.) MATTOS. *Nativa*, 3: 59-63.
- Perveen, S., Anis, M., Aref, I. M. (2013) Resource communication. *In vitro* plant regeneration of *Albizia lebbeck* (L.) Benth. from seed explants. *Forest Systems* 22: 241-248.

- Pijut, P. M., Beasley, R. R., Lawson, S. S., Palla, K. J., Stevens, M. E., Wang, Y. (2012) *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species, *Propagation of Ornamental Plants*, 12: 25-51.
- Prakash, E., Khan, P. S. S. V., Rao, T. J. V. S., Meru, E. S. (2006) Micropropagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using mature nodal explants. *Journal of Forest Research*, 11: 329-335.
- Pruski, K. W., Lewis, T., Astatkie, T., Nowak, J. (2000) Micropropagation of Chokecherry and Pincherry cultivars. *Plant cell, tissue and organ culture*, 63: 93-100.
- Ribeiro, Y. R. S. (2015) Enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas em *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 38p.
- R Development Core Team. (2016) *The R Project for Statistical Computing*, Disponível em: < <https://www.r-project.org/> >. Acesso em: 03 de outubro de 2016.
- Rocha, S. C. D., Quorim, M., Ribas, L. L. F., Koehler, H. S. (2007) Micropropagation of *Cabralea canjerana*. *Revista Árvore*, 31: 43-50.
- Romano, A., Noronha, C., Martins-Loucao, M. A. (1995) Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant cell, tissue and organ culture*, 40: 159-167.
- Ruedell, C. M., de Almeida, M. R., Schwambach, J., Posenato, C. F., Fett-Neto, A. G. (2013) Pre and post-severance effects of light quality on carbohydrate dynamics and microcutting adventitious rooting of two *Eucalyptus* species of contrasting recalcitrance. *Plant Growth Regulation*, 69: 235-245.
- Ruschel, A. R., Nodari, E. S., Guerra, M. P., Nodari, R. O. (2005) Evolução do uso e valorização das espécies madeiráveis da Floresta Estacional Decidual do Alto-Uruguai. *Ciência Florestal*, 13: 167-178.
- Sairanen, I., Novák, O., Pěnčík, A., Ikeda, Y., Jones, B., Sandberg, G., Ljung, K. (2012) Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24: 4907-4916.
- Santa-Catarina, C., Maciel, S. C., Pedrotti, E. L. (2001) Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). *Revista Brasileira de Botânica*, 24: 501-510.
- Santos, C. C. C., Hercílio, P., Rodrigues, V. (2004) Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. *Bragantia*, 63: 201-205.
- Shekhawat, N. S., Rathore, T. S., Singh, R. P., Deora, N. S., Rao, S. R. (1993) Factors affecting *in vitro* clonal propagation of *Prosopis cineraria*. *Plant Growth Regulation*, 12: 273-280.
- Shemer, O., Landau, U., Candela, H., Zemach, A., Williams, L. E. (2015) Competency for shoot regeneration from *Arabidopsis* root explants is regulated by DNA methylation. *Plant Science*, 238, 251-261.
- Shimizu-Sato, S., Mori, H. (2001) Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiology*, 127: 1405-1413.
- Silva, R. P., Costa, M. A. P., Souza, A., Almeida, W. A. B. (2005) Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 1153-1159.
- Skirvin, R. M., Mc Pheeters, K. D., Norton, M. (1994) Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience*, 29: 1232-1237.
- Soares, F. P., Paiva, R., Alvarenga, A. A. D., Nogueira, R. C., Emrich, E. B., Martinotto, C. (2007) Organogênese direta em explantes caulinares de

- mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia*, 31: 1048-1053.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Mori, H. (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*, 45: 1028-1036.
- Teale, W. D., Paponov, I. A., Palme, K. (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 847-859.
- Tiwari, S. K., Tiwari, K. P., Siril, E. A. (2002) An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 1-6.
- Uzelac, B., Janosevic, D., Stojicic, D., Budimir, S. (2012) Effect of cytokinins on shoot apical meristem in *Nicotiana tabacum*. *Archives of Biological Sciences*, 64: 511–516.
- Valério, A. F., Watzlawick, L. F., Silvestre, R., Koehler, H. S. (2009) Determination of the basic density of cedro wood (*Cedrela fissilis* Vell.) along the stem. *Applied Research e Agrotechnology*, 1: 29-36.
- Yan, H., Liang, C., Yang, L., Li, Y. (2010) *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 115-120.

4.2. A INFLUÊNCIA DA LUZ NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO E A ABUNDÂNCIA DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EM BROTAÇÕES DE *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)

RESUMO

A qualidade do espectro de luz tem sido considerada um fator importante para o crescimento e desenvolvimento da morfogênese *in vitro*. Abordagens avançadas, como a proteômica, podem ser úteis para a melhor compreensão de mudanças fisiológicas e moleculares durante a fotomorfogênese *in vitro*. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da qualidade da luz sobre o desenvolvimento das brotações e sobre a abundância diferencial de proteínas em *Cedrela fissilis* Vell. Foram utilizados segmentos nodais cotiledonares e apicais de plântulas germinadas *in vitro*. Os explantes foram incubados em sete tratamentos composto de lâmpadas de diodo emissor de luz (LED) com seis diferentes combinações de espectro de luz (Branco/Azul/Vermelho/Vermelho distante) e lâmpada fluorescente (FLU). Após 45 dias de incubação, avaliou-se a indução, número e comprimento de brotações. Para análise proteômica por *shotgun* foram coletadas amostras de brotações obtidas nos tratamentos que possibilitaram o resultado superior e o inferior, bem como de explantes antes da incubação *in vitro*. A combinação dos espectros de luz branco, azul médio e vermelho da LED BAmV afetaram significativamente o alongamento das brotações. A análise proteômica possibilitou

a identificação de 761 proteínas. Deste total, 342 proteínas identificadas mostraram uma abundância diferencial nas brotações obtidas nos tratamentos sob lâmpadas de LED BAmV e fluorescente (FLU), e nos explantes antes da incubação. Brotações incubadas em lâmpada de LED BAmV apresentaram regulação positiva de proteínas relacionadas com a fixação do carbono e fotossíntese, como Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, proteínas do fotossistema I P700, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NADP, e também àquelas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, tais como glutamina sintetase, que estão relacionadas ao processo de desenvolvimento. Estas proteínas podem ter um papel importante no processo de alongamento das brotações de *C. fissilis*. Os comprimentos de onda específicos na faixa do azul médio e vermelho (LED BAmV) pode ser utilizadas em substituição às lâmpadas fluorescentes, otimizando da propagação *in vitro* de *C. fissilis*.

ABSTRACT

Light spectrum quality has been considered as an important factor for growth and development of *in vitro* plant morphogenesis. Advanced approaches, like proteomics, could be useful for better understanding of physiological and molecular alterations during *in vitro* photomorphogenesis. This study aimed to evaluate the effect of light quality on shoot development and differential abundance of proteins in micropropagation of *Cedrela fissilis* Vell. Cotyledonary and apical nodal segments from seedlings germinated *in vitro* were used as explants. These explants were incubated under seven treatments composed by light-emitting diode (LED) with six combinations different light spectrum (White / Blue / Red / far Red) of LED lamps and fluorescent lamp (control). After 45 days of incubation, the induction, number, and length of shoots were evaluated. For proteomic analysis by shotgun, samples of shoots obtained in the treatments that allowed the best and the lowest result as well as the explants before the *in vitro* incubation were collected. The combination of light spectrum with white, medium blue and red (LED WmBR) significantly affected the shoots elongation. The proteomic analysis enabled the identification of 761 proteins. In this total, 342 identified proteins showed a differential abundance in

shoots obtained under lamps treatment of LED WmBR and fluorescent and from the excised explantes before the *in vitro* inoculation. Shoots incubation under the LED WmBR lamps presented a higher positive regulation of important proteins of carbon fixation, photosynthesis, such as ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, proteins photosystem I P700 and also those related with nitrogen matabolism, such as glutamine synthetase. These proteins can have an important role on the elongation process of shoots in *C. fissilis*. The specific wavelengths in the range white, blue and red (LED BAmV) can be used to substitute fluorescent lamps, optimizing the *in vitro* propagation for *C. fissilis*.

1. INTRODUÇÃO

Na propagação *in vitro*, a organogênese direta com uso de segmentos caulinares contendo gemas axilares têm sido utilizada para a regeneração de plantas, incluindo em arbóreas (Pijut et al., 2012; Giri et al., 2004; George et al., 2008; Mohebalipour et al., 2012). O desenvolvimento da organogênese *in vitro* passa por várias etapas (Duclercq et al., 2011), sendo a aquisição da competência um fator chave para que ocorra o processo (Che et al., 2002). Alguns fatores como tipo de explante, meios de cultura e reguladores de crescimento são determinantes para a indução e desenvolvimento das brotações (Moura et al., 2001; Silva et al., 2005; Nicioli et al., 2008; Carvalho et al., 2011; Duclercq et al., 2011).

O controle de fatores ambientais, como a temperatura e luz, também são fatores importantes para a resposta morfogenética *in vitro* (Heringer et al., 2017). Entre os fatores externos, a luz tem destaque fundamental para espécies fotoautotróficas, atuando na produção de energia pela fotossíntese, e também atuando como estímulo percebido por fotorreceptores que desencadeiam a fotomorfogênese em plantas (Olle e Viršile, 2013).

As diferentes fontes de radiação têm sido o centro de várias pesquisas ao longo dos anos, em especial quanto aos efeitos da radiação vermelho e vermelho distante sobre o desenvolvimento e fisiologia das plantas (Britz e Sager, 1990; McMahon et al., 1991; Demotes-Mainard et al., 2016). A radiação na região azul do espectro também é de grande importância para a fotomorfogênese, atuando no alongamento do caule e folhas (Hoenecke et al., 1992). Estudos têm concentrado esforços nas respostas estimuladas *in vitro* com utilização de fontes artificiais de luz (Poudel et al., 2008; Gupta e Jatothu, 2013). O uso das lâmpadas artificiais como as fluorescentes, têm sido comumente utilizada na cultura *in vitro*, pois emitem fótons em ampla faixa espectral essencial para a fotomorfogênese. No entanto, este tipo de lâmpada apresenta um maior consumo de energia elétrica e produz calor que limita a quantidade de luz disponibilizada comparadas a lâmpadas de diodos imersores de luz (LED) (Bula et al., 1991; Gupta e Jatothu, 2013).

O uso de lâmpadas de LED apresenta vantagens comparado aos sistemas convencionais de luz, pois estas lâmpadas possuem comprimento de onda específico e combinações específicas de espectro de luz, durabilidade

relativamente longa, alta eficiência, pois a maior parte da energia elétrica é convertida em radiação com a produção mínima de calor, o que favorece a instalação das lâmpadas próximo às culturas sem a indução de dano ou fotoestresse (Gupta e Jatothu, 2013). Adicionalmente, o tamanho das lâmpadas tipo LED também é um fator positivo, pois pode facilitar na montagem de sistemas de culturas (Hoenecke et al., 1992 Gupta e Jatothu, 2013).

Investigações sobre o efeito da exposição de luz LED na cultura *in vitro* demonstraram que espectros de luz vermelho, vermelho distante e azul, isoladamente ou combinadas, atuam significativamente em melhorias na morfogênese das plantas (Nhut et al., 2001; Poudel et al., 2008; Li et al., 2010; Heringer et al., 2017). Em diversas espécies os efeitos influenciados pelo uso de LED são positivos, incluindo alongamento do caule e entrenós em culturas de videira (Poudel et al., 2008), e o aumento da matéria seca e fresca em bananeira (Nhut et al., 2001), morangueiro (Nhut et al., 2003) e algodoeiro (Li e Tang, 2010). Também houve promoção no desenvolvimento da organogênese em *Anthurium andreaeanum* L. pela exposição ao vermelho em conjunto com azul (Budiarto, 2010). Neste sentido, o uso de lâmpadas de LED em culturas *in vitro* têm demonstrado ser um método vantajoso para a regulação de processos fisiológicos de crescimento, como a fotomorfogênese, acarretando na maior qualidade e produção e desenvolvimento de mudas micropropagadas (Gupta e Jatothu, 2013).

A abordagem proteômica é realizada no estudo em processos celulares, pois fornece informações sobre as proteínas sintetizadas durante mudanças no crescimento e desenvolvimento de uma planta, possibilitando a comparação fisiológica e análise de influência de sinais exógenos (Hochholdinger et al., 2006; Takac et al., 2011). Neste sentido, a espectrometria de massa é uma ferramenta de alta sensibilidade para estudos de identificação de proteínas e suas interações em sistemas biológicos complexos (Petrovská et al., 2015). Recentemente, abordagens relacionando análises proteômicas em processos de crescimento responsivos à qualidade da luz tem sido realizadas, possibilitando o reconhecimento de proteínas associadas aos efeitos fisiológicos da luz em plantas (Deng et al., 2014; Heringer et al., 2017). No entanto, são poucos os estudos relacionando a abordagem proteômica em estudos de desenvolvimento da organogênese *in vitro* em espécies arbóreas sob efeitos de diferentes espectros de luz.

Embora a quantidade de informações com ênfase no crescimento e desenvolvimento vegetal seja ampla, há uma escassez de informações sobre estudos proteômicos e diferentes espectros de luz durante a morfogênese *in vitro*, especialmente em espécies arbóreas, deste modo, destaca a importância destes estudos permitindo o maior esclarecimento das informações relacionadas com a regulação resposta morfogenéticas, assim otimizando os métodos de micropropagação para espécies arbóreas, em especial para *Cedrela fissilis* (Meliaceae). Esta espécie tem ampla ocorrência no território Brasileiro (Carvalho, 2003; Valério et al., 2009; Biernaski et al., 2012), tem sido intensamente explorada ao longo dos anos, entrando na lista de espécies da Mata Atlântica ameaçadas de extinção, na categoria em perigo (IUCN, 2017). Fatores como a redução da viabilidade das sementes por longos períodos de armazenamento, e a dificuldade de produção de mudas por métodos convencionais, como a estaquia, faz-se necessário o uso de técnicas biotecnológicas como metodologias alternativas de propagação desta espécie nativa. Um sistema de propagação *in vitro* via organogênese direta foi estabelecido para *C. fissilis* (Nunes et al., 2002), e o papel do metabolismo de carboidratos e poliaminas durante o desenvolvimento das brotações foi estudado (Aragão et al., 2016). Entretanto, o efeito da qualidade da luz no desenvolvimento de brotações e no padrão de proteínas pela análise proteômica ainda não foi realizado para esta espécie, neste sentido, o objetivo foi analisar o efeito de diferentes espectros de luz no desenvolvimento da organogênese *in vitro* e alterações no perfil de proteínas diferencialmente abundante em brotações de *C. fissilis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Neste experimento foram utilizados segmentos nodais apicais e nodais cotiledonares como fonte de explantes, obtidos de plântulas germinadas *in vitro*. Para tanto, as sementes de *C. fissilis* foram obtidas do viveiro Sementes Caiçara, Brejo Alegre, Brasil (21°10'S e 50°10'W), coletadas em agosto de 2014.

2.2. Germinação *in vitro*

Antes da inoculação *in vitro*, as sementes foram submetidas à assepsia como descrita por Santa-Catarina et al. (2001). Após a assepsia, as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) (Phyto technology Laboratores[®]), suplementado com sacarose (20 g L⁻¹) (Proquimios[®]) e Phytigel (2,0 g L⁻¹) (Sigma-Aldrich[®]). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1,5 atm, por 15 min. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, com intensidade luminosa de 55 $\mu\text{mol.m}^2 \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 \pm 2 °C.








Plântulas de *C. fissilis* com 60 dias foram utilizadas para a obtenção dos segmentos nodais cotiledonares e apicais, utilizados como explantes para avaliar os efeitos de diferentes fontes de luz sobre a regeneração de brotações.

2.3. Efeito de diferentes espectros de luz azul no desenvolvimento de brotações *in vitro*

Os explantes compostos de segmentos nodais apicais e nodais cotiledonares (aproximadamente 1,5 cm de comprimento) foram inoculados em meio de cultura MS, suplementado com sacarose (20 g L⁻¹), Phytigel[®] (2,0 g L⁻¹) e na ausência ou presença (2,5 μM) de benziladenina (BA - Sigma-Aldrich[®]). O pH do meio foi ajustado para 5,7, em seguida, o meio de cultura foi distribuído em frascos de cultura (250 mL), contendo 30 mL de meio de cultura por frasco antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1,5 atm, por 15 min.

A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, e após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 \pm 2 °C e fotoperíodo de 16 h, com intensidade luminosa variando sob 6 diferentes tipos de lâmpadas de LED (Koninklijke Philips Electronics NV, Netherlands) e um lâmpada fluorescente, com diferentes combinações de comprimento de ondas (Tabela 1). O espectrômetro USB 2000 (Ocean Optics, Dunedin, USA) foi utilizado para medir o pico de comprimento de onda em cada LED e fluorescente utilizada no experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Características das diferentes lâmpadas utilizadas na morfogênese *in vitro* em *C. fissilis*.

Tratamentos	Espectro de luz das lâmpadas	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol.m}^2 \text{s}^{-1}$)	Comprimento de onda (nm)
 Fluorescente (FLU)	Fluorescente	55	435 / 545 / 580
 LED BAm	B / Am	55	450 / 530
 LED BAa	B / Aa	55	450 / 530
 LED BAbV	B / Ab / V	45	450 / 530 / 660
 LED BAmV	B / Am / V	45	450 / 530 / 660
 LED BAbVd	B / Ab / V / Vd	40	450 / 530 / 660 / 735
 LED BAmVVd	B / Am / V / Vd	40	450 / 530 / 660 / 735

Azul Baixo (Ab) = 8-10% de azul; Azul Médio (Am) = 12 a 14% de azul; Azul Alto (Aa) = 16 a 18% de azul; Vermelho (V) = 30 a 50% de vermelho; Vermelho Distante (Vd) = 12% de vermelho distante (Fonte: Heringer et al., 2017).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 7 x 2 x 2, sendo sete tipos de lâmpadas (Tabela 1), dois tipos de explantes (segmentos nodais cotiledonares e apicais) e duas concentrações de BA (0 e 2,5 μM). Cada tratamento foi constituído por oito repetições com cinco explantes cada, totalizando 40 explantes por tratamento.

Ao fim de 45 dias de cultura avaliou-se a percentagem de indução (brotações acima de 0,3 cm), número e comprimento (cm) das brotações. Foi realizada a análise da matéria fresca e seca das brotações nos diferentes tratamentos. Foram coletadas amostras de brotações obtidas nos tratamentos com os resultados significativamente superiores e inferiores para os parâmetros analisados para a análise proteômica. Posterior, as amostras foram armazenadas a -20°C até proceder a análise proteômica diferencial de proteínas.

2.4. Análise da matéria fresca e seca

A análise da matéria fresca e seca foi realizada em brotações de todos os tratamentos após 45 de cultura *in vitro*, sendo utilizados cinco frascos, cada frasco contendo brotações oriundas de cinco explantes. Para a análise da matéria fresca, as brotações foram pesadas em balança analítica, colocadas em sacos de papel, e armazenados em estufa a 60°C , por 72 horas. Após este período, as brotações foram novamente pesadas obtendo-se a matéria seca.

Todas as imagens foram editadas em software Adobe Photoshop versão CS2 9.0.2 para melhor corte e montagem das imagens (<https://www.adobe.com/br>).

2.5. Análise proteômica

A análise proteômica foi realizada em amostras de brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares mantidas em lâmpadas fluorescentes (FLU) e LED BAmV que propiciou o melhor resultado, significativamente superior, para comprimento das brotações, e em explantes iniciais (segmentos nodais cotiledonares) utilizados para o experimento. Em ambos os tratamentos (FLU e BAmV), as amostras foram coletadas aos 45 dias de incubação, e os explantes iniciais foram excisados das plântulas com 60 dias de idade.

2.5.1. Extração de proteínas

A extração de proteínas foi efetuada seguindo metodologia descrita por Balbuena et al. (2011) com algumas modificações. Os extratos de proteínas foram preparados em triplicata biológica contendo 500 mg de matéria fresca para cada amostra, em que foram macerados com 1mL de tampão de extração contendo ácido tricloroacético 10% (TCA) (Sigma-Aldrich®) em acetona (Sigma-Aldrich®) e 20 mM de ditioneitol (DTT) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Após a maceração, as amostras foram brevemente agitadas em vórtex e incubadas à -20°C por 60 min. Em seguida, foram centrifugadas a $16.000 \times g$ por 30 min, à 4°C , coletando-se o pellet em que foi lavado por três vezes com solução de acetona e 20 mM de DTT (Bio-Rad Laboratories®), seguido de centrifugação por 10 min a 4°C a cada lavagem. O pellet foi ressuspenso em 1 mL de tampão contendo uréia (7 M) (GE Healthcare), Tiourea (2M) (GE Healthcare), DTT (1 %), triton X-100 (2 %) (GE Healthcare), 1 mM de Fluoreto fenil metano sulfonil (PMSF) (Sigma-Aldrich®) e pepstatina (5 μM). Em seguida, foram centrifugadas a $16.000 \times g$ por 10 min, à 4°C . O sobrenadante foi coletado, obtendo-se as proteínas totais. A concentração de proteínas foi estimada usando-se o 2-D QuantKit (GE Healthcare).

2.5.2. Digestão de proteínas

Antes do passo de digestão com tripsina, as amostras (100 μg de proteínas) em triplicata biológica foram adicionadas à membrana Amicon Ultra – 0,5 μL - 3kDa (Merck Millipore, Germany) para a dessalinização usando bicarbonato de amônio 50 mM (Sigma-Aldrich®) à pH 8,5, como tampão. As membranas foram preenchidas até a capacidade máxima com bicarbonato de amônio e centrifugadas a $15.000 \times g$

g durante 10 min, à 20° C. Este procedimento foi repetido pelo menos três vezes, resultando em aproximadamente 50 µL por amostra.

A digestão de proteínas com tripsina seguiu a metodologia previamente descrita por Reis et al. (2016). Para cada amostra, foi adicionado 25 µL de RapiGest® a 0,2% (v/v) (Waters, Milford, CT, USA), seguido de incubação em um Eppendorf Thermomixer® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) à 80° C durante 15 min. Em seguida, foi adicionado 2,5 µL de DTT 100 mM, posteriormente incubados à 60° C durante 30 min sob agitação. Às amostras foi adicionado 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM (GE Healthcare) e em seguida foram incubadas no escuro durante 30 min, à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ$ C).

A digestão foi realizada por adição de 20 µL de solução de tripsina (50 ng/µL; V5111, Promega, Madison, WI, USA) preparada em bicarbonato de amônio 50 mM (Sigma-Aldrich®), após isso, as amostras foram incubadas à 37 °C durante 15 h. Em seguida foi adicionado 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich®) 5% (v/v) e incubado a 37 °C durante 90 min, seguido por centrifugação a 14.000 x g por 30 min, à 8 °C. As amostras (100 µL) foram transferidas para vials Total Recovery (Waters, Manchester, UK).

2.5.3. A análise por espectrometria de massa

Um nanoAcquity UPLC ligado a um espectrômetro de massa Synapt G2-Si HDMS (Waters, Manchester, UK) foi utilizado para análise ESI-LC-MS/MS de acordo com Reis et al. (2016). A cromatografia foi realizada por injeção de 1 µL de amostras digeridas para normalizá-las antes da quantificação relativa das proteínas. Para assegurar valores molares padronizados para todas as condições, a normalização entre as amostras foi baseada em medições estequiométricas de contagens de íons totais de corridas antes das análises. As corridas consistiam de três repetições biológicas. Durante a separação, as amostras foram carregadas numa coluna nanoAcquity UPLC 5 µm C18 (180 µm × 20 mm) a 5 µL min⁻¹ durante 3 min e depois numa coluna de fase inversa analítica de nanoAcquity HSS T3 de 1,8 µm (75 µm × 150 Mm) a 350 nL.min⁻¹ com uma temperatura da coluna de 60 °C. Para a eluição de peptídeos utilizou-se um gradiente binário, com fase móvel A constituída por água (Tedia, Fairfield, Ohio, EUA) e ácido fórmico a 0,1% (Sigma-Aldrich) e fase móvel B constituída por acetonitrila (Sigma-Aldrich) e 0,1 % ácido fórmico. A espectrometria de massas foi realizada em modo positivo e de resolução

(modo V) a 35.000 FWHM com mobilidade iônica em modo de aquisição independente de dados (DIA), e a velocidade de onda IMS foi ajustada para 600 m/s. A energia de colisão de transferência aumentou de 19 V para 45 V no modo de alta energia, e as tensões de cone e capilar foram 30 V e 2800 V, respectivamente, com uma temperatura de fonte de 70 °C. Para os parâmetros TOF, o tempo de varredura foi ajustado para 0,5 s no modo contínuo com uma faixa de massa de 50 a 2000 Da.

2.5.4. A análise de dados proteômica

O processamento de espectros e a pesquisa de bases de dados foram realizados por Progenesis Q1 para Proteomics Software V.2.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Reino Unido). Para a identificação de proteínas, utilizou-se a base de dados de sequências de proteínas de *Citrus sinenses* (2016/05) em site Uniprot. Esta base de dados foi selecionada utilizando a árvore filogenética (Letunic e Bork 2016) gerada a partir de todas as espécies de plantas com base de dados disponível no Uniprot (Figura 1). A descrição das proteínas e a classificação funcional foram realizadas usando o software Blast2Go v. 3.2 PRO (Conesa et al., 2005).

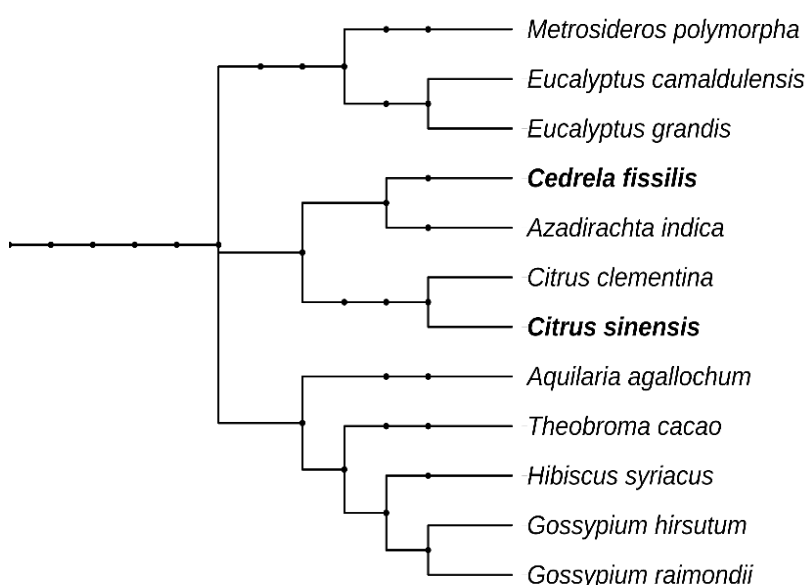


Figura 1: Árvore filogenética de *Cedrela fissilis* a partir de espécies de plantas com base de dados da Uniprot (<http://itol.embl.de/>).

2.6. Análise estatística dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias de Student-Newman-Keuls (SNK) em 5% de probabilidade, utilizando software R® versão 3.3.1 (R Development Core Team, 2016).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do tipo de luz sobre a morfogênese de brotações

As diferentes combinações de espectro de luz, variando do médio azul ao vermelho, apresentaram efeitos no desenvolvimento de brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares e apicais de *C. fissilis* (Figura 2). Dentre os parâmetros analisados, o comprimento das brotações (Figura 2A) foi o aspecto com maior influência comparativamente à indução (Figura 2B) e número (Figura 2C) de brotações.

O uso de segmentos nodais cotiledonares incubados em meio de cultura com BA possibilitou o desenvolvimento de brotações com maior comprimento comparativamente aos segmentos nodais apicais, em todos os tratamentos (Figuras 2A e 3). Nos segmentos nodais cotiledonares com adição de benziladenina, os maiores comprimentos para brotações foram obtidos nas lâmpadas com os espectros de luz de LED BAmV e LED BAmVVd, não diferindo significativamente de LED BAbV (Figura 2A). Neste sentido, pode-se observar que a combinação de luz azul médio (Am) e vermelho (V) são determinantes para o maior alongamento das brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares, uma vez que as brotações mantidas nas LED BAm e BAa apresentaram resultado significativamente inferior.

Por outro lado, os menores valores para o comprimento das brotações foram obtidos nos segmentos nodais apicais sem a adição de BA ao meio de cultura, para a maioria dos tratamentos testados (Figura 2A). Desta forma, o espectro e a quantidade de luz afeta positivamente o alongamento de brotações dependente do tipo de explante e presença de citocinina no meio de cultura (Figuras 2 e 3).

Para a indução de brotações, não foram verificadas variações significativas entre maioria dos tratamentos utilizando segmentos nodais cotiledonares e apicais sob influência dos diferentes tratamentos aplicados. Os menores valores foram observados em brotações oriundas de segmentos nodais apicais sem a presença de BA (Figura 2B) quando mantidas nas lâmpadas fluorescente e LED BAbVVd em comparação aos demais tratamentos (Figura 2B).

Segmentos nodais apicais incubados em meio de cultura com BA apresentaram maior número de brotações, sem diferença significativa entre as diferentes lâmpadas de LED e FLU. Por outro lado, estes mesmos explantes quando incubados em meio de cultura desprovidos de BA apresentaram o menor número de brotações quando mantidos nos diferentes tratamentos (Figura 2C). Adicionalmente, o número de brotações obtidas a partir de segmentos nodais cotiledonares incubados na ausência ou presença de BA foi similar, porém maior que o número de brotações obtidas em segmentos nodais apicais na ausência de BA (Figura 2C).

Neste sentido, a adição de BA ao meio de cultura possibilitou aumento do número de brotações obtidas a partir de segmentos nodais apicais (Figura 2C) e o maior comprimento das brotações obtidas a partir de segmentos nodais cotiledonares (Figura 2A), demonstrando efeitos diferenciados entre os explantes sob influência da adição de BA ao meio de cultura.

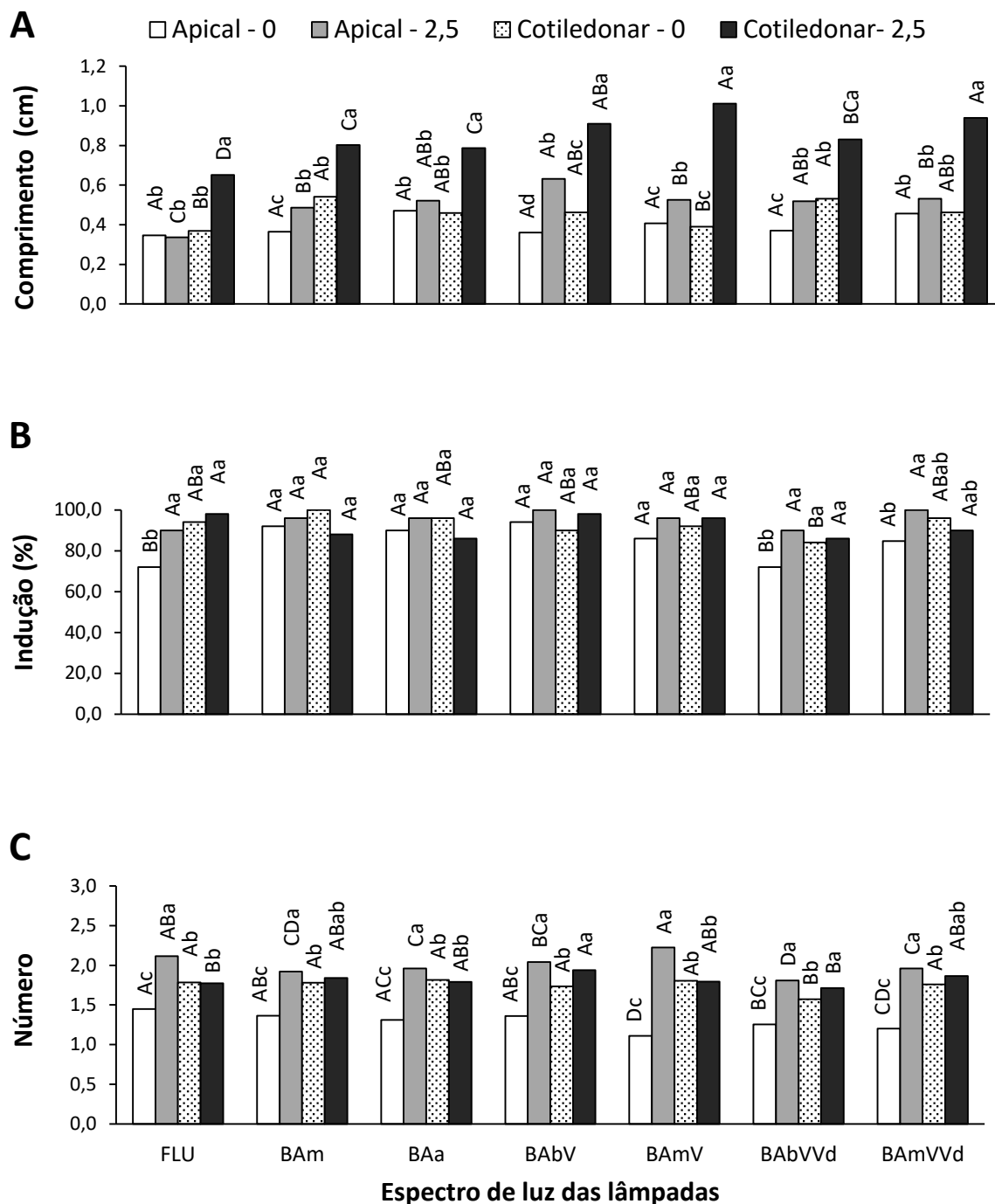


Figura 2: Comprimento (A), indução (B) e número (C) de brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais cotiledonares e apicais após 45 dias de incubação em meio de cultura MS suplementado ou não com BA (0 e 2,5 μ M) sob diferentes tipos de espectros de luz de lâmpadas LED (BAm, BAa, BAbV, BAmV, BAbVVd, BAmVVd e na lâmpada fluorescente (FLU). Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas para o tipo de explante (segmento nodal cotiledonar ou apical) nos diferentes tratamentos. Letras minúsculas representam diferença estatística comparando-se os dois tipos de explantes (segmento nodal cotiledonar e apical) em cada tratamento (lâmpada). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n = 10$, CV comprimento = 18,01%, CV indução = 12,01%, CV número = 7,42 %).

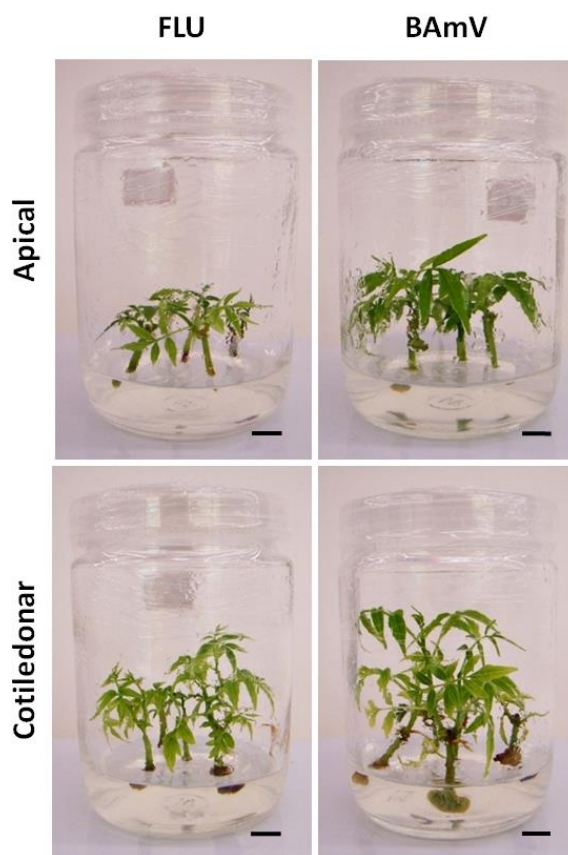


Figura 3: Aspectos morfológicos de brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares e apical de *C. fissilis* após de 45 dias de incubação em meio de cultura MS acrescido com BA (2,5 μ M) e mantidas em lâmpadas de LED BAmV e fluorescente (FLU). Barras = 1cm.

A matéria e seca das brotações também apresentaram alterações significativas sob os diferentes tratamentos de espectros de luz, bem como a adição de BA ao meio de cultura (Figura 4). Valores maiores de matéria fresca foram observados em brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares, ambas incubadas em meio de cultura com 2,5 μ M BA e mantidas em lâmpadas de LED contendo vermelho no espectro de luz (BAbV, BAmV, BAbVVd, BAmVVd) (Figura 4A). Os menores valores de matéria fresca nestes mesmos tratamentos foram observados para brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares incubados na ausência de citocinina, mostrando que a presença de citocinina e luz vermelha (30 a 50% de vermelho) é importante para o crescimento das brotações. Por outro lado, nos tratamentos com lâmpadas fluorescente (FLU) e nas LED com espectros de luz BAm e BAb, os maiores valores foram obtidos para as brotações oriundas dos segmentos nodais cotiledonares mantidos na presença e ausência de BA e os nodais apicais mantidos com BA, enquanto brotações de segmentos nodais apicais incubados sem BA apresentaram os menores valores para este parâmetro (Figura 4A).

Na matéria seca, valores significativamente maiores foram observados para as brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares incubados em meio de cultura com 2,5 μM BA e mantidos na lâmpada de LED BAmV, seguido pelas brotações oriundas de segmentos nodais apicais também incubados com citocinina nesta mesma lâmpada de LED (Figura 4B).

Os maiores valores de matéria seca (Figura 4 B) observado nos segmentos nodais cotiledonares com presença de BA na lâmpada de LED BAmV podem ser atribuídos ao maior comprimento das brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares (Figura 2A).

Adicionalmente, brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares incubados em meio de cultura com citocinina apresentaram maiores valores de matéria fresca (Figura 4A), e também seca (Figura 4B). Por outro lado, os diferentes tratamentos (lâmpadas) não apresentou grandes influenciaram significativamente os valores de matéria fresca e seca em brotações oriundas de segmentos nodais apicais incubados em meio de cultura sem BA (Figura 4), mostrando que a presença de BA no meio de cultura, e a incubação em LED contendo vermelho é fundamental para aumentar os valores destes parâmetros para este tipo de explante.

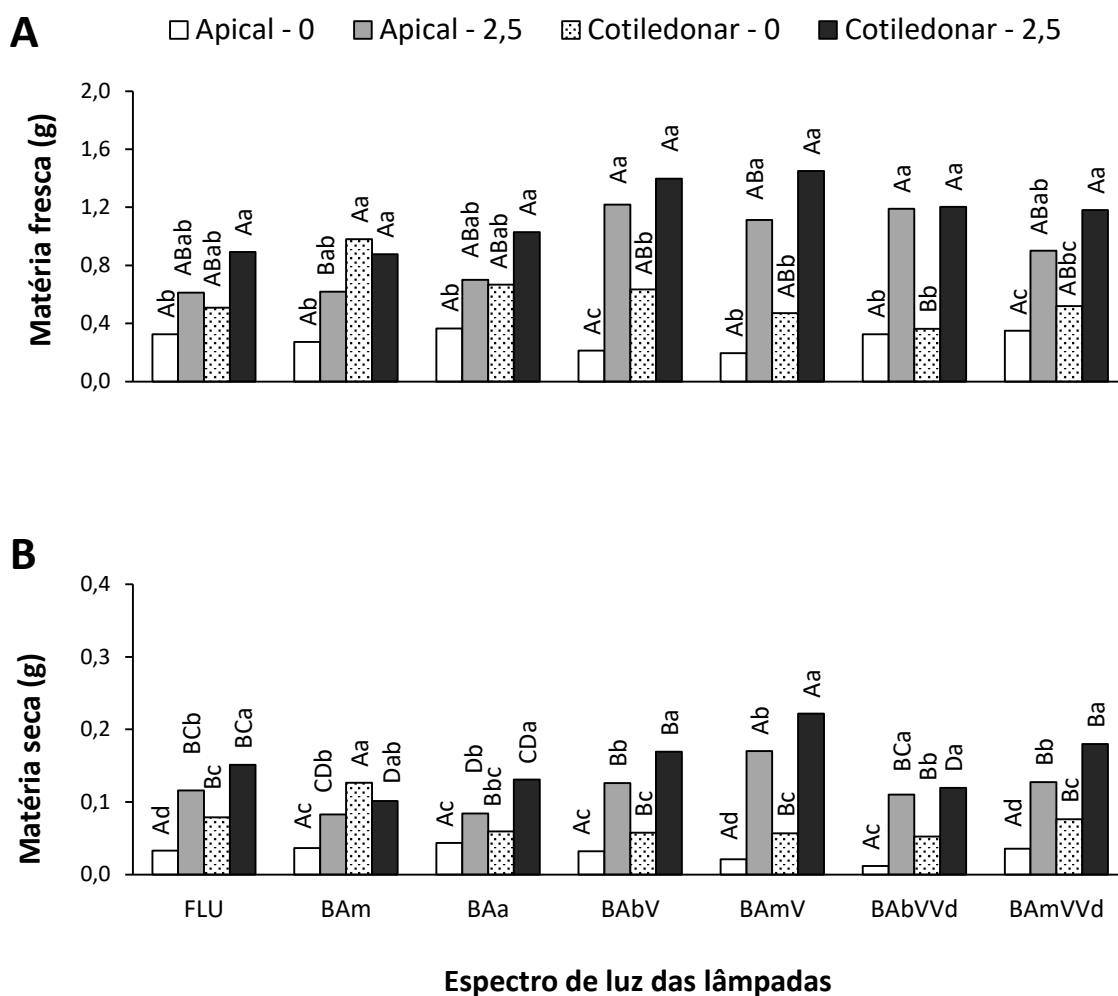


Figura 4: Valores de matéria fresca (**A**) e seca (**B**) em brotações de *C. fisilis* oriundas de segmentos nodais cotiledonares e apicais após 45 dias de incubação em meio de cultura MS, suplementado ou não com BA (0 e 2,5 μ M) sob diferentes tipos de espectros de luz de lâmpadas LED (BAm, BAa, BAbV, BAmV, BAbVVd, BAmVVd e na lâmpada fluorescente (FLU). Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas para o tipo de explante (segmento nodal cotiledonar ou apical) nos diferentes tratamentos. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas comparando-se os diferentes explantes (segmentos nodais cotiledonares e apicais) no mesmo tratamento (lâmpada). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n = 5$, CV Matéria fresca = 38,07%, CV Matéria seca = 19,69%).

3.2. Análise proteômica

Na análise proteômica comparativa entre os tratamentos de brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares incubados em meio de cultura contendo 2,5 μM de BA e mantidos em lâmpadas de LED BAmV, fluorescente (FLU) e explantes segmentos nodais cotiledonares, excisados das plântulas com 60 dias de idade (EXP), foram identificadas 761 proteínas identificadas neste estudo, demonstrando resultados inéditos para a espécie em *Cedrela fissilis*. Destas, 415 não apresentaram alterações na abundância das proteínas nas amostras entre os três tratamentos (Anexo 1), 346 proteínas foram reguladas positivamente (up-reguladas) ou negativamente (down-reguladas) em comparação entre os tratamentos explante e brotações oriundas das lâmpadas fluorescente e LED BAmV (Figura 5 e tabela 2).

Comparando-se as 346 proteínas em brotações mantidas por 45 dias sob lâmpadas de LED BAmV e fluorescente (comparação BAmV/ FLU) verificou-se que 37 proteínas foram up-reguladas, 129 foram down-reguladas, duas proteínas foram únicas nas brotações mantidas na lâmpada fluorescente (FLU) (Tabela 2). Nesta comparação, 178 das 342 proteínas mantiveram-se inalteradas.

Comparando-se as amostras de brotações mantidas em lâmpada de LED BAmV com o explante (segmentos nodais cotiledonares antes da incubação) (comparação BAmV/EXP) verificou-se que 71 proteínas foram up-reguladas e 168 down-reguladas, com duas proteínas únicas para as brotações mantidas em LED BAmV, e duas proteínas únicas para o explante e mais outras 2 únicas para LED BAmV (Figura 5). Adicionalmente, das 346 proteínas diferencialmente abundantes, 103 proteínas mantiveram-se inalteradas nesta comparação (Figura 5). Na comparação entre brotações mantidas em lâmpada fluorescente e explante (FLU/EXP), verificou-se 31 proteínas up-reguladas, 54 proteínas down-reguladas, e 259 das 342 proteínas mantiveram-se inalteradas (Figura 5). Este resultado mostra que muitas proteínas não são alteradas entre o explante inicial (EXP) e as brotações obtidas após 45 dias de incubação quando mantidas em lâmpadas fluorescente (FLU).

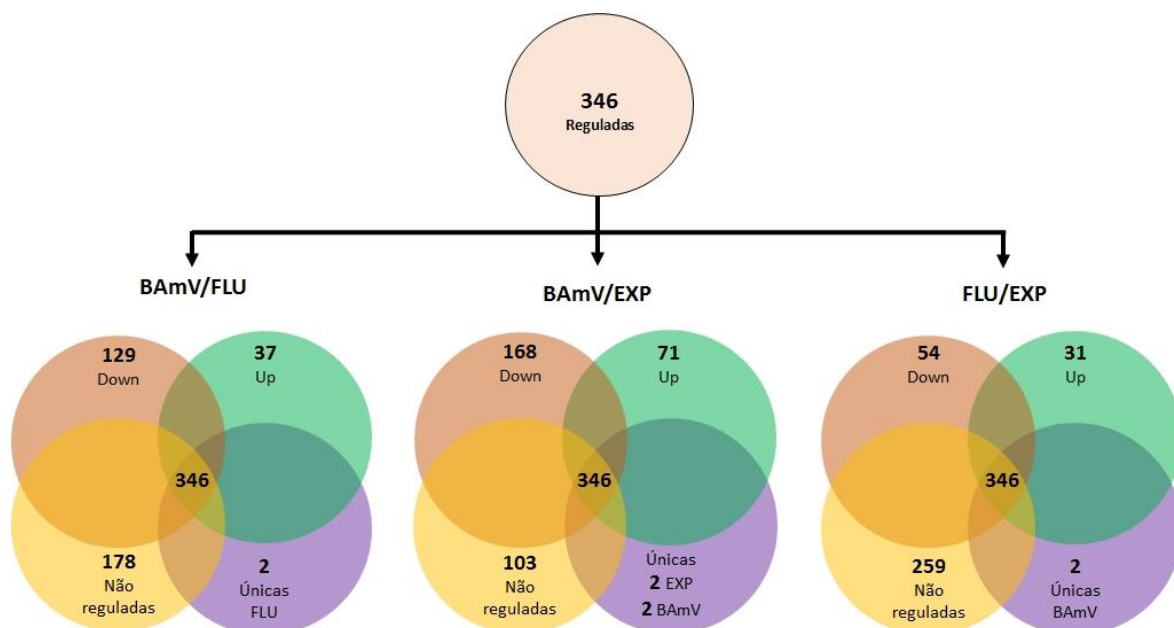


Figura 5: Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas reguladas positivamente (Up) e negativamente (Down) em brotações de *Cedrela fissilis* com 45 de incubação sob lâmpadas de LED (BAmV) e fluorescente (FLU), e em explantes (EXP) oriundos de segmentos nodais cotiledonares antes da incubação, excisados de plântulas com 60 dias de idade.

Tabela 2: Descrição de proteínas up e down-reguladas identificadas pelo software Blast2Go PRO v 3.0 e UniProtKB (www.uniprot.org) em brotações de *Cedrela fissilis* com 45 de incubação em lâmpadas de LED BAmV e fluorescente (FLU), e em explantes (EXP) oriundos de segmentos nodais cotiledonares excisados de plântulas com 60 dias de idade utilizado para iniciar o experimento.

Accession	Número de peptídeo	Score ^d	Descrição Blast2GO	BAmV/FLU ^a	FLU/EXP ^a	BAmV/EXP ^a
A0A067DE85	5	31,20	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	Única FLU ^c	UNCHANGED	Única EXP ^c
A0A067EWS6	2	12,70	ATP-dependent zinc metalloprotease	UNCHANGED	Única FLU ^c	Única LED ^c
A0A067FQ63	9	59,09	cell division cycle 48 homolog	Única FLU ^c	UNCHANGED	Única EXP ^c
A0A067H1W4	2	11,68	probable xyloglucan endotransglucosylase hydrolase 27	UNCHANGED	Única FLU ^c	Única LED ^c
A0A067HOC3	11	80,07	14-3-3	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067E187	7	44,70	14-3-3 16R	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067FB32	7	44,20	14-3-3 D	UNCHANGED	UP	UP
A0A067ETS6	7	49,13	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067G1U6	6	34,77	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EYD4	16	105,62	26S protease regulatory subunit 6A homolog	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067ES75	2	12,05	26S protease regulatory subunit 7	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067E2Y6	4	27,55	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog A	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EEF9	6	52,17	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog A	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067EDL0	3	21,12	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 homolog A	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067DFC3	6	55,23	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DIA7	9	83,56	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067DEM1	5	35,44	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DEM9	6	45,43	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GF30	3	19,27	3-deoxy-manno-octulosonate mitochondrial	DOWN	DOWN	DOWN
A0A067DQ61	2	16,35	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-] dehydratase -like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067ESP4	2	17,53	3-ketoacyl- synthase 20-like	DOWN	UP	UNCHANGED
A0A067GEK0	8	58,70	3-oxoacyl-[acyl-carrier-] synthase chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067E4D6	5	40,20	40S ribosomal SA-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067E8A3	2	11,40	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate chloroplastic-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EJ18	7	50,35	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase 2	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FJL8	19	164,77	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EIE1	11	91,32	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1 isoform X1	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067E8D7	3	17,90	60S acidic ribosomal P2A-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067E181	2	13,13	60S acidic ribosomal P3-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DIX6	11	88,72	6-phosphogluconate decarboxylating 3	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067D7K8	4	24,48	6-phosphogluconate decarboxylating chloroplastic	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067G720	19	177,41	aconitate hydratase 1	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED

Tabela 2: Continuação

Accession	Número de peptídeo	Score ^d	Descrição Blast2GO	BAmV/FLU ^a	FLU/EXP ^a	BAmV/EXP ^a
D5LHU0	4	51,43	actin	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067ER52	28	313,80	actin-7	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067H066	7	41,77	Acylamino-acid-releasing isoform 1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DJQ6	10	76,18	Adenosylhomocysteinase 1	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067F5B1	7	57,22	ADP,ATP carrier mitochondrial	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DVY8	10	77,94	ADP,ATP carrier mitochondrial	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067H743	14	111,06	ADP,ATP carrier mitochondrial	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067ERD5	6	37,59	Alanine aminotransferase 2	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FDJ7	5	34,68	aldehyde dehydrogenase 5F1	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A067CZV7	4	37,45	allene oxide cyclase chloroplastic-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067E2T0	25	325,82	alpha tubulin 1	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FE94	7	52,42	alpha-1,4-glucan- synthase [UDP-forming] 2	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067ELD8	2	11,78	alpha-galactosidase-like isoform X1	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067DX43	6	37,50	alpha-mannosidase-like isoform X1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EBM9	7	52,67	alpha-mannosidase-like isoform X2	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067FRD8	2	25,09	alpha-xylosidase 1	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FRH3	10	86,19	alpha-xylosidase 1	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FK91	2	17,28	ankyrin repeat-containing At3g12360	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GC89	2	14,39	aquaporin PIP1-3-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DYW5	2	17,22	aspartate chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067G727	3	16,57	ATP sulfurylase chloroplastic	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
Q09MJ2	2	13,22	ATP synthase CFO subunit I (chloroplast)	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067FEZ8	2	13,01	ATP synthase subunit b chloroplastic	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067FMW0	35	362,31	ATP synthase subunit mitochondrial	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EX43	2	10,66	ATPase family AAA domain-containing 1-B-like	DOWN	UP	UNCHANGED
A0A067H7P1	2	11,41	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit chloroplastic	UP	DOWN	UNCHANGED
A0A067DTS8	3	23,12	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit chloroplastic isoform X1	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067GB16	4	30,37	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH chloroplastic-like	UP	DOWN	UNCHANGED
A0A067G5C7	5	33,52	basic 7S globulin-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GHJ4	2	13,49	basic 7S globulin-like	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067G853	4	26,39	basic 7S globulin-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067GH96	3	24,02	basic 7S globulin-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EMJ4	3	24,95	beta-galactosidase 10	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067EKF3	7	59,88	beta-glucosidase 3B-like	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067FHD5	2	19,57	beta-glucosidase 3B-like	DOWN	UP	UP
A0A067F663	2	10,29	beta-glucosidase 44-like	UP	UNCHANGED	UP

Tabela 2: Continuação

Accession	Número de peptídeo	Score ^d	Descrição Blast2GO	BAmV/FLU ^a	FLU/EXP ^a	BAmV/EXP ^a
A0A067FI60	5	28,78	beta-glucosidase 44-like	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067ET68	3	17,70	bifunctional nitrilase nitrile hydratase NIT4A	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067FF19	3	23,97	bifunctional purple acid phosphatase 26	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DRI2	2	17,06	calcium sensing chloroplastic isoform X1	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067DWK1	2	11,31	calcium-binding mitochondrial carrier S -3-like isoform X1	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067FOE5	2	11,35	calcium-dependent kinase 13	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067F2C3	5	51,43	calmodulin-7	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GPS1	10	89,99	calreticulin isoform X2	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067H3X8	4	39,88	carbonic anhydrase 2 isoform X3	DOWN	UP	UNCHANGED
A0A067FRX3	8	81,24	carbonic anhydrase 2-like isoform X1	UNCHANGED	UP	UP
A0A067EU42	6	37,52	carboxymethylenebutenolidase homolog	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DW69	9	109,06	CBS domain-containing mitochondrial	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FYQ2	19	122,91	cell division cycle 48 homolog	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067F9U4	22	150,15	cell division cycle 48 homolog	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067ELW7	4	34,89	Chain A family	UNCHANGED	DOWN	DOWN
Q9XJ57	4	26,04	chalcone synthase	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067FCN4	2	14,93	chaperonin CPN60- mitochondrial	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DBS8	2	16,78	chitinase 5-like	UP	UNCHANGED	UP
A0A067DX06	4	45,09	chlorophyll a-b binding chloroplastic	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067GT93	4	33,05	chlorophyll a-b binding chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067H224	5	31,59	chloroplast stem-loop binding of 41 kDa chloroplastic	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067HDB5	13	98,58	chloroplastic	UNCHANGED	UP	UNCHANGED
A0A067GCI1	2	10,75	Chromosome segregation in meiosis 3	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067E468	4	24,40	citrate synthase	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067G4Y4	2	11,78	codeine O-demethylase-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067H445	3	16,31	CURVATURE THYLAKOID chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GGJ5	6	49,77	Cysteine synthase	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A067D1T7	11	88,58	cytoplasmic	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067F9E7	10	104,76	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067DF93	5	41,50	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase chloroplastic-like	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067GWF5	4	32,14	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase chloroplastic-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EWB0	3	16,83	dicer 4 isoform X1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067G509	3	21,47	digalactosyldiacylglycerol synthase chloroplastic	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067FF22	10	61,00	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex mitochondrial-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067DQ23	2	10,58	disease resistance RPP13 1	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED

Tabela 2: Continuação

Accession	Número de peptídeo	Score ^d	Descrição Blast2GO	BAmV/FLU ^a	FLU/EXP ^a	BAmV/EXP ^a
A0A067DS40	2	11,23	disease resistance RPP13 1 isoform X2	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DB48	2	16,69	disease resistance RPS6-like isoform X1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FN46	4	33,95	DNA-damage-repair toleration DRT100-like	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067D442	7	48,36	DNA-damage-repair toleration DRT102	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EKA2	2	11,07	E3 ubiquitin- ligase RNF34-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EP05	4	41,87	elongation factor 1-delta-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067DUR4	27	236,22	elongation factor 2	UNCHANGED	UP	UNCHANGED
A0A067E090	24	222,06	elongation factor 2	UNCHANGED	UP	UP
A0A067EYT3	2	11,24	elongator complex 5	UP	UNCHANGED	UP
A0A067F0R3	3	24,40	embryonic DC-8	DOWN	UP	UP
A0A067GZ61	22	138,87	endoplasmin homolog	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067FQD2	7	72,19	enolase	UP	UNCHANGED	UP
A0A067DL4	6	57,62	epidermis-specific secreted glyco EP1-like	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067E701	7	62,29	epidermis-specific secreted glyco EP1-like	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067DGG9	9	93,60	epidermis-specific secreted glyco EP1-like	DOWN	DOWN	DOWN
A0A067G1N6	21	192,39	eukaryotic initiation factor 4A-11	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067G4Y2	15	112,07	eukaryotic initiation factor 4A-15	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GTT5	2	22,78	eukaryotic translation initiation factor 5A-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067H1Y3	7	50,94	fasciclin-like arabinogalactan 10	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067D964	3	25,83	fasciclin-like arabinogalactan 2	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067ETG0	4	34,50	fasciclin-like arabinogalactan 7	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067G5F1	2	18,76	Fatty acid biosynthesis 1 isoform 1	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DNB5	10	66,00	ferredoxin-dependent glutamate chloroplastic isoform X1	DOWN	UP	UNCHANGED
A0A067F7A0	3	18,83	ferritin- chloroplastic-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067FA78	2	11,21	feruloyl ortho-hydroxylase 1-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FJE7	7	81,33	formate mitochondrial	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067FI97	3	25,53	formate--tetrahydrofolate ligase	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067ESD0	2	20,88	fructose-1,6- chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067F4J3	20	265,30	fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DF17	5	40,96	fructose-bisphosphate cytoplasmic isozyme 1	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067DQT0	4	29,05	gamma-glutamyltranspeptidase 1-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EBP8	2	13,75	GDSL esterase lipase At5g18430-like	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067D2K4	6	63,30	glucan endo-1,3-beta- basic isoform-like isoform X3	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DH23	5	44,41	glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like isoform X2	UP	DOWN	DOWN
O23783	6	63,13	glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like isoform X2	UP	UNCHANGED	UP
A0A067DGN9	7	40,38	glucose-6-phosphate 1- cytoplasmic isoform	UNCHANGED	UP	UP

Tabela 2: Continuação

Accession	Número de peptídeo	Score ^d	Descrição Blast2GO	BAmV/FLU ^a	FLU/EXP ^a	BAmV/EXP ^a
A0A067G688	2	10,96	glucose-6-phosphate 1-epimerase	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EMA8	7	68,05	glutamate dehydrogenase 1	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067FAN6	4	24,83	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase chloroplastic-like	DOWN	UP	UNCHANGED
A0A067E6Y0	5	53,57	glutamine synthetase nodule isozyme	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067GMN3	2	12,63	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit chloroplastic mitochondrial	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067F173	8	52,12	glutathione cytosolic	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067HGY2	2	18,23	glutathione S-transferase-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067GBU7	4	25,45	Glutelin type-A 1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FJ44	21	190,15	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase chloroplastic	UP	UNCHANGED	UP
A0A067FKZ9	4	32,10	glycerate dehydrogenase	UP	UNCHANGED	UP
A0A067FL53	3	26,25	glycerate dehydrogenase	DOWN	UP	UNCHANGED
A0A067DUF7	3	22,09	glycine cleavage system H mitochondrial	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067EW54	2	10,56	glycine--tRNA mitochondrial 1-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067H4C3	2	10,70	glycogen synthase kinase-3 homolog -3	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067GFF5	8	54,50	Glycosyl hydrolases family 31 isoform 1	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067EAX1	4	30,51	glyoxylate succinic semialdehyde reductase 1-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067HCZ9	2	11,69	Golgi SNAP receptor complex member 1-2	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067E7C3	6	57,63	guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EN97	16	187,38	heat shock 70 kDa	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EJK1	18	209,63	heat shock 70 kDa	DOWN	UP	UNCHANGED
A0A067E7Q5	8	62,12	heat shock 70 kDa 15-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067FKP0	16	140,89	heat shock 70 kDa mitochondrial	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067G9H4	7	41,41	heat shock 83	UP	UNCHANGED	UP
A0A067F0T0	8	54,73	heat shock 83	UNCHANGED	UP	UP
A0A067G490	5	34,66	heat shock 90-1	UNCHANGED	UP	UP
A0A067DI64	26	307,48	heat shock cognate 70 kDa 2	UNCHANGED	UP	UNCHANGED
A0A067FND2	24	260,32	heat shock cognate 70 kDa 2	UNCHANGED	UP	UNCHANGED
A0A067G494	3	19,12	heat shock family	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067F4L3	9	65,59	Heat shock isoform 2	UNCHANGED	UP	UNCHANGED
A0A067E2Z5	2	12,71	heme-binding 2	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GAQ3	6	63,85	hypersensitive-induced response 1	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067H5H1	12	112,90	hypersensitive-induced response 2	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FQI0	2	11,95	hypothetical protein CICLE_v10006597mg	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067H6E9	4	22,40	hypothetical protein CICLE_v10021650mg	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067E5W4	2	10,59	hypothetical protein CISIN_1g000037mg	UP	DOWN	DOWN
A0A067FW00	2	10,75	hypothetical protein CISIN_1g011452mg	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED

Tabela 2: Continuação

Accession	Número de peptídeo	Score ^d	Descrição Blast2GO	BAmV/FLU ^a	FLU/EXP ^a	BAmV/EXP ^a
A0A067DLP5	2	18,02	hypothetical protein CISIN_1g041193mg, partial	UP	UNCHANGED	UP
A0A067EUE0	3	32,96	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 4	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EWB9	4	24,35	isocitrate dehydrogenase [NADP]	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DU62	11	91,94	isocitrate dehydrogenase [NADP]	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DGL8	3	21,61	isoflavone reductase homolog	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EH80	8	63,28	ketol-acid chloroplastic-like	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067FPT2	7	52,42	ketol-acid chloroplastic-like	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067GJX2	3	18,88	KH domain-containing isoform 1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GS71	2	12,83	lactoylglutathione lyase	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EHS2	3	19,90	L-ascorbate oxidase homolog	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067HB21	7	55,84	L-ascorbate oxidase homolog	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067GS84	4	26,97	L-ascorbate oxidase homolog	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067FJR6	2	12,57	L-ascorbate oxidase-like	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A067E7B9	13	117,57	Late embryogenesis abundant group 2 isoform 1	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EWI3	15	131,54	leucine aminopeptidase 1-like	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067EZF4	2	22,72	lipxygenase homology domain-containing 1-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GSQ9	3	16,34	lon protease homolog mitochondrial-like	UP	UNCHANGED	UP
A0A067DW97	2	11,02	lysine-specific demethylase JM125-like isoform X1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067HAT5	4	22,04	Lysine-specific histone demethylase 1 isoform 3	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067GGH1	2	10,52	lysosomal Pro-X carboxypeptidase	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GQV1	3	16,29	magnesium-chelatase subunit chloroplastic	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0FIJ6	2	11,99	major allergen Pru ar 1	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067ENV0	13	103,87	malate chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EQX8	17	187,39	malate dehydrogenase	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067E8N4	4	35,45	malate dehydrogenase [NADP] chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FP57	12	111,85	malate glyoxysomal	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067GGE4	10	99,75	malate glyoxysomal	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067DZT7	17	195,91	malate mitochondrial	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067E0C7	2	11,30	methyl- -binding domain-containing 11	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067E511	4	30,71	microtubule-associated TORTIFOLIA1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DTT4	5	41,49	mitochondrial carnitine acylcarnitine carrier	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067ETA2	6	41,02	mitochondrial dicarboxylate tricarboxylate transporter DTC	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067FCZ3	13	127,12	monodehydroascorbate reductase	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067G9H8	8	72,30	Monodehydroascorbate reductase 6 isoform 1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067G8M8	6	37,04	monothiol glutaredoxin-S17	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FGF8	2	11,86	Multipolar spindle isoform 1	UNCHANGED	UP	UP

Tabela 2: Continuação

Accession	Número de peptídeo	Score ^d	Descrição Blast2GO	BAmV/FLU ^a	FLU/EXP ^a	BAmV/EXP ^a
A0A067E1D6	4	28,35	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily	DOWN	DOWN	DOWN
A0A067D6B2	2	12,26	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit mitochondrial	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GNP6	4	24,04	NADH-cytochrome b5 reductase	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FVJ9	12	84,25	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EWD4	8	65,16	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067E9P2	6	55,38	NADP-dependent malic enzyme	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FTJ6	17	160,35	NADP-dependent malic enzyme	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067F2E7	10	82,46	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha 1	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067E3L1	4	22,52	Nuclear receptor corepressor 1	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067H2C0	3	38,99	nuclear transport factor 2	DOWN	DOWN	DOWN
A0A067GD27	2	26,47	nucleoside diphosphate kinase chloroplastic mitochondrial	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067GSY7	2	17,24	nudix hydrolase 2-like	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DC18	2	16,36	pathogenesis-related 1-like	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067ET50	2	12,81	pathogenesis-related PR-4-like	UP	UP	UP
A0A067GYQ8	8	76,94	PDI-like 1-1 isoform 2	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067FPY4	4	30,88	pentatricopeptide repeat-containing chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067G127	2	19,48	peptide methionine sulfoxide reductase-like	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
D0ELH5	4	42,59	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A067F2Y3	3	24,79	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP95-like isoform X1	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DWK9	2	12,82	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP12	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GGE6	11	101,12	perakine reductase-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067EXH3	4	41,19	peroxidase 3	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FC21	2	14,14	peroxiredoxin- chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067G5C3	2	14,04	peroxiredoxin- mitochondrial	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GF36	12	73,83	peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067EHM7	5	45,20	phenylalanine ammonia-lyase	DOWN	UP	UNCHANGED
Q09MH8	2	12,57	photosystem I P700 chlorophyll a apo A1 (chloroplast)	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067GQ73	6	48,75	photosystem I reaction center subunit chloroplastic	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A8C183	9	75,87	photosystem I reaction center subunit chloroplastic	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DY12	3	39,01	photosystem I reaction center subunit chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067EHB6	2	13,09	photosystem I reaction center subunit chloroplastic isoform X2	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067E1L7	7	87,62	photosystem II oxygen-evolving complex 2 precursor	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067G393	2	12,11	plant intracellular Ras-group-related LRR 6	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GC77	3	24,78	plasma membrane-associated cation-binding 1	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GF90	8	68,10	plastid-lipid-associated chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067ERD7	3	16,52	polyadenylate-binding 1-like	UNCHANGED	UNCHANGED	UP

Tabela 2: Continuação

Accession	Número de peptídeo	Score ^d	Descrição Blast2GO	BAmV/FLU ^a	FLU/EXP ^a	BAmV/EXP ^a
A0A067GWW9	4	23,51	polyadenylate-binding 2-like	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067F5I2	2	11,43	polyadenylate-binding RBP45C	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DI65	5	35,24	primary amine oxidase-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FGQ9	5	42,20	probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like mitochondrial	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067G9F1	2	20,97	probable 3-hydroxyisobutyrate mitochondrial isoform X1	UP	DOWN	DOWN
A0A067DPY7	9	80,49	probable aldo-keto reductase 1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067E1E0	6	49,31	probable aldo-keto reductase 1	UNCHANGED	UP	UP
A0A067E229	9	68,76	probable aldo-keto reductase 2	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067DWU8	2	19,02	probable aminotransferase TAT2	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067E1I1	6	49,16	probable aquaporin PIP2-5	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FPM4	2	15,57	probable aquaporin PIP2-8	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067E7T3	2	11,10	probable BOI-related E3 ubiquitin- ligase 3	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DXK2	2	18,30	probable disease resistance At4g27220	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067DTY3	2	18,30	probable fructokinase- partial	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GAY2	10	98,24	probable fructose-bisphosphate aldolase chloroplastic	UNCHANGED	DOWN	UNCHANGED
A0A067EYK0	2	18,69	probable linoleate 9S-lipoxygenase 5	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FZE4	10	86,70	probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067DLL8	2	12,92	probable N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067G7T3	6	68,51	probable NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like 1	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067EEC0	4	39,25	prohibitin- mitochondrial	UP	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067FEH4	6	59,79	proteasome subunit alpha type-2-A	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067F6L3	9	85,48	proteasome subunit alpha type-5	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FIM2	7	60,51	proteasome subunit beta type-6	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067GR98	3	19,97	proteasome subunit beta type-7-A	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A8C1B5	10	83,34	PSI reaction center subunit II	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067HFZ1	2	10,57	pto-interacting 1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GC96	8	48,36	puromycin-sensitive aminopeptidase isoform X1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GSR5	2	12,94	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067EJS7	4	35,94	pyruvate cytosolic isozyme-like	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067FCR0	9	69,37	pyruvate cytosolic isozyme-like	UNCHANGED	UP	UP
A0A067HFF5	3	17,55	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha- chloroplastic-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GTU5	7	58,71	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta- mitochondrial isoform X1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FF92	3	19,76	quinone-oxidoreductase chloroplastic	DOWN	DOWN	DOWN
A0A067FGZ6	3	26,10	ras-related Rab11C-like	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067ED19	10	92,26	ras-related Rab7	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067GDU7	3	20,30	ras-related RABA1f	UNCHANGED	DOWN	DOWN

Tabela 2: Continuação

Accession	Número de peptídeo	Score ^d	Descrição Blast2GO	BAmV/FLU ^a	FLU/EXP ^a	BAmV/EXP ^a
A0A067GFI3	4	36,19	ras-related RABA5a	UNCHANGED	UP	UP
A0A067GV11	2	20,57	ras-related RABC1	UP	DOWN	UNCHANGED
A0A067DDK0	2	12,03	ras-related RABH1b	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067DGX6	2	11,27	regulatory NPR4-like isoform X1	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067F496	2	21,42	ribose-phosphate pyrophosphokinase 4	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EN64	23	263,76	ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic-like	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
Q09MH0	27	392,46	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (chloroplast)	UNCHANGED	UP	UP
A0A067FJH1	2	16,62	RING-H2 finger ATL46-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FGN2	2	10,86	RNA binding	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067F2Q5	3	16,94	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067HG06	7	52,81	S-adenosylmethionine synthase 1	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067EX15	2	10,68	scarecrow-like transcription factor PAT1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GZ84	11	115,65	SEC14 cytosolic factor family phosphoglyceride transfer family isoform 1	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067E0P7	6	38,24	selenium-binding 1-like	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067F5T8	2	11,09	septin and tuftelin-interacting 1 homolog 1-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GG87	5	42,38	serine mitochondrial	UNCHANGED	UP	UP
A0A067GRH7	10	74,14	serine mitochondrial-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067FRX2	2	10,50	serine threonine- kinase chloroplastic	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DSF4	5	32,08	serine threonine- phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FP73	5	29,68	soluble inorganic pyrophosphatase chloroplastic-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EYB2	7	49,43	sorbitol dehydrogenase	UP	UNCHANGED	UP
A0A067EYA6	8	49,76	sorbitol dehydrogenase	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067ES77	5	27,43	SSUH2 homolog	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067GV93	2	13,22	subtilisin-like protease	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067FB34	12	93,93	succinyl- ligase [ADP-forming] subunit mitochondrial	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067G5D9	6	36,66	sucrose synthase Sus1	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067EIW0	3	21,74	superkiller viralicidic activity 2-like 2	UP	UNCHANGED	UP
A0A067FAS0	5	70,39	superoxide dismutase [Cu-Zn] chloroplastic	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067H4Q1	3	18,15	synaptotagmin-5	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GZI6	2	17,44	T-complex 1 subunit beta	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067EIP1	5	30,57	T-complex 1 subunit theta	UP	UNCHANGED	UP
A0A067GA93	6	39,83	thiamine thiazole synthase chloroplastic	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067H221	3	24,15	thioredoxin chloroplastic	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067FZN4	2	11,25	thioredoxin reductase NTRB-like	DOWN	DOWN	DOWN
A0A067FEG0	3	24,48	thiosulfate 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase mitochondrial isoform X1	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067H6P9	2	11,45	thylakoid lumenal 19 kDa chloroplastic	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN

Tabela 2: Continuação

Accession	Número de peptídeo	Score ^d	Descrição Blast2GO	BAmV/FLU ^a	FLU/EXP ^a	BAmV/EXP ^a
A0A067GJ81	3	16,13	tocopherol chloroplastic	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EX46	5	44,74	transcription factor BTF3 homolog 4-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067EKQ8	2	11,72	Transducin family WD-40 repeat family isoform 5	UP	UP	UP
A0A067G915	3	23,44	TRANSPARENT TESTA GLABRA 1	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067FSY6	2	11,80	transport SEC13 homolog B	DOWN	DOWN	DOWN
A0A067GTM0	2	10,80	trihelix transcription factor GT-1-like isoform X2	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DN09	5	54,17	triosephosphate chloroplastic	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FZN5	6	53,85	triosephosphate cytosolic	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067EU40	21	301,65	tubulin alpha-3 chain	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067EM78	11	145,14	tubulin alpha-3 chain-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067ERY9	27	280,25	tubulin beta-5 chain	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067DC54	3	18,84	two-component response regulator ARR22	UNCHANGED	UP	UP
A0A067GVC7	2	11,32	Two-component response regulator ARR4	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067GV77	4	43,93	ubiquitin partial	UNCHANGED	UP	UP
A0A067FUV8	4	23,63	ubiquitin receptor RAD23c-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067FAT6	8	60,14	ubiquitin-activating enzyme E1 1-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067DSW2	5	39,52	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 35	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067GA95	2	12,53	UDP-arabinopyranose mutase 1	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067FZI2	3	18,43	UDP-glucose 6-dehydrogenase 1	UNCHANGED	UNCHANGED	UP
A0A067EHN5	3	16,78	UDP-glucose 6-dehydrogenase 1-like	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FWZ1	2	20,42	universal stress A	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067GJW3	6	44,52	universal stress PHOS32-like	DOWN	UNCHANGED	DOWN
A0A067ETX1	17	135,51	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UNCHANGED	DOWN	DOWN
A0A067GMU4	2	10,98	vacuolar processing enzyme	UP	UNCHANGED	UP
A0A067E4R2	2	12,29	vestitone reductase-like	DOWN	UNCHANGED	UNCHANGED
A0A067E3Q8	7	50,27	villin-3-like isoform X1	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN
A0A067FXK2	16	140,40	V-type proton ATPase subunit B2	UNCHANGED	UNCHANGED	DOWN

^a Razão entre os tratamento. ^b As proteínas foram classificadas como up-reguladas (UP) quando a razão foi de 2 ou superior e down-reguladas (DOWN) quando a razão foi de 0,5 ou inferior e proteínas não reguladas (UNCHANGED) quando a razão obteve valores no intervalo de 0,6 a 1,9. ^c Proteína única entre dois tratamentos. ^{*} Proteínas que não obtiveram notação funcional pelo software Blast2Go PRO v 3.0. ^d Os scores foram calculadas pelo Progenesis QI.

Foi realizada a classificação funcional das 346 proteínas diferencialmente abundantes (up e down-reguladas) nos tratamentos, os quais foram analisados número de proteínas diferencialmente abundantes em cada função biológica (Figura 6), comparando-se as brotações mantidas durante 45 dias sob lâmpadas de LED BAmV e fluorescente (BAmV/FLU), brotações mantidas em LED BAmV comparado com o explante inicial (BAmV/EXP) e brotações mantidas sob lâmpada fluorescente comparado com o explante inicial (FLU/EXP).

Em brotações mantidas sob lâmpadas de LED BAmV e fluorescente (BAmV/FLU) verificou-se que a maior quantidade de proteínas up-reguladas está relacionada com processos metabólicos primários (15 proteínas) e metabólicos de substâncias orgânicas (15 proteínas). Das proteínas down-reguladas 54 estão relacionadas com processos metabólicos de organismo único na comparação BAmV/FLU (Figura 6A).

Comparando-se as brotações obtidas em lâmpada fluorescente e o explante inicial (FLU/EXP) verificou-se a predominância de proteínas up-reguladas (15) relacionadas com processos metabólicos de organismo único, enquanto 26 proteínas down-reguladas estão associadas com processos metabólicos primários, bem como em processos metabólicos de substâncias orgânicas (26 proteínas) (Figura 6B).

Comparando-se as brotações obtidas em lâmpada de LED BAmV com o explante inicial (comparação BAmV/EXP) verificou-se a predominância de proteínas up (28 proteínas) e down-reguladas (88 proteínas) relacionadas com processos metabólicos de substâncias orgânicas (Figura 6C).

De forma geral, pode-se observar que a maior parte das proteínas diferencialmente abundantes foram down-reguladas nas diferentes funções biológicas classificadas, e para as três comparações utilizadas (Figura 6).

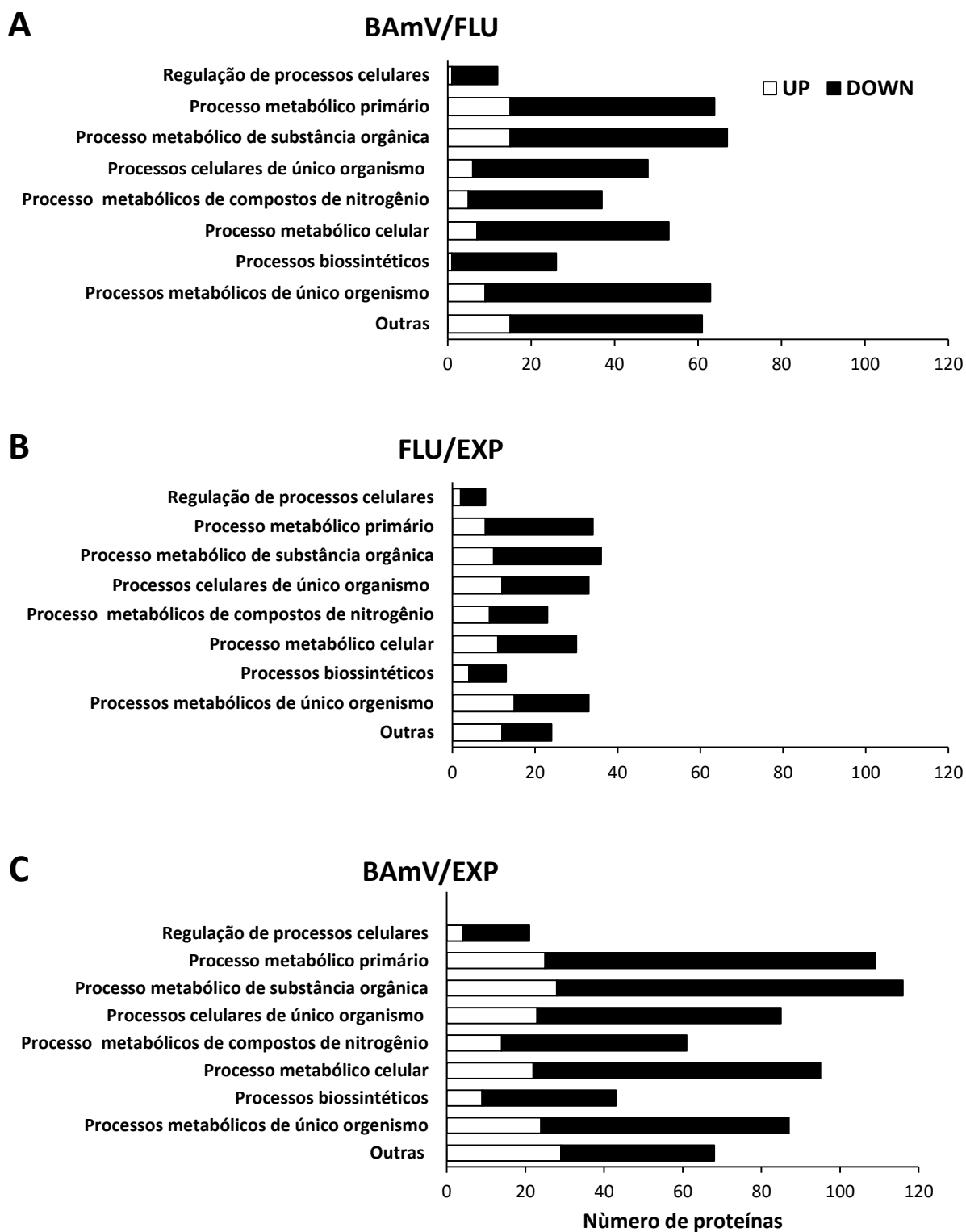


Figura 6: Número de proteínas up e down-reguladas classificadas em diferentes processos biológicos, comparando-se as brotações obtidas sob lâmpadas de LED BAmV e fluorescente (BAmV/FLU) (A), brotações obtidas na lâmpada fluorescente (FLU) e explantes (EXP) iniciais (FLU/EXP) (B), e brotações obtidas em lâmpadas de LED BAmV e explantes (EXP) iniciais (BAmV/EXP) (C).

4. DISCUSSÃO

Verificou-se que a qualidade e quantidade da luz afeta o desenvolvimento das brotações de *C. fissilis*, com alterações significativas no alongamento das brotações (Figuras 2A e 3) comparando-se os diferentes tipos de lâmpadas de LED e a fluorescente usadas (Tabela 1). Os melhores resultados foram observados sob os tratamentos BAmV e BAmVVd para segmentos nodais cotiledonares com presença de BA, ambos apresentam espectros de luz azul médio (Am) e vermelho (V) sugerindo a importância destes espectros e quantidade de luz (quantidade média de luz azul) para a morfogênese *in vitro* de *C. fissilis* (Figuras 2A e 3). Processos do desenvolvimento vegetal são afetados pela variação do vermelho e azul, como promoção do crescimento em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) (Jishi et al., 2016) e no alongamento de entrenós em brotações de diferentes genótipos de videira (*Vitis riparia* x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon; *V. ficifolia* var. Ganebu - nativa do Japão e *V. vinifera* cv. Muscat of Alexandria) (Poudel et al., 2008). Ademais, estas alterações podem ser decorrentes da interação entre a qualidade e quantidade de luz e a interação com vias hormonais (Chory et al., 1994; Neff et al., 2006; Sibout et al., 2006 Lau e Deng, 2010). Neste sentido, pode-se sugerir uma interação entre os espectros de luz azul e vermelho da lâmpada de LED BAmV com presença da citocinina BA ao meio de cultura, pois esta combinação foi fundamental para o maior alongamento das brotações obtidas em segmentos nodais cotiledonares (Figura 2A).

Estudos mostram os mecanismos moleculares de interação de luz e hormônios convergindo em vias semelhantes para a promoção da fotomorfogênese em plantas (Lau e Deng, 2010). A relação da luz com os reguladores de crescimento como a citocinina tem papel fundamental na promoção da fotomorfogênese (Nemhauser, 2008; Chory et al., 1994). Em *Arabidopsis*, a luz azul em interação com fotorreceptores criptocromo demonstrou uma ligação entre a via de sinalização com citocinina para a regulação positiva da fotomorfogênese, em que atuaram reduzindo a expressão do gene COP1, possibilitando a promoção da fotomorfogênese (Vandenbussche et al., 2007). Os genes *COP/DET/FUS* estão intimamente associados à fotomorfogênese em plantas, atuando como os

principais reguladores negativos neste processo (Wei e Deng, 1996; Wang et al., 2001).

Adicionalmente, estudos têm mostrado o efeito de uso de lâmpadas de LED com espectros específicos de luz nas respostas morfogênicas *in vitro* de plantas. Efeitos da combinação de vermelho e azul, com uso de lâmpadas de LED, tem sido descrito para várias espécies, como para *Lilium* oriental híbrido 'Pesaro', obtendo maior crescimento de bulbos (Lian et al., 2002). Similarmente, em *Fragaria x ananassa* Duch. foi verificado o melhor desenvolvimento *in vitro* de brotações quando mantidas em lâmpadas de LED com 30% de azul e 70% de vermelho (Hung et al., 2015). Na propagação *in vitro* de mudas de *Musa acuminata* (AAA), foi investigado o efeito de lâmpadas de LED em espectros de luz vermelho e branco, isolados ou em conjunto, comparativamente à lâmpada fluorescente (Vieira et al., 2015). Estes autores mostraram que diferenças na qualidade de radiação espectral das lâmpadas de LED influenciou a maior concentração de clorofila em comparação com lâmpadas fluorescentes.

Adicionalmente, em *Musa* spp. também foi mostrado a necessidade da combinação dos diferentes espectros de luz para o crescimento das plantas, sendo demonstrado anormalidade das mudas desenvolvidas *in vitro* quando cultivadas com ausência de luz azul (Nhut et al., 2001). Por outro lado, em *Oncidium* 'Gower Ramsey' foi mostrado que a utilização de lâmpadas de LED com espectro de luz vermelho promoveu maior desenvolvimento das plantas, bem como maior acúmulo de carboidratos (Mengxi et al., 2011).

Neste sentido, pode-se sugerir que os comprimentos de onda com espectros de luz na faixa do azul e vermelho, atuem em conjunto na sinalização para a morfogênese, havendo uma maior efetividade no alongamento de brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares em *C. fissilis*.

A adição de BA ao meio de cultura promoveu o maior alongamento de brotações quando utilizado segmentos nodais cotiledonares, comparativamente aos apicais, em decorrência de maior concentração endógena de carboidratos e da poliamina Putrescina (Aragão et al., 2016). No presente estudos, a combinação do espectro de luz com azul e vermelho possibilitou o alongamento (Figura 2A) e maiores valores de matéria fresca e seca (Figura 4) em brotações obtidas a partir de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura com BA. Estudos futuros visando estudar o conteúdo endógeno de poliaminas e carboidratos, assim

como de auxina e citocinina nestas brotações mantidas em lâmpada de LED BAmV e fluorescente são fundamentais para entender o papel da luz na sinalização endógena destes compostos com a resposta morfogênética *in vitro*.

Em *C. fissilis*, verificou-se que a qualidade e quantidade dos espectros de luz com 12-14 % de azul e sua combinação com 30-50 % de vermelho (LED BAmV) propiciou um aumento dos valores de matéria fresca e seca nas brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares quando mantidos em meio de cultura com BA (Figura 3). Estes resultados estão de acordo com estudos que demonstraram melhorias na produção de mudas *in vitro* sob LED, como em mudas de bananeira oriundas de brotações cultivadas *in vitro* apresentaram maior peso fresco total quando incubadas sob lâmpadas de LED com 80% de vermelho em conjunto com 20% de azul (Nhut et al., 2000). Similarmente, em morangueiro, o maior crescimento avaliado pela matéria fresca das brotações cultivadas *in vitro* foi obtido na lâmpada de LED contendo a combinação de 70% de vermelho e 30% de azul (Nhut et al., 2003). Neste sentido, é verificado que não só a qualidade (diferentes espectros), mas também a quantidade destes espectros de luz é determinante para a resposta morfogênética *in vitro*.

A qualidade e quantidade de luz afetou também as proteínas diferencialmente abundantes durante o desenvolvimento de brotações de *C. fissilis* (Tabela 2, Figuras 5).

O grupo funcional de proteínas do metabolismo primário tem associação em diversas vias de metabolismo em plantas como, reações químicas envolvendo vias dos processos anabólicos e catabólicos (Denison et al., 2011). Dentro deste grupo funcional, foi identificada a proteína 14-3-3 (A0A067FB32) (Tabela 2), a qual foi up-regulada em brotações mantidas sob lâmpadas de LED BAmV e fluorescente em comparação com o explante inicial (segmento nodal cotiledonar). Este resultado sugere que esta proteína aumentou a sua abundância durante a cultura do explante *in vitro* até a obtenção da brotação, e pode estar associada, conseqüentemente, ao maior alongamento das brotações a partir de segmentos nodais cotiledonares de *C. fissilis* incubados na lâmpada de LED BAmV comparativamente a fluorescente. A proteína 14-3-3 é considerada regulador chave de inúmeros processos metabólicos, que vão desde a mitose a apoptose de células (Rosenquist et al., 2000). Entre os papéis desempenhados por 14-3-3 são descritas interações com reguladores de crescimento, com envolvimento na sinalização transcricional de

repressores da biossíntese de giberelinas (GA) em *Nicotiana tabacum* L. (Igarashi et al., 2001; Ishida et al., 2004), bem como, atuação na sinalização de brassinosteróides (BR), em arroz (*Oryza sativa* L.) (Bai et al., 2007). Proteínas 14-3-3 interagem com uma vasta variedade de enzimas envolvidas no metabolismo primário e biossíntese energética em plantas, incluindo àquelas relacionadas com o metabolismo de carbono (Comparot et al., 2003). A superexpressão desta proteína em plantas transgênicas de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) promoveu um efeito significativo no acúmulo de açúcares solúveis nas folhas, e demonstrando também interações no conteúdo de catecolaminas em possível associação com atividade de tirosina hidroxilase, ambas envolvidas no processo de geração de energia (Prescha et al., 2001). Deste modo, pode-se sugerir o envolvimento desta proteína na geração de energia possivelmente modulado pelos espectros de luz específicos da lâmpada de LED BAmV, em que influenciou a regulação positiva da proteína 14-3-3 em comparação com os demais tratamentos (Tabela 2), resultando em maior alongamento das brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares em *C. fissilis* (Figura 2A).

Proteínas classificadas a processos metabólicos de organismo único foram observadas em brotações de *C. fissilis* (Figura 6). Dentro deste grupo, as proteínas relacionadas ao metabolismo de carbono foram up-reguladas, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NADP (A0A067FVJ9) (Tabela 2). As reações relacionadas ao metabolismo de carbono estão envolvidas com o metabolismo de carboidratos, o qual está relacionada com a energia adquirida pela fotossíntese e armazenada em forma de carboidrato em planta (Eveland e Jackson, 2011). A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NADP (A0A067FVJ9) (Tabela 2) é uma enzima relacionada ao metabolismo de carbono, que apresenta uma função chave na fotossíntese (Leegood, 1996) e importante meio de geração de NADPH para as reações biossintéticas (Boyd et al., 1995). Estudos relatam que a indução desta enzima é influenciada pela luz (Muller, 1970). Em mudas de *Nicotiana tabacum* L. (Shih e Goodman, 1988) e *Arabidopsis* (Dewdney et al., 1993; Chan et al., 2002) foi mostrado maior expressão dos genes precursores destas proteínas pela influência de luz azul e vermelho. No presente estudo, esta proteína foi up-regulada em brotações mantidas sob lâmpada de LED BAmV, com azul e vermelho, comparando-se com as brotações incubadas sob luz fluorescente (FLU) (Tabela 2).

Deste modo, sugere-se que a maior abundância desta proteína observada em brotações de *C. fissilis* mantidas na lâmpada de LED BAmV poderá, possivelmente, estar atuando na demanda energética requerida para o maior alongamento de brotações nos segmentos nodais cotiledonares (Figuras 2A e 3).

Outra proteína relacionada ao metabolismo de carbono, a Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) (Q09MH0), neste trabalho foi relacionada a processos metabólicos celulares (Figura 6). Esta proteína apresentou regulação positiva nas brotações mantidas sob lâmpada de LED BAmV e fluorescente em comparação com os explantes iniciais (segmentos nodais cotiledonares antes da incubação) (Tabela 2). É a proteína mais abundante na natureza, atuando no ciclo de Calvin no primeiro passo para a fixação do carbono, assimilando o CO₂, pela carboxilação de ribulose-1,5-bisfosfato durante a fotossíntese em plantas e outros organismos fotossintéticos (Ellis, 1979). Esta proteína possui duas subunidades grande e pequena (Knight et al., 1990), em que a subunidade grande foi up-regulada em brotações de *C. fissilis* obtidas sob lâmpada de LED BAmV em comparação aos explantes iniciais (Tabela 2). Em *Phaseolus vulgaris* L., *Beta vulgaris* L., e *Spinacia oleracea* L., foi demonstrado que mudanças na radiação e a densidade de fluxo de fótons em espécie de *Alocasia macrorrhiza* L. têm influência direta na regulação da atividade de RuBisCO (Kobza e Seemann, 1989; Seemann et al., 1988). A regulação gênica desta proteína está correlacionada a luz, conforme demonstrado em estudos em *Lycopersicon esculentum* Mill. (Wanner e Gruissem, 1991) e *Arabidopsis* (Chang et al., 2016). Genes *RBCs*, que codificam a subunidade pequena de RuBisCO, apresentam regulação por incidência de luz azul e vermelha em mudas estioladas de *Arabidopsis*, sendo observado níveis mais elevados de RNAm de *RBCs* (Dedonder et al., 1993). Neste sentido, pode-se sugerir que a lâmpada de LED BAmV possa ter influenciado a maior expressão destes *RBCs* em brotações de *C. fissilis*, e conseqüentemente aumentado a abundância da proteína RuBisCO (Tabela 2), acarretando no maior alongamento das brotações.

Importantes enzimas do metabolismo de nitrogênio, com função biológica relacionada a processos de biossintéticos (Figura 6), foram up-reguladas, como a enzima glutamina sintetase (GS) (A0A067E6Y0) (Tabela 2). Esta proteína é predominantemente encontrada em tecidos clorofilados, como os foliares (Edwards et al., 1990), e é considerada a principal enzima responsável na assimilação da

amônia (Mifflin e Lea, 1976). Esta enzima tem papel fundamental na assimilação de nitrogênio em plantas, com interações importantes em processos de fotossíntese, influência na composição de aminoácidos e biossíntese de proteínas (Sauer et al., 1987; Guan et al., 2016). Estudos em plântulas estioladas de *Pisum sativum* L. mostraram que a luz afetou a expressão de RNAm de GS (Edwards e Coruzzi, 1989). Neste sentido, a maior expressão desta enzima em brotações de *C. fissilis* mantidas em lâmpadas de LED BAmV, contendo azul médio e vermelho, pode ter possibilitado maior disponibilidade de esqueletos carbônicos para incorporar o nitrogênio inorgânico, resultando em crescimento pelo alongamento (Figura 2) e conseqüentemente, acúmulo de matéria seca (Figura 4). Adicionalmente, a enzima GS também está associada a proteína 14-3-3, que tem atuação no metabolismo de carbono (Comparot et al., 2003) e envolvida no processo de geração de energia (Prescha et al., 2001). Em estudos com *Brassica napus* L. foi demonstrado que a proteína 14-3-3 é uma molécula ativadora de GS pós-traducional, sendo influenciadas pela luz (Finnemann e Schjoerring, 2000). Assim, a maior abundância destas proteínas pode ser decorrente da atuação no metabolismo de carbono e nitrogênio em brotações de *C. fissilis* mantidas em lâmpada de LED BAmV (Tabela 2), resultando em maior alongamento destas comparativamente com àquelas mantidas na lâmpada fluorescente (Figura 2A).

A manutenção de proteínas nas suas conformações funcionais é particularmente importante para a sobrevivência das células sob estresse, da qual uma grande família de proteínas desempenha papéis chave nesta manutenção, as chaperonas (Jakob et al., 1993). As proteínas heat shock (HSPs) são responsáveis pela conformação, translocação e degradação de proteínas (Wang et al., 2004), impedindo a desnaturação irreversível (Haslbeck e Vierling, 2015). Várias proteínas HSPs, como Heat shock 70 (A0A067DI64), Heat shock 90 (A0A067G490), e a Heat shock 83 (A0A067F0T0) (Tabela 2) foram up-reguladas diferencialmente em brotações obtidas sob lâmpadas de LED BAmV e fluorescente (FLU), em que foram classificadas funcionalmente em processos metabólicos de organismo único (Figura 6). A Heat shock 83 (A0A067F0T0) apresentou maior regulação positiva em brotações sob lâmpadas fluorescente (FLU) e em brotações sob lâmpada de LED BAmV, comparativamente aos explantes iniciais. Estes resultados mostram o aumento da abundância desta proteína ao longo do cultivo *in vitro* especialmente em brotações mantidas sob lâmpadas fluorescentes, as quais podem fornecer

maior calor às culturas *in vitro* comparativamente à lâmpada de LED. Estas proteínas podem desempenhar um papel crucial na proteção das plantas no controle de estresse de temperatura e estresse oxidativo, restabelecendo a conformação normal da proteína, portanto, a homeostase celular (Haslbeck e Vierling, 2015). Genes das famílias de HSPs foram induzidos com a exposição a ambiente com grande luminosidade, elevando as condições oxidante nas plantas de *Arabidopsis* (Rossel et al., 2002).

Ainda no grupo funcional de proteínas relacionadas a processos metabólicos de organismo único (Figura 6), várias proteínas de subunidade do centro de reações do fotossistema I (PSI) foram up-reguladas, como subunidade do centro de reação do fotossistema I cloroplástica (A0A067GQ73) e subunidade do centro de reação do fotossistema I isoforma cloroplástica X2 (A0A067EHB6) (Tabela 2). A atuação desta classe de proteínas é notória nos crescimento e desenvolvimento de plantas (Fromme et al., 2001). Plantas transgênicas de *Arabidopsis* cresceram lentamente ou não completaram o desenvolvimento quando reduzido os níveis desta proteína, foram associadas a desorganização de tilacoides, incapacidade de transferência de energia para o fotossistema P700, assim comprometendo o desenvolvimento das plantas que não conseguiram sobreviver sem a presença desta proteína (Haldrup et al., 2000). Outra importante proteína do PSI, a fotossistema I P700 clorofila *a* apoproteína A1 (cloroplasto) (PsaA) (Q09MH8), também foi up-regulada. Esta é uma das múltiplas proteínas que compõem o complexo de subunidades do PSI, atuando como principais mediadoras da transferência de elétrons (Fromme et al., 2001), e absorve luz vermelho, entre 662 a 677 nm (Shiozawa et al., 1974). Esta proteína foi up-regulada nas brotações de *C. fissilis* obtidas em lâmpadas de LED BAmV, comparativamente ao explante inicial (Tabela 2), sugerindo que esta seja uma proteína importante absorção de luz vermelha durante a organogênese *in vitro* desta espécie.

A Malato desidrogenase (MDH) é uma proteína da classe funcional em processos metabólicos primários (Figura 6). Esta proteína é uma enzima do metabolismo de carbono que catalisa reação reversível de conversão do oxaloacetato em malato, sendo considerada como uma enzima importante no equilíbrio de pH e movimento estomático (Miller et al., 1998) e importante na oxidação de NADH (Scheibe, 2004). Neste estudo, a proteína (A0A067E8N4) desta foi down-reguladas (Tabela 2). Estudos com transgênicos de *Solanum*

lycopersicum L. que exibem atividade reduzida desta enzima, foram relacionados a melhoria da assimilação de carbono, aumento no crescimento, bem como na matéria seca da parte aérea e fotossíntese elevada em relação os tipos selvagens (Nunes-Nesi et al., 2005). Estudos mostram relação da regulação da síntese desta proteína mediada pela luz (Scheibe, 1987). Sugerindo que a regulação negativa destas proteínas pode ter sido influenciada pelo espectro de luz BAmV (Tabela 1), favorecendo a assimilação de carbono, resultando em maior desenvolvimento e alongamento das brotações *C. fissilis* (Figura 4) em comparação com àquelas incubadas em lâmpada fluorescente (FLU).

Entre as proteínas analisadas verificou-se ausência de quatro proteínas, sendo duas proteínas (A0A067DE85, A0A067FQ63) ausentes em brotações obtidas em lâmpada de LED BAmV e outras duas proteínas (A0A067EWS6, A0A067H1W4) ausentes nos explantes iniciais (Tabela 2). Uma das proteínas ausentes nos tratamentos foi a proteína do tipo redutase 2- alquenais dependente de NADPH (A0A067DE85). Esta proteína está associada a estresse oxidativo (Dick et al., 2001), e atua na proteção de lesões foto-oxidativas em folhas de *Nicotiana tabacum* L (Mano et al., 2005). Estes autores observaram que o aumento da expressão desta proteína (100 a 250 vezes) em transgênico de tabaco resultou em menores danos significativos sob luz intensa. Possivelmente, o tratamento sob comprimentos de onda específicos fornecidos pela lâmpada de LED BAmV proporcione menor dano oxidativo para as culturas *in vitro* em brotações de *C. fissilis*, favorecendo o maior alongamento destas sob LED BAmV em contraste com lâmpada fluorescente (Figura 2). Esta hipótese está baseada no fato que a qualidade e intensidade da luz pode influenciar na composição de substâncias antioxidantes e resistência a foto-oxidação pela regulação da expressão diferencial de proteínas (Stutte et al., 2009; Lv et al., 2016).

Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase 27 (XTHs) (A0A067H1W4) é membro de uma família de enzimas em plantas que apresentam atividade enzimática de hidrolisar ou transglicosilar resíduos de xiloglucanos (Rose et al., 2002), molécula que contribui para a rigidez da parede celular, ligando-se firmemente à microfibrilas de celulose (Takeda et al., 2002). A atividade de XTH endógena foi atribuída a um potencial ponto de controle para o alongamento celular em segmentos do caule em ervilha, em que a adição de longas cadeias de xiloglucanos afetou até 50% do crescimento do caule, e quando adicionado

oligossacarídeos de xiloglucanos, foi obtida resposta inversa (Takeda et al., 2002), atribuindo assim a ação semelhante da ação hidrólise de XHT. Comprovado a atuação desta enzima intimamente ligada a alterações morfológicas na parede celular e favorecendo o alongamento celular (Nishitani et al., 1992), esta proteína pode estar relacionada especificamente ao desenvolvimento das brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares em *C. fissilis* quando cultivadas em lâmpadas de LED BAmV ou fluorescente (FLU) e não observada no explante inicial antes da incubação no tratamento. Desta forma, sugere-se que esta proteína pode ser um potencial marcador para a aquisição de competência da morfogênese *in vitro* de *C. fissilis*, atuando no desenvolvimento das brotações, uma vez que foi encontrada nos tratamentos sob espectro de luz azul e vermelho fornecidas na lâmpada de LED BAmV e lâmpadas fluorescente (FLU) (Tabela 2).

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos na segunda parte deste trabalho pode-se concluir que:

- A lâmpada de LED com combinação de azul médio e vermelho (LED BAmV) possibilitou maior alongamento, matéria seca das brotações comparativamente às cultivadas em lâmpada fluorescente;
- Os segmentos nodais cotiledonares incubados em meio de cultura com citocinina BA apresentaram melhores respostas sob efeito da qualidade de luz no desenvolvimento de brotações comparativamente aos segmentos nodais apicais;
- O uso da lâmpada de LED BAmV afetou a abundância de proteínas em brotações comparativamente à lâmpada fluorescente e explante inicial;
- Proteínas 14-3-3 (A0A067FB32), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NADP (A0A067FVJ9), e subunidade do centro de reação do fotossistema I cloroplástica (A0A067GQ73) foram up-reguladas em brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares, e estão possivelmente associadas ao maior crescimento das brotações incubadas em lâmpadas de LED BAmV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, E. C. S. D. C., Xavier, A., Campos, W. O. (2004) Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X *E. urophylla* ST Blake. *Revista Árvore*, 28: 643-653.
- Aragão, V. P. M., de Souza Ribeiro, Y. R., Reis, R. S., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., Silveira, V., Santa-Catarina, C. (2016) *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124: 611-620.
- Bai, M. Y., Zhang, L. Y., Gampala, S. S., Zhu, S. W., Song, W. Y., Chong, K., Wang, Z. Y. (2007) Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 13839-13844.
- Balbuena, T. S., Jo, L., Pieruzzi, F. P., Dias, L. L., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Junqueira, M., Thelend, J. J., Shevchenko, A., Floh, E. I. (2011) Differential

- proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*, 72: 302-311.
- Biernaski, F. A., Higa, A. R., Silva, L. D. (2012) Genetic variability for juvenile characters of *Cedrela fissilis* Vell. Progenies: a subsidy for definition of seed collection zone. *Revista Árvore*, 36: 49-58.
- Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G., Hamilton, I. R. (1995) Sequence, expression, and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*, 177: 2622-2627.
- Britz, S. J., Sager, J. C. (1990) Photomorphogenesis and photoassimilation in soybean and sorghum grown under broad spectrum or blue-deficient light sources. *Plant Physiology*, 94: 448-454.
- Budiarto, K. (2010) Spectral quality affects morphogenesis on *Anthurium* plantlet during *in vitro* culture. *Agrivita*, 32: 234.
- Carvalho, D. C. D., Silva, A. L. L. D., Tanno, G. N., Purcino, M., Biasi, L. A. (2011) Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:108-114.
- Carvalho, P. E. R. (2003) *Espécies arbóreas brasileiras*. Colombo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1039p.
- Chan, C. S., Peng, H. P., Shih, M. C. (2002) Mutations affecting light regulation of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 130: 1476-1486.
- Chang, M. M., Li, A., Feissner, R., Ahmad, T. (2016) RT-qPCR demonstrates light-dependent AtRBCS1A and AtRBCS3B mRNA expressions in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Biochemistry and Molecular Biology Education*.
- Che, P., Gingerich, D. J., Lall, S., Howell, S. H. (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14: 2771-2785.
- Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T., Brenner, M. (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (*det* mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiology*, 104: 339-347.
- Colombo, A., Joly, C. (2010) Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology*, 70: 697-708.
- Comparot, S., Lingiah, G., Martin, T. (2003) Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 54: 595-604.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21: 3674-3676.
- Dedonder, A., Rethy, R., Fredericq, H., Van Montagu, M., Krebbers, E. (1993) *Arabidopsis rbcS* genes are differentially regulated by light. *Plant Physiology*, 101: 801-808.
- Demotes-Mainard, S., Péron, T., Corot, A., Bertheloot, J., Le Gourrierc, J., Pelleschi-Travier, S., Crespel, L., Morel, P., Huché-Théliier, L., Boumaza, R., Vian, A., Guérin, V., Leduc, N., Sakr, S. (2016) Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*, 121, 4-21.
- Deng, Z., Osés-Prieto, J. A., Kutschera, U., Tseng, T. S., Hao, L., Burlingame, A. L., Zhi-Yong, W., Briggs, W. R. (2014) Blue light-induced proteomic

- changes in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Proteome Research*, 13: 2524-2533.
- Denison, F. C., Paul, A. L., Zupanska, A. K., Ferl, R. J. (2011) September) 14-3-3 proteins in plant physiology. In *Seminars in cell & developmental biology*, 22: 720-727.
- Dewdney, J., Conley, T. R., Shih, M. C., Goodman, H. M. (1993) Effects of blue and red light on expression of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, 103: 1115-1121.
- Dick, R. A., Kwak, M. K., Sutter, T. R., Kensler, T. W. (2001) Antioxidative Function and Substrate Specificity of NAD (P) H-dependent Alkenal/one Oxidoreductase A NEW ROLE FOR LEUKOTRIENE B412-HYDROXYDEHYDROGENASE/15-OXOPROSTAGLANDIN 13-REDUCTASE. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 40803-40810.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., Sangwan, R. S. (2011) De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends in plant science*, 16: 597-606.
- Edwards, J. W., Coruzzi, G. M. (1989) Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *The Plant Cell*, 1: 241-248.
- Edwards, J. W., Walker, E. L., Coruzzi, G. M. (1990) Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 3459-3463.
- Ellis, R. J. (1979) The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences*, 4: 241-244.
- Eveland, A. L., Jackson, D. P. (2011) Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 63: 3367-3377.
- Finnemann, J., Schjoerring, J. K. (2000) Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *The Plant Journal*, 24: 171-181.
- Fromme, P., Jordan, P., Krauß, N. (2001) Structure of photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1507: 5-31.
- George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. J. (2008) Micropropagation: uses and methods. In *Plant propagation by tissue culture*, 29-64pp.
- Giri, C., Shyamkumar, B., Anjaneyulu, C. (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18: 115-135.
- Guan, M., de Bang, T., Pedersen, C., Schjoerring, J. K. (2016) Cytosolic glutamine synthetase Gln1; 2 is the main isozyme contributing to GS1 activity in *Arabidopsis* shoots and can be up-regulated to relieve ammonium toxicity. *Plant physiology*, pp-01195.
- Gupta, S. D., Jatothu, B. (2013) Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant biotechnology reports*, 7: 211-220.
- Haldrup, A., Simpson, D. J., Scheller, H. V. (2000) Down-regulation of the PSI-F subunit of photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana* The PSI-F subunit is essential for photoautotrophic growth and contributes to antenna function. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 31211-31218.

- Haslbeck, M., Vierling, E. (2015) A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of molecular biology*, 427: 1537-1548.
- Heringer, A. S., Reis, R. S., Passamani, L. Z., Souza-Filho, G. A., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2017) Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39: 52.
- Hochholdinger, F., Sauer, M., Dembinsky, D., Hoecker, N., Muthreich, N., Saleem, M., Liu, Y. (2006) Proteomic dissection of plant development. *Proteomics*, 6: 4076-4083.
- Hoenecke, M., Bula, R., Tibbitts, T. (1992) Importance of 'Blue' Photon Levels for Lettuce Seedlings Grown under Red-light-emitting Diodes. *HortScience*, 27: 427-430.
- Hung, C. D., Hong, C. H., Jung, H. B., Kim, S. K., Van Ket, N., Nam, M. W., Choi, D.H., Lee, H. I. (2015) Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs. *Scientia Horticulturae*, 194: 194-200.
- Igarashi, D., Ishida, S., Fukazawa, J., Takahashi, Y. (2001) 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *The Plant Cell*, 13: 2483-2497.
- Ishida, S., Fukazawa, J., Yuasa, T., Takahashi, Y. (2004) Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator REPRESSION OF SHOOT GROWTH by gibberellins. *The Plant Cell*, 16: 2641-2651.
- IUCN. International Union for Conservation of Nature. (2017) *IUCN red list of threatened species*, 2017. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/33928/0>>. Acesso em: 23 de janeiro de 2017.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., Buchner, J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 1517-1520.
- Jishi, T., Kimura, K., Matsuda, R., Fujiwara, K. (2016) Effects of temporally shifted irradiation of blue and red LED light on cos lettuce growth and morphology. *Scientia Horticulturae*, 198: 227-232.
- Knight, S., Andersson, I., Brändén, C. I. (1990) Crystallographic analysis of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution: Subunit interactions and active site. *Journal of molecular biology*, 215: 113-160.
- Kobza, J., Seemann, J. R. (1989) Regulation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activity in response to diurnal changes in irradiance. *Plant physiology*, 89: 918-924.
- Lau, O. S., Deng, X. W. (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current opinion in plant biology*, 13: 571-577.
- Lee, S. K., Rao, A. N. (1988) Plantlet production of *Swietenia macrophylla* King through tissue culture. *Gardens' Bulletin, Singapore*, 41: 11-18.
- Leegood, R. C. (1996) Primary photosynthate production: physiology and metabolism. *Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships*. Zamski, E. Schaffer, AA (Ed.), Marcel Dekker, New York, 21-42.
- Letunic, I., Bork, P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic acids research*, 44: 242-245.

- Li, H., Xu, Z., Tang, C. (2010) Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103: 155-163.
- Lian, M. L., Murthy, H. N., Paek, K. Y. (2002) Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. *Scientia Horticulturae*, 94: 365-370.
- Lv, C., Ma, J., Yuan, Z., Wang, Y., Chen, G., Gao, Z., Lv, C. (2016) Proteomics analysis of the photo-oxidation mutant 812HS rice ('*Oryza sativa* L.') exposed to high light intensity. *Plant Omics*, 9: 304.
- Mano, J. I., Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Inzé, D., Torii, Y., Hiraoka, E., Takimoto, K., Slooten, L., Asada, K., Kushnir, S. (2005) Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant physiology*, 139: 1773-1783.
- Massa, G. D., Kim, H. H., Wheeler, R. M., Mitchell, C. A. (2008) Plant productivity in response to LED lighting. *HortScience*, 43: 1951-1956.
- Mcmahon, M., Kelly, J. W., Decoteau, D. R., Young, R. E., Pollock, R. K. (1991) Growth of *Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura under various spectral filters. *Journal of the American Society for horticultural science*, 116: 950-954.
- Mengxi, L., Zhigang, X., Yang, Y., Yijie, F. (2011) Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106: 1-10.
- Miflin, B. J., e Lea, P. J. (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, 15: 873-885.
- Miller, S. S., Driscoll, B. T., Gregerson, R. G., Gantt, J. S., Vance, C. P. (1998) Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *The Plant Journal*, 15: 173-184.
- Mohebalipour, N., Aharizad, S., Mohammadi, S., Motallebiazar, A., Arefi, H. (2012) Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10: 280-286.
- Moura, T. L., Almeida, W. A. B., Madalena, B., Mendes, J., Filho, F. D. A. A. M. (2001) Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23: 240-245.
- Muller, B. (1970) On the mechanism of the light-induced activation of the NADP-dependent glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 205: 102-109.
- Vieira, L. N., Freitas Fraga, H. P., dos Anjos, K. G., Puttkammer, C. C., Scherer, R. F., da Silva, D. A., Guerra, M. P. (2015) Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA)'Nanicão Corupá'*in vitro* plantlets. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27: 91-98.
- Neff, M. M., Street, I. H., Turk, E. M., Ward, J. M. (2006) Interaction of light and hormone signalling to mediate photomorphogenesis. *Photomorphogenesis in Plants and Bacteria* (pp. 439-473). Springer Netherlands.
- Nemhauser, J. L. (2008) Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. *Current opinion in plant biology*, 11: 4-8.

- Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., Okamoto, K., Tanaka, M. (2003) Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 43-52.
- Nhut, D. T., Hong, L. T. A., Watanabe, H., Goi, M., Tanaka, M. (2000) Growth of banana plantlets cultured *in vitro* under red and blue light-emitting diode (LED) irradiation source. In *International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits* 575: 117-124.
- Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., Tanaka, M. (2001) Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (LED) on *in vitro* and subsequent growth of micropropagated banana plantlets. In *International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants*, 616: 121-127.
- Nicoli, P.M., Paivall, R., Nogueirall, R. C. Santanal, J. R. F., Silval, L. C., Silva, D. P. C., Porto, J. M. P. (2008) Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. *Ciencia Rural*, 38: 685-689.
- Nishitani, K., Tominaga, R. (1992) Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 21058-21064.
- Nunes, E. C., Castilho, C. V., Moreno, F. N., Viana, A. M. (2002) *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell tissue and Organ Culture*, 70: 259-268.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A. M., Loureiro, M. E., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., Fernie, A. R. (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology*, 137: 611-622.
- Olle, M., Viršile, A. (2013) The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. *Agricultural and Food Science*, 22: 223-234.
- Petrovská, B., Sebelá, M., Doležel, J. (2015) Inside a plant nucleus: discovering the proteins. *Journal of experimental botany*, 66: 1627-1640.
- Pijut, P. M., Beasley, R. R., Lawson, S. S., Palla, K. J., Stevens, M. E., Wang, Y. (2012) *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species – a review (2001–2011) *Propagation of Ornamental Plants*, 12: 25-51.
- Poudel, P. R., Kataoka, I., Mochioka, R. (2008) Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant cell, tissue and organ culture*, 92: 147-153.
- Prescha, A., Świędrych, A., Biernat, J., Szopa, J. (2001) Increase in lipid content in potato tubers modified by 14-3-3 gene overexpression. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49: 3638-3643.
- R Development Core Team. (2016) *The R Project for Statistical Computing*, Disponível em: < <https://www.r-project.org/> >. Acesso em: 03 de outubro de 2016.
- Reis, R. S., de Moura Vale, E., Heringer, A. S., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2016) Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *Journal of proteomics*, 130: 170-179.
- Rose, J. K., Braam, J., Fry, S. C., Nishitani, K. (2002) The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current

- perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant and Cell Physiology*, 43: 1421-1435.
- Rosenquist, M., Sehnke, P., Ferl, R. J., Sommarin, M., Larsson, C. (2000) Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity?. *Journal of Molecular Evolution*, 51: 446-458.
- Rossel, J. B., Wilson, I. W., Pogson, B. J. (2002) Global changes in gene expression in response to high light in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 130: 1109-1120.
- Ruschel, A. R., Nodari, E. S., Guerra, M. P., Nodari, R. O. (2005) Evolução do uso e valorização das espécies madeiráveis da Floresta Estacional Decidual do Alto-Uruguaí, SC. *Ciência Florestal*, 13: 167-178.
- Santa-Catarina, C., Maciel, S. C., Pedrotti, E. L. (2001) Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). *Revista Brasileira de Botânica*, 24: 501-510.
- Sauer, H., Wild, A., Ruhle, W. (1987) The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis II. The causes of inhibition of photosynthesis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 42: 270-278.
- Scheibe, R. (1987) NADP⁺-malate dehydrogenase in C3-plants: Regulation and role of a light-activated enzyme. *Physiologia Plantarum*, 71: 393-400.
- Scheibe, R. (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia Plantarum*, 120: 21-26.
- Schultz, C. J., Rumsewicz, M. P., Johnson, K. L., Jones, B. J., Gaspar, Y. M., Bacic, A. (2002) Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiology*, 129: 1448-1463.
- Schultz, C., Gilson, P., Oxley, D., Youl, J., Bacic, A. (1998) GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends in Plant Science*, 3: 426-431.
- Seemann, J. R., Kirschbaum, M. U., Sharkey, T. D., Pearcy, R. W. (1988) Regulation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activity in *Alocasia macrorrhiza* in response to step changes in irradiance. *Plant Physiology*, 88: 148-152.
- Shih, M. C., Goodman, H. M. (1988) Differential light regulated expression of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Nicotiana tabacum*. *The EMBO journal*, 7: 893.
- Shiozawa, J. A., Alberte, R. S., Thornber, J. P. (1974) The P700-chlorophyll a-protein: isolation and some characteristics of the complex in higher plants. *Archives of biochemistry and biophysics*, 165: 388-397.
- Sibout, R., Sukumar, P., Hettiarachchi, C., Holm, M., Muday, G. K., Hardtke, C. S. (2006) Opposite root growth phenotypes of hy5 versus hy5 hyh mutants correlate with increased constitutive auxin signaling. *PLoS Genet*, 2; e202.
- Silva, R. P., Costa, M. A. P., Souza, A., Almeida, W. A. B. (2005) Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 1153-1159.
- Stutte, G. W., Edney, S., Skerritt, T. (2009) Photoregulation of bioprotectant content of red leaf lettuce with light-emitting diodes. *HortScience*, 44: 79-82.
- Takac, T., Pechan, T., Samaj, J. (2011) Differential proteomics of plant development. *Journal of proteomics*, 74: 577-588.
- Takeda, T., Furuta, Y., Awano, T., Mizuno, K., Mitsuishi, Y., Hayashi, T. (2002) Suppression and acceleration of cell elongation by integration of

- xyloglucans in pea stem segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 9055-9060.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Mori, H. (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*, 45: 1028-1036.
- Valério, A. F., Watzlawick, L. F., Silvestre, R., Koehler, H. S. (2009) Determination of the basic density of cedro wood (*Cedrela fissilis* Vell.) along the stem. *Applied Research & Agrotechnology*, 1: 29-36.
- Vandenbussche, F., Habricot, Y., Condiff, A. S., Maldiney, R., Straeten, D. V. D., Ahmad, M. (2007) HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 49: 428-441.
- Wang, H., Ma, L. G., Li, J. M., Zhao, H. Y., Deng, X. W. (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science*, 294: 154-158.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 9: 244-252.
- Wanner, L. A., Gruissem, W. (1991) Expression dynamics of the tomato *rbcS* gene family during development. *The Plant Cell*, 3: 1289-1303.
- Wei, N., Deng, X. W. (1996) The role of the *COP/DET/FUS* genes in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiology*, 112: 871.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Entre os resultados, o número de subcultivo afetou significativamente o desenvolvimento de brotações *in vitro* e o potencial de enraizamento *ex vitro* destas brotações. Os segmentos nodais cotiledonares apresentaram melhores resultados para o desenvolvimento de brotações comparativamente aos apicais no primeiro subcultivo. As brotações de tamanho igual ou superior a 0,5 cm possibilitam o melhor desenvolvimento de novas brotações assim como o enraizamento destas, apresentando a maior percentagem de sobrevivência das mudas oriundas dos dois primeiros subcultivos.

O desenvolvimento das brotações sob lâmpada de LED com combinação de azul médio e vermelho (LED BAmV) possibilitaram o maior alongamento, matéria fresca e seca das brotações comparativamente às cultivadas em lâmpadas fluorescentes. Os segmentos nodais cotiledonares incubados em meio de cultura com a citocinina BA apresentaram melhores respostas sob efeito da qualidade de luz no desenvolvimento de brotações comparativamente aos segmentos nodais apicais. O uso da lâmpada de LED BAmV afetou a abundância de proteínas em brotações comparativamente à lâmpada fluorescente e explante inicial. Dentre as proteínas que foram diferencialmente reguladas destaca-se asproteínas 14-3-3 (A0A067FB32), a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NADP (A0A067FVJ9), e subunidade do centro de reação do fotossistema I cloroplástica (A0A067GQ73), e sugere-se que estas proteínas estão possivelmente associadas ao maior crescimento das brotações obtidas em lâmpadas de LED BAmV.

Os resultados obtidos neste estudo são inéditos para a espécie. Estudos futuros devem ser realizados no sentido de entender os mecanismos bioquímicos e moleculares associados à perda da capacidade de regeneração de brotações ao longo dos subcultivos. Ademais, o uso de lâmpadas de LED pode ser uma alternativa para melhorar a resposta morfogênica *in vitro* nesta espécie, a qual pode ser aplicada para outras espécies arbóreas nativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasim, M., Khawar, K. M., Özcan, S. (2008) *In vitro* micropropagation from shoot meristems of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cv. Akkiz. *Bangladesh Journal of Botany*, 37: 149-154.
- Ahkami, A. H., Melzer, M., Ghaffari, M. R., Pollmann, S., Javid, M. G., Shahinnia, F., Hajirezaei, M. R., Druège, U. (2013) Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta*, 238: 499-517.
- Altman, A., Loberant, B. (1998) Micropropagation: clonal plant propagation *in vitro*. *Agricultural Biotechnology*, 19-42.
- Alves, E. C. S. D. C., Xavier, A., Campos, W. O. (2004) Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X E. urophylla ST Blake. *Revista Árvore*, 28: 643-653.
- Aragão, V. P. M., de Souza Ribeiro, Y. R., Reis, R. S., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., Silveira, V., Santa-Catarina, C. (2016) *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124: 611-620.
- Augusto, C. S. S., Biasi, L. A., Telles, C. A. (2006) Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28: 473-476.
- Baginsky, S. (2009) Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectrometry Reviews*, 28: 93-120.
- Bai, M. Y., Zhang, L. Y., Gampala, S. S., Zhu, S. W., Song, W. Y., Chong, K., Wang, Z. Y. (2007) Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 13839-13844.
- Bajji, M., Thunissen, C., Druart, P. (2013) Adventitious shoot regeneration from *in vitro* juvenile explants of black alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 17: 12.
- Balbuena, T. S., Jo, L., Pieruzzi, F. P., Dias, L. L., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Junqueira, M., Thelend, J. J., Shevchenko, A., Floh, E. I. (2011) Differential

- proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*, 72: 302-311.
- Batygina, T. B. (1999) Embryogenesis and morphogenesis of zygotic and somatic embryos. *Russian journal of plant physiology*, 46: 774-788.
- Beltrati, C. M., Alves Junior, V. V., Pagano, S. (1985) Estudo morfo-anatômico das sementes e das plântulas de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). *Revista Brasileira de Biologia*, 45: 499-506.
- Benmahioul, B., Dorion, N., Kaid-Harche, M., Daguin, F. (2012) Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108: 353-358.
- Bhatia, N. P., Bhatia, P., Ashwath, N. (2002) *Ex vitro* rooting of micropropagated shoots of *Stackhousia tryonii*. *Biologia plantarum*, 45: 441-444.
- Bi, Y. D., Wei, Z. G., Shen, Z., Lu, T. C., Cheng, Y. X., Wang, B. C., Yang, C. P. (2011) Comparative temporal analyses of the *Pinus sylvestris* L. var. *mongolica* litv. apical bud proteome from dormancy to growth. *Molecular biology reports*, 38: 721-729.
- Bianchetti, R. E., de Resende, C. F., Pacheco, V. S., Dornellas, F. F., de Oliveira, A. M. S., Freitas, J. C. E., Peixoto, P. H. P. (2017) An improved protocol for *in vitro* propagation of the medicinal plant *Mimosa pudica* L. *African Journal of Biotechnology*, 16: 418-428.
- Biernaski, F. A., Higa, A. R., Silva, L. D. (2012) Genetic variability for juvenile characters of *Cedrela fissilis* Vell. Progenies: a subsidy for definition of seed collection zone. *Revista Árvore*, 36: 49-58.
- Borkowska, B. (2001) Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. *Scientia Horticulturae*, 89: 195-206.
- Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G., Hamilton, I. R. (1995) Sequence, expression, and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*, 177: 2622-2627.
- Britz, S. J., Sager, J. C. (1990) Photomorphogenesis and photoassimilation in soybean and sorghum grown under broad spectrum or blue-deficient light sources. *Plant Physiology*, 94: 448-454.
- Bruno, A. S., Oliveira, M. V., Silva, A. G. (2014) A vegetação entre moitas numa planície costeira arenosa próxima a uma área que sofreu impacto de mineração de areia no Espírito Santo, sudeste do Brasil. *Natureza on line*, 12: 170-178.
- Budiarto, K. (2010) Spectral quality affects morphogenesis on *Anthurium* plantlet during *in vitro* culture. *Agrivita*, 32: 234.
- Bula, R., Morrow, R. C., Tibbitts, T. W., Barta, D. J., Ignatius, R. W., Martin, T. S. (1991) Light-emitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience*, 26: 203-205.
- Carvalho, A. C. P., Torres, A.C., Braga, E. J. B., Lemos, E. E. P., Souza, F. V. D., Peters, J. A., Willadino, L., Câmara, T. R. (2011a) Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant cell culture e micropropagation*, 1: 22-29.
- Carvalho, D. C. D., Silva, A. L. L. D., Tanno, G. N., Purcino, M., Biasi, L. A. (2011) Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:108-114.
- Carvalho, F. A., Nascimento, M. T., Braga, J. M. A. (2006) Composição e riqueza florística do componente arbóreo da Floresta Atlântica submontana na

- região de Imbaú, Município de Silva Jardim, RJ. *Acta Botanica Brasilica*, 20: 727-740.
- Carvalho, J. S. B., Nunes, M. F. P. N., Campos, G. P. A., Goes, M. D. C. C. (2015) Influence of different types of cuttings and substrates on vegetative propagation of *Hyptis pectinata*. *Revista de Ciências Agroveterinárias (Journal of Agroveterinary Sciences)*, 14: 89-91.
- Carvalho, P. E. R. (2003) *Espécies arbóreas brasileiras*. Colombo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1039p.
- Chan, C. S., Peng, H. P., Shih, M. C. (2002) Mutations affecting light regulation of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 130: 1476-1486.
- Chang, M. M., Li, A., Feissner, R., Ahmad, T. (2016) RT-qPCR demonstrates light-dependent AtRBCS1A and AtRBCS3B mRNA expressions in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Biochemistry and Molecular Biology Education*.
- Che, P., Gingerich, D. J., Lall, S., Howell, S. H. (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14: 2771-2785.
- Cherobini, E. A. I., Muniz, M. F. B., Blume, E. (2008) Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. *Ciência Florestal*, 18: 65-73.
- Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T., Brenner, M. (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (det mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiology*, 104: 339-347.
- CNCFlora. *Cedrela fissilis* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cedrela_fissilis>. Acesso em 6 fevereiro 2017.
- Colombo, A., Joly, C. (2010) Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology*, 70: 697-708.
- Comparot, S., Lingiah, G., Martin, T. (2003) Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 54: 595-604.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21: 3674-3676.
- Costa, C. T., Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. D. S., Fett-Neto, A. G. (2013) When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in plant science*, 4: 133.
- Dedonder, A., Rethy, R., Fredericq, H., Van Montagu, M., Krebbers, E. (1993) *Arabidopsis rbcS* genes are differentially regulated by light. *Plant Physiology*, 101: 801-808.
- Demotes-Mainard, S., Péron, T., Corot, A., Bertheloot, J., Le Gourrierc, J., Pelleschi-Travier, S., Crespel, L., Morel, P., Huché-Thélier, L., Boumaza, R., Vian, A., Guérin, V., Leduc, N., Sakr, S. (2016) Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*, 121, 4-21.
- Deng, Z., Osés-Prieto, J. A., Kutschera, U., Tseng, T. S., Hao, L., Burlingame, A. L., Zhi-Yong, W., Briggs, W. R. (2014) Blue light-induced proteomic changes in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Proteome Research*, 13: 2524-2533.

- Denison, F. C., Paul, A. L., Zupanska, A. K., Ferl, R. J. (2011) September) 14-3-3 proteins in plant physiology. In *Seminars in cell & developmental biology*, 22: 720-727.
- Dewdney, J., Conley, T. R., Shih, M. C., Goodman, H. M. (1993) Effects of blue and red light on expression of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, 103: 1115-1121.
- Dick, R. A., Kwak, M. K., Sutter, T. R., Kensler, T. W. (2001) Antioxidative Function and Substrate Specificity of NAD (P) H-dependent Alkenal/one Oxidoreductase A NEW ROLE FOR LEUKOTRIENE B412-HYDROXYDEHYDROGENASE/15-OXOPROSTAGLANDIN 13-REDUCTASE. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 40803-40810.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., Sangwan, R. S. (2011) De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends in plant science*, 16: 597-606.
- Edwards, J. W., Coruzzi, G. M. (1989) Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *The Plant Cell*, 1: 241-248.
- Edwards, J. W., Walker, E. L., Coruzzi, G. M. (1990) Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 3459-3463.
- Ellis, R. J. (1979) The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences*, 4: 241-244.
- El-showk, S., Ruonala, R., Helariutta, Y. (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development*, 140: 1373-1383.
- Eveland, A. L., Jackson, D. P. (2011) Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 63: 3367-3377.
- Fermino Júnior, P. C. P., Raposo, A., Scherwinski-Pereira, J. E. (2011) *Ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated plantlets of *Tectona grandis*. *Floresta*, 41: 79-86.
- Fett-Neto, A. G., Fett, J. P., Goulart, L. W. V., Pasquali, G., Termignoni, R. R., Ferreira, A. G. (2001) Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*, 21: 457-464.
- Finnemann, J., Schjoerring, J. K. (2000) Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *The Plant Journal*, 24: 171-181.
- Fleck, J. D., Schwambach, J., Almeida, M. E., Yendo, A. C., de Costa, F., Gosmann, G., Fett-Neto, A. G. (2009) Immunoadjuvant saponin production in seedlings and micropropagated plants of *Quillaja brasiliensis*. *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 45: 715-720.
- Flores, R., Nicoloso, F. T., Vasconcellos, N. J. S. (2006) Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, 8: 89-95.
- Fromme, P., Jordan, P., Krauß, N. (2001) Structure of photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1507: 5-31.
- Fundação SOS Mata Atlântica. (2014) *Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica—Período 2013-2014*, 2015. Disponível em: < http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/atlas_2013-2014_relatorio_tecnico_2015.pdf >. Acesso em: 10/02/2017.

- George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. J. (2008) Micropropagation: uses and methods. In *Plant propagation by tissue culture*, 29-64pp.
- Giri, C., Shyamkumar, B., Anjaneyulu, C. (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18: 115-135.
- Grafi, G. (2004) How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Developmental biology*, 268: 1-6.
- Guan, M., de Bang, T., Pedersen, C., Schjoerring, J. K. (2016) Cytosolic glutamine synthetase Gln1; 2 is the main isozyme contributing to GS1 activity in *Arabidopsis* shoots and can be up-regulated to relieve ammonium toxicity. *Plant physiology*, pp-01195.
- Gupta, S. D., Jatothu, B. (2013) Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant biotechnology reports*, 7: 211-220.
- Haldrup, A., Simpson, D. J., Scheller, H. V. (2000) Down-regulation of the PSI-F subunit of photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana* The PSI-F subunit is essential for photoautotrophic growth and contributes to antenna function. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 31211-31218.
- Hamad, A. M., Taha, R. M. (2008) Effect of sequential subcultures on *in vitro* proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. *Scientia Horticulturae*, 117: 329-334.
- Haslbeck, M., Vierling, E. (2015) A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of molecular biology*, 427: 1537-1548.
- Heringer, A. S., Reis, R. S., Passamani, L. Z., Souza-Filho, G. A., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2017) Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39: 52.
- Hochholdinger, F., Sauer, M., Dembinsky, D., Hoecker, N., Muthreich, N., Saleem, M., Liu, Y. (2006) Proteomic dissection of plant development. *Proteomics*, 6: 4076-4083.
- Hoenecke, M., Bula, R., Tibbitts, T. (1992) Importance of 'Blue' Photon Levels for Lettuce Seedlings Grown under Red-light-emitting Diodes. *HortScience*, 27: 427-430.
- Hoenecke, M., Bula, R., Tibbitts, T. (1992) Importance of 'Blue' Photon Levels for Lettuce Seedlings Grown under Red-light-emitting Diodes. *HortScience*, 27: 427-430.
- Hung, C. D., Hong, C. H., Jung, H. B., Kim, S. K., Van Ket, N., Nam, M. W., Choi, D.H., Lee, H. I. (2015) Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs. *Scientia Horticulturae*, 194: 194-200.
- Igarashi, D., Ishida, S., Fukazawa, J., Takahashi, Y. (2001) 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *The Plant Cell*, 13: 2483-2497.
- Ishida, S., Fukazawa, J., Yuasa, T., Takahashi, Y. (2004) Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator REPRESSION OF SHOOT GROWTH by gibberellins. *The Plant Cell*, 16: 2641-2651.
- IUCN. International Union for Conservation of Nature. (2017) *IUCN red list of threatened species*, 2017. Disponível em: <

- <http://www.iucnredlist.org/details/33928/0> >. Acesso em: 23 de janeiro de 2017.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., Buchner, J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 1517-1520.
- Jishi, T., Kimura, K., Matsuda, R., Fujiwara, K. (2016) Effects of temporally shifted irradiation of blue and red LED light on cos lettuce growth and morphology. *Scientia Horticulturae*, 198: 227-232.
- Jorrín-Novo, J. V., Maldonado, A. M., Echevarría-Zomeño, S., Valledor, L., Castillejo, M. A., Curto, M., Valero, J., Sghaier, B., Donoso, G., Redondo, I. (2009) Plant proteomics update (2007–2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of Proteomics*, 72: 285-314.
- Junior, F., Poeta, P. C., Scherwinski-Pereira, J. E. (2012) *IN VITRO* GERMINATION AND PROPAGATION OF CEREJEIRA (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith – FABACEAE). *Ciência Florestal*, 22: 1-9.
- Junior, P. C. P. F., Scherwinski-Pereira, J. E. (2012) Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). *Ciência Florestal*, 22: 1-9.
- Knight, S., Andersson, I., Brändén, C. I. (1990) Crystallographic analysis of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution: Subunit interactions and active site. *Journal of molecular biology*, 215: 113-160.
- Kobza, J., Seemann, J. R. (1989) Regulation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activity in response to diurnal changes in irradiance. *Plant physiology*, 89: 918-924.
- Kutschera, U., Wang, Z. Y. (2016) Growth-limiting proteins in maize coleoptiles and the auxin-brassinosteroid hypothesis of mesocotyl elongation. *Protoplasma*, 253: 3-14.
- Lall, S., Mandegaran, Z., Roberts, A. V. (2006) Shoot multiplication and adventitious regeneration in *Sorbus aucuparia*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 85: 23-29.
- Lau, O. S., Deng, X. W. (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current opinion in plant biology*, 13: 571-577.
- Lee, S. K., Rao, A. N. (1988) Plantlet production of *Swietenia macrophylla* King through tissue culture. *Gardens' Bulletin, Singapore*, 41: 11-18.
- Leegood, R. C. (1996) Primary photosynthate production: physiology and metabolism. *Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships*. Zamski, E. Schaffer, AA (Ed.), Marcel Dekker, New York, 21-42.
- Letunic, I., Bork, P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic acids research*, 44: 242-245.
- Li, H., Xu, Z., Tang, C. (2010) Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103: 155-163.
- Lian, M. L., Murthy, H. N., Paek, K. Y. (2002) Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. *Scientia Horticulturae*, 94: 365-370.
- Ljung, K., Bhalerao, R. P., Sandberg, G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, 28: 465-474.

- Loyd, G. e McCown, B. (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*, 30: 421-427.
- Lv, C., Ma, J., Yuan, Z., Wang, Y., Chen, G., Gao, Z., Lv, C. (2016) Proteomics analysis of the photo-oxidation mutant 812HS rice ('*Oryza sativa* L.') exposed to high light intensity. *Plant Omics*, 9: 304.
- Mano, J. I., Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Inzé, D., Torii, Y., Hiraoka, E., Takimoto, K., Slooten, L., Asada, K., Kushnir, S. (2005) Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant physiology*, 139: 1773-1783.
- Martins, L., Lago, A. A. D. (2008) Conservação de semente de *Cedrela fissilis*: teor de água da semente e temperatura do ambiente. *Revista Brasileira de Sementes*, 30: 161-167.
- Massa, G. D., Kim, H. H., Wheeler, R. M., Mitchell, C. A. (2008) Plant productivity in response to LED lighting. *HortScience*, 43: 1951-1956.
- Mattsson, J., Sung, Z. R., Berleth, T. (1999) Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development*, 126: 2691-2979.
- Mcmahon, M., Kelly, J. W., Decoteau, D. R., Young, R. E., Pollock, R. K. (1991) Growth of *Dendranthemax grandiflorum* (Ramat.) Kitamura under various spectral filters. *Journal of the American Society for horticultural science*, 116: 950-954.
- Mengxi, L., Zhigang, X., Yang, Y., Yijie, F. (2011) Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106: 1-10.
- Miflin, B. J., e Lea, P. J. (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, 15: 873-885.
- Miller, S. S., Driscoll, B. T., Gregerson, R. G., Gantt, J. S., Vance, C. P. (1998) Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *The Plant Journal*, 15: 173-184.
- Mittermeier, R. A., Fonseca, G. D., Rylands, A. B., Brandon, K. (2005) Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. *Megadiversidade*, 1: 14-21.
- Mohebalipour, N., Aharizad, S., Mohammadi, S., Motallebiazar, A., Arefi, H. (2012) Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10: 280-286.
- Moubayidin, L., Di Mambro, R., Sabatini, S. (2009) Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends in plant science*, 14: 557-562.
- Moura, L. C., Titon, M., Miranda, N. A., Moreira, T. P., de Oliveira, M. L. R. (2012) *In vitro* multiplication and elongation of vinhatico (*Plathymentia reticulata*). *Scientia Forestalis*, 40: 499-505.
- Moura, T. L., Almeida, W. A. B., Madalena, B., Mendes, J., Filho, F. D. A. A. M. (2001) Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23: 240-245.
- Muller, B. (1970) On the mechanism of the light-induced activation of the NADP-dependent glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 205: 102-109.

- Murashige, T., Skoog, F. A. A. (1962) Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858.
- Neff, M. M., Street, I. H., Turk, E. M., Ward, J. M. (2006) Interaction of light and hormone signalling to mediate photomorphogenesis. *Photomorphogenesis in Plants and Bacteria* (pp. 439-473). Springer Netherlands.
- Nemhauser, J. L. (2008) Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. *Current opinion in plant biology*, 11: 4-8.
- Nhut, D. T., Hong, L. T. A., Watanabe, H., Goi, M., Tanaka, M. (2000) Growth of banana plantlets cultured in vitro under red and blue light-emitting diode (LED) irradiation source. In *International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits* 575: 117-124.
- Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., Okamoto, K., Tanaka, M. (2003) Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 43-52.
- Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., Tanaka, M. (2001) Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (LED) on *in vitro* and subsequent growth of micropropagated banana plantlets. In *International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants*, 616: 121-127.
- Nicoli, P.M., Paivall, R., Nogueirall, R. C., Santanal, J. R. F., Silval, L. C., Silva, D. P. C., Porto, J. M. P. (2008) Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. *Ciencia Rural*, 38: 685-689.
- Nishitani, K., Tominaga, R. (1992) Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 21058-21064.
- Noiton, D., Vine, J. H., Mullins, M. G. (1992) Effects of serial subculture *in vitro* on the endogenous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid and rootability in microcuttings of 'Jonathan' apple. *Plant growth regulation*, 11: 377-383.
- Nunes, E. C., Benson, E. E., Oltramari, A. C., Araujo, P. S., Moser, J. R., Viana, A. M. (2003) *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, 12: 837-848.
- Nunes, E. C., Castilho, C. V., Moreno, F. N., Viana, A. M. (2002) *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae) *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 70: 259-268.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A. M., Loureiro, M. E., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., Fernie, A. R. (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology*, 137: 611-622.
- Oliveira, M. A., Grillo, A. S., Tabarelli, M. (2004) Forest edge in the Brazilian Atlantic forest: drastic changes in tree species assemblages. *Oryx*, 38: 389-394.
- Olle, M., Viršile, A. (2013) The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. *Agricultural and Food Science*, 22: 223-234.
- Peixoto, G. L., Martins, S. V., Silva, A. D., Silva, E. (2004) Composição florística do componente arbóreo de um trecho de Floresta Atlântica na Área de

- Proteção Ambiental da Serra da Capoeira Grande, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 18: 151-160.
- Pereira, J. E. S., Fortes, G.R.L. (2001) Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de enraizamento. *Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal*, 23: 417-420.
- Pereira, J. E. S., França, R. B., Dantas, A. D. M., Fortes, G. R. (2005) Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. *Horticultura Brasileira*, 23: 86-89.
- Pereira, M. O., Navroski, M. C., Reiniger, L. R. S. (2015) *In vitro* multiplication of *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex A. DC.) MATTOS. *Nativa*, 3: 59-63.
- Perveen, S., Anis, M., Aref, I. M. (2013) Resource communication. *In vitro* plant regeneration of *Albizia lebeck* (L.) Benth. from seed explants. *Forest Systems* 22: 241-248.
- Petrovská, B., Sebelá, M., Doležel, J. (2015) Inside a plant nucleus: discovering the proteins. *Journal of experimental botany*, 66: 1627-1640.
- Pijut, P. M., Beasley, R. R., Lawson, S. S., Palla, K. J., Stevens, M. E., Wang, Y. (2012) *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species – a review (2001–2011) *Propagation of Ornamental Plants*, 12: 25-51.
- Poudel, P. R., Kataoka, I., Mochioka, R. (2008) Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant cell, tissue and organ culture*, 92: 147-153.
- Prakash, E., Khan, P. S. S. V., Rao, T. J. V. S., Meru, E. S. (2006) Micropropagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using mature nodal explants. *Journal of Forest Research*, 11: 329-335.
- Prescha, A., Świędrych, A., Biernat, J., Szopa, J. (2001) Increase in lipid content in potato tubers modified by 14-3-3 gene overexpression. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49: 3638-3643.
- Pruski, K. W., Lewis, T., Astatkie, T., Nowak, J. (2000) Micropropagation of Chokecherry and Pincherry cultivars. *Plant cell, tissue and organ culture*, 63: 93-100.
- Quiroz-Figueroa, F., Fuentes-Cerda, C., Rojas-Herrera, R., Loyola-Vargas, V. (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20: 1141-1149.
- R Development Core Team. (2016) *The R Project for Statistical Computing*, Disponível em: < <https://www.r-project.org/> >. Acesso em: 03 de outubro de 2016.
- Ranaweera, K. K., Gunasekara, M. T. K., Eeswara, J. P. (2013) Ex vitro rooting: A low cost micropropagation technique for Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz) hybrids. *Scientia Horticulturae*, 155, 8-14.
- Rathore, J. S., Rai, M. K., Phulwaria, M., Shekhawat, N. S. (2014) A liquid culture system for improved micropropagation of mature *Acacia nilotica* (L.) Del. ssp. indica and ex vitro rooting. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 84: 193-200.
- Reis, R. S., de Moura Vale, E., Heringer, A. S., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2016) Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *Journal of proteomics*, 130: 170-179.
- Ribeiro, Y. R. S. (2015) Enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas em *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Monografia (Licenciatura em Ciências

- Biológicas) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 38p.
- Rocha, S. C. D., Quorim, M., Ribas, L. L. F., Koehler, H. S. (2007) Micropropagation of *Cabralea canjerana*. *Revista Árvore*, 31: 43-50.
- Romano, A., Noronha, C., Martins-Loucao, M. A. (1995) Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant cell, tissue and organ culture*, 40: 159-167.
- Rose, J. K., Braam, J., Fry, S. C., Nishitani, K. (2002) The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant and Cell Physiology*, 43: 1421-1435.
- Rosenquist, M., Sehne, P., Ferl, R. J., Sommarin, M., Larsson, C. (2000) Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity?. *Journal of Molecular Evolution*, 51: 446-458.
- Rossel, J. B., Wilson, I. W., Pogson, B. J. (2002) Global changes in gene expression in response to high light in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130: 1109-1120.
- Roussos, P. A., Archimandriti, A., Beldekou, I. (2016) Improving in vitro multiplication of juvenile European chestnut (*Castanea sativa* Mill) explants by the use of growth retardants. *Scientia Horticulturae*, 198: 254-256.
- Ruedell, C. M., de Almeida, M. R., Schwambach, J., Posenato, C. F., Fett-Neto, A. G. (2013) Pre and post-severance effects of light quality on carbohydrate dynamics and microcutting adventitious rooting of two *Eucalyptus* species of contrasting recalcitrance. *Plant Growth Regulation*, 69: 235-245.
- Ruschel, A. R., Nodari, E. S., Guerra, M. P., Nodari, R. O. (2005) Evolução do uso e valorização das espécies madeiráveis da Floresta Estacional Decidual do Alto-Uruguaí, SC. *Ciência Florestal*, 13(1), 167-178.
- Sairanen, I., Novák, O., Pěnčík, A., Ikeda, Y., Jones, B., Sandberg, G., Ljung, K. (2012) Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24: 4907-4916.
- Santa-Catarina, C., Maciel, S. C., Pedrotti, E. L. (2001) Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). *Revista Brasileira de Botânica*, 24: 501-510.
- Santos, C. C. C., Hercílio, P., Rodrigues, V. (2004) Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. *Bragantia*, 63: 201-205.
- Sauer, H., Wild, A., Ruhle, W. (1987) The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis II. The causes of inhibition of photosynthesis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 42: 270-278.
- Scheibe, R. (1987) NADP⁺-malate dehydrogenase in C3-plants: Regulation and role of a light-activated enzyme. *Physiologia Plantarum*, 71: 393-400.
- Scheibe, R. (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia Plantarum*, 120: 21-26.
- Schultz, C. J., Rumsewicz, M. P., Johnson, K. L., Jones, B. J., Gaspar, Y. M., Bacic, A. (2002) Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiology*, 129: 1448-1463.
- Schultz, C., Gilson, P., Oxley, D., Youl, J., Bacic, A. (1998) GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends in Plant Science*, 3: 426-431.
- Seemann, J. R., Kirschbaum, M. U., Sharkey, T. D., Pearcy, R. W. (1988) Regulation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activity in *Alocasia*

- macrorrhiza in response to step changes in irradiance. *Plant Physiology*, 88: 148-152.
- Shekhawat, N. S., Rathore, T. S., Singh, R. P., Deora, N. S., Rao, S. R. (1993) Factors affecting *in vitro* clonal propagation of *Prosopis cineraria*. *Plant Growth Regulation*, 12: 273-280.
- Shemer, O., Landau, U., Candela, H., Zemach, A., Williams, L. E. (2015) Competency for shoot regeneration from *Arabidopsis* root explants is regulated by DNA methylation. *Plant Science*, 238, 251-261.
- Shih, M. C., Goodman, H. M. (1988) Differential light regulated expression of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Nicotiana tabacum*. *The EMBO journal*, 7: 893.
- Shimizu-Sato, S., Mori, H. (2001) Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiology*, 127: 1405-1413.
- Shiozawa, J. A., Alberte, R. S., Thornber, J. P. (1974) The P700-chlorophyll a-protein: isolation and some characteristics of the complex in higher plants. *Archives of biochemistry and biophysics*, 165: 388-397.
- Sibout, R., Sukumar, P., Hettiarachchi, C., Holm, M., Muday, G. K., Hardtke, C. S. (2006) Opposite root growth phenotypes of *hy5* versus *hy5 hyh* mutants correlate with increased constitutive auxin signaling. *PLoS Genet*, 2; e202.
- Silva, R. P., Costa, M. A. P., Souza, A., Almeida, W. A. B. (2005) Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 1153-1159.
- Siwach, P., Gill, A. R. (2014) Micropropagation of *Ficus religiosa* L. via leaf explants and comparative evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity in the micropropagated and conventionally grown plants. *3 Biotech*, 4: 477-491.
- Skirvin, R. M., Mc Pheeters, K. D., Norton, M. (1994) Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience*, 29: 1232-1237.
- Soares, F. P., Paiva, R., Alvarenga, A. A. D., Nogueira, R. C., Emrich, E. B., Martinotto, C. (2007) Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia*, 31: 1048-1053.
- Soares, F. P., Paiva, R., Stein, V. C., Nery, F. C., Nogueira, R. C., Oliveira, L. M. D. (2009) Effect of culture media, GA3 concentrations and pH on *in vitro* germination of (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia*, 33: 1847-1852.
- Sobrinho, F. D. A. P., Christo, A. G., Guedes-bruni, R. R. (2010) Fitossociologia do componente arbóreo num remanescente de floresta ombrófila densa submontana limítrofe à Reserva biológica do Tinguá, Rio de Janeiro. *Floresta*, 40: 111-124.
- Stutte, G. W., Edney, S., Skerritt, T. (2009) Photoregulation of bioprotectant content of red leaf lettuce with light-emitting diodes. *HortScience*, 44: 79-82.
- Takac, T., Pechan, T., Samaj, J. (2011) Differential proteomics of plant development. *Journal of proteomics*, 74: 577-588.
- Takeda, T., Furuta, Y., Awano, T., Mizuno, K., Mitsuishi, Y., Hayashi, T. (2002) Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 9055-9060.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Mori, H. (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*, 45: 1028-1036.

- Teale, W. D., Paponov, I. A., Palme, K. (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 847-859.
- Thorpe, T. (2007) History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37: 169-80.
- Tiwari, S. K., Tiwari, K. P., Siril, E. A. (2002) An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 1-6.
- Uzelac, B., Janosevic, D., Stojicic, D., Budimir, S. (2012) Effect of cytokinins on shoot apical meristem in *Nicotiana tabacum*. *Archives of Biological Sciences*, 64: 511–516.
- Valério, A. F., Watzlawick, L. F., Silvestre, R., Koehler, H. S. (2009) Determination of the basic density of cedro wood (*Cedrela fissilis* Vell.) along the stem. *Applied Research & Agrotechnology*, 1: 29-36.
- Vandenbussche, F., Habricot, Y., Condiff, A. S., Maldiney, R., Straeten, D. V. D., Ahmad, M. (2007) HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 49: 428-441.
- Verstraeten, I., Beeckman, T., Geelen, D. (2013) Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for *in vitro* root organogenesis. *Plant Organogenesis: Methods and Protocols*, 159-175.
- Vieira, L. N., Freitas Fraga, H. P., dos Anjos, K. G., Puttkammer, C. C., Scherer, R. F., da Silva, D. A., Guerra, M. P. (2015) Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) 'Nanicão Corupá' *in vitro* plantlets. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27: 91-98.
- Vogel, G. (2005) How does a single somatic cell become a whole plant?. *Science*, 309: 86-87.
- Wang, H., Ma, L. G., Li, J. M., Zhao, H. Y., Deng, X. W. (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science*, 294: 154-158.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 9: 244-252.
- Wanner, L. A., Gruissem, W. (1991) Expression dynamics of the tomato *rbcS* gene family during development. *The Plant Cell*, 3: 1289-1303.
- Wei, N., Deng, X. W. (1996) The role of the *COP/DET/FUS* genes in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiology*, 112: 871.
- Yan, H., Liang, C., Yang, L., Li, Y. (2010) *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 115-120.
- Zuraida, A. R., Sentoor, K. G., Ahmad, N., Syahirah, F. M., Ayu, N. O. (2017) Regeneration of *in vitro* Shoot and Root Structure through Hormone Manipulation of Coconut (MATAG F2) Zygotic Embryos. *American Journal of Plant Sciences*, 8: 340-348

ANEXO 1

Tabela com a lista de todas as proteínas (415) sem diferença significativa na abundância (UNCHANGED) indentificadas em brotações de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis* sob diferentes tratamentos (LED BAmV, lâmpadas fluorescentes, e explantes excisados de plântulas com 60 dias de idade) com bases de sequências de proteínas de *Citrus sinenses* (2016/05) UniProtKB (www.uniprot.org).

Acesso	Número de peptídeo	Score ^a	Descrição
A0A067FNS1	7	65,36	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g020952mg PE=3 SV=1
A0A067G0Q0	5	32,82	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g036252mg PE=3 SV=1
A0A067GCN7	6	48,64	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010652mg PE=3 SV=1
A0A067FG77	5	34,05	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g008996mg PE=3 SV=1
A0A067FL83	2	11,14	Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g016050mg PE=3 SV=1
A0A067EC23	5	40,70	Adenylosuccinate synthetase (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g045536mg PE=3 SV=1
A0A067E1W9	2	18,13	Adenylyl cyclase-associated protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g016407mg PE=3 SV=1
A0A067GJN7	2	11,03	Adenylyl-sulfate kinase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g023675mg PE=3 SV=1
A0A067E092	3	19,69	Alpha-galactosidase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g012852mg PE=3 SV=1
A0A067GP07	8	56,91	Alpha-galactosidase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g014862mg PE=3 SV=1
A0A067GNQ1	3	20,31	Alpha-galactosidase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g039407mg PE=3 SV=1
A0A067GFA3	13	110,98	Aminomethyltransferase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g015308mg PE=3 SV=1
A0A067GQH6	4	29,66	Annexin OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g035973mg PE=3 SV=1
Q09MJ3	20	252,44	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS=Citrus sinensis GN=atpA PE=3 SV=1
Q09MH1	29	324,27	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Citrus sinensis GN=atpB PE=3 SV=1
A0A067FGM8	3	26,11	Beta-galactosidase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g002867mg PE=3 SV=1
A0A067GD13	2	11,24	Beta-galactosidase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g003095mg PE=3 SV=1
A0A067HBI5	12	121,20	Catalase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g042356mg PE=3 SV=1
A0A067H2F2	15	149,63	Catalase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g044386mg PE=3 SV=1
A0A067DRK0	2	11,55	Cation-transporting ATPase (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0010101mg PE=3 SV=1
A2IB51	7	57,78	Cinnamyl alcohol dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CAD PE=2 SV=1
A0A067G0D8	23	152,03	Clathrin heavy chain OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g000428mg PE=3 SV=1
A0A067EHC3	8	58,20	Cysteine synthase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g020528mg PE=3 SV=1
Q09ME7	3	27,08	Cytochrome b6 OS=Citrus sinensis GN=petB PE=3 SV=2
Q09MG5	13	121,26	Cytochrome f OS=Citrus sinensis GN=petA PE=3 SV=1
A0A067FXK6	12	88,42	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010573mg PE=4 SV=1
A0A067E3N7	19	203,99	Elongation factor 1-alpha OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0132372mg PE=3 SV=1
A0A067FTF8	20	207,21	Elongation factor Tu OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g011581mg PE=3 SV=1
A0A067G042	14	92,14	Elongation factor Tu OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013007mg PE=3 SV=1
D2WKD0	2	11,55	Ethylene response 2 OS=Citrus sinensis GN=ETR2 PE=2 SV=1
A0A067EWH2	2	11,85	Eukaryotic translation initiation factor 5A OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g030552mg PE=3 SV=1
A0A067FVY8	2	25,04	Eukaryotic translation initiation factor 6 OS=Citrus sinensis GN=EIF6 PE=3 SV=1
A0A067E486	11	123,24	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g015888mg PE=3 SV=1
A0A067EG44	12	149,89	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g015888mg PE=3 SV=1
A0A067DID1	2	11,60	Glutamate decarboxylase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010897mg PE=3 SV=1
A0A067F3G4	8	77,36	Glutamate dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g012750mg PE=3 SV=1
A0A067GHG2	12	105,43	Glutamine synthetase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g013478mg PE=3 SV=1
A0A067EC67	4	38,94	Glutamine synthetase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g018391mg PE=3 SV=1
A0A067GZQ5	14	137,97	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g012940mg PE=3 SV=1
A0A067H382	15	174,47	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g019445mg PE=3 SV=1
A0A067F2J1	7	73,52	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g014424mg PE=3 SV=1

Acesso	Número de peptídeo	Score ^a	Descrição
A0A067E3C8	2	12,37	Glycosyltransferase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g044823mg PE=3 SV=1
A0A067GY06	10	94,93	GTP-binding nuclear protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g027593mg PE=3 SV=1
H9NHJ9	12	83,29	Hsp90 OS=Citrus sinensis GN=hsp90 PE=2 SV=1
A0A067H4Z1	3	24,44	Importin subunit alpha OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g009679mg PE=3 SV=1
A0A067F2L2	2	12,41	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010640mg PE=3 SV=1
A0A067E9Z4	5	44,22	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g017413mg PE=3 SV=1
A0A067GJA1	5	34,61	Lactoylglutathione lyase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g016689mg PE=3 SV=1
A0A067FGE7	8	53,44	Lactoylglutathione lyase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g018011mg PE=3 SV=1
A0A067GS75	3	21,41	Lactoylglutathione lyase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0228181mg PE=3 SV=1
A0A067F2C7	3	22,15	Lactoylglutathione lyase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0260302mg PE=3 SV=1
A0A067F5R0	3	17,59	L-lactate dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g018760mg PE=3 SV=1
A0A067HCN8	6	68,54	Malate dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g017740mg PE=3 SV=1
A0A067GDN1	8	74,13	Malate dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g022546mg PE=3 SV=1
A0A067H562	15	93,94	Malic enzyme OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g007456mg PE=3 SV=1
A0A067HC25	7	52,37	Malic enzyme OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g040403mg PE=3 SV=1
P83948	9	59,99	Pectinesterase 3 OS=Citrus sinensis PE=1 SV=1
A0A067D451	2	11,73	Pectinesterase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g027636mg PE=4 SV=1
A0A067DLT5	2	11,22	Pectinesterase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g039111mg PE=4 SV=1
A0A067HFT8	7	53,37	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g024387mg PE=3 SV=1
A0A067GQ09	9	92,56	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g024818mg PE=3 SV=1
A0A067FS21	4	38,74	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g027222mg PE=3 SV=1
A0A067EET8	3	27,37	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g030573mg PE=4 SV=1
A0A067EFK3	5	45,34	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g030603mg PE=3 SV=1
A0A067H891	5	41,21	Peroxidase (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0192781mg PE=3 SV=1
A0A067H6D4	3	18,10	Peroxidase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g019629mg PE=3 SV=1
A0A067E5T0	7	50,42	Phenylalanine ammonia-lyase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g004955mg PE=3 SV=1
A0A067F2H8	18	205,45	Phosphoglycerate kinase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g011942mg PE=3 SV=1
A0A067FDS3	14	120,60	Phosphoglycerate kinase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g040813mg PE=3 SV=1
A0A067E345	7	41,34	Phosphoglycolate phosphatase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g016293mg PE=3 SV=1
A0A067EY79	14	109,58	Phosphoribulokinase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g048274mg PE=3 SV=1
Q09MC5	8	97,17	Photosystem I iron-sulfur center OS=Citrus sinensis GN=psaC PE=3 SV=1
Q09MH9	10	74,92	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 OS=Citrus sinensis GN=psaB PE=3 SV=1
Q09MI2	13	112,01	Photosystem II CP43 reaction center protein OS=Citrus sinensis GN=psbC PE=3 SV=1
Q09MF1	13	104,50	Photosystem II CP47 reaction center protein OS=Citrus sinensis GN=psbB PE=3 SV=1
Q09MI3	6	61,10	Photosystem II D2 protein OS=Citrus sinensis GN=psbD PE=3 SV=1
Q09MJ8	5	56,06	Photosystem II protein D1 OS=Citrus sinensis GN=psbA PE=3 SV=1
A0A067GYT2	3	17,23	Polyadenylate-binding protein OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g006641mg PE=3 SV=1
A0A067FGD5	2	18,00	Probable bifunctional methylthioribulose-1-phosphate dehydratase/enolase-phosphatase E1 OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g009774mg PE=3 SV=1
Q06652	7	55,23	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase OS=Citrus sinensis GN=CSA PE=1 SV=1
A0A067E9F6	4	43,73	Profilin OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g032890mg PE=3 SV=1
A0A067FTI4	2	18,80	Proliferating cell nuclear antigen OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g024527mg PE=3 SV=1
A0A067GYC0	3	21,32	Proteasome subunit alpha type OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g023620mg PE=3 SV=1
A0A067EH28	5	50,22	Proteasome subunit alpha type OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g025640mg PE=3 SV=1
A0A067F1I2	4	33,91	Proteasome subunit alpha type OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g025676mg PE=3 SV=1
A0A067FP55	5	52,62	Proteasome subunit alpha type OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g025897mg PE=3 SV=1
A0A067EIS1	8	87,67	Proteasome subunit alpha type OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g026496mg PE=3 SV=1
A0A067H2J8	5	38,78	Proteasome subunit beta type OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g022125mg PE=3 SV=1
A0A067DEE9	7	57,84	Proteasome subunit beta type OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g027418mg PE=3 SV=1
A0A067H1G0	6	51,78	Proteasome subunit beta type OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g027426mg PE=3 SV=1
A0A067G4G2	4	27,54	Protein disulfide-isomerase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g007850mg PE=3 SV=1
A0A067G1S0	2	12,28	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g022070mg PE=3 SV=1
A8C172	11	100,52	PSI reaction center subunit II OS=Citrus sinensis GN=psaDb PE=2 SV=1
A0A067ERW0	2	10,64	Pyruvate kinase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g007936mg PE=3 SV=1

Acesso	Número de peptídeo	Score ^a	Descrição
A0A067EF16	3	22,75	Pyruvate kinase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g008172mg PE=3 SV=1
A0A067GNP3	5	38,12	Pyruvate kinase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010443mg PE=3 SV=1
A0A067ETG2	6	38,15	Pyruvate kinase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g010627mg PE=3 SV=1
A0A067DXX0	3	34,10	Ribulose biphosphate carboxylase small chain OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g029245mg PE=3 SV=1
A0A067FEE9	7	64,50	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g016978mg PE=3 SV=1
A0A067DZ46	3	28,32	S-formylglutathione hydrolase (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g0233241mg PE=3 SV=1
A0A067GW42	9	70,81	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g046556mg PE=3 SV=1
A0A067GEK9	7	46,67	Sucrose synthase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g003661mg PE=3 SV=1
A0A067DHG3	2	15,82	Sulfotransferase (Fragment) OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g045957mg PE=3 SV=1
A0A067F9M5	4	28,49	T-complex protein 1 subunit delta OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g009431mg PE=3 SV=1
A0A067F2C0	2	11,78	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g036490mg PE=3 SV=1
C8CP48	9	78,35	Ubiquitin-conjugating enzyme variant OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g031715mg PE=2 SV=1
A0A067GTQ8	3	18,33	UDP-glucose 6-dehydrogenase OS=Citrus sinensis GN=CISIN_1g011650mg PE=3 SV=1
G8HI69	12	106,96	Vacuolar H ⁺ -ATPase (Fragment) OS=Citrus sinensis PE=2 SV=1
A0A067GUW1	10	86,13	Não caracterizada
A0A067DVI5	19	183,30	Não caracterizada
A0A067FPN0	12	117,60	Não caracterizada
A0A067GS64	3	19,20	Não caracterizada
A0A067F6B4	7	68,35	Não caracterizada
A0A067GXF6	4	22,49	Não caracterizada
A0A067F287	24	246,18	Não caracterizada
A0A067F0Y6	13	131,02	Não caracterizada
A0A067F6U6	7	53,09	Não caracterizada
A0A067GFK2	13	91,77	Não caracterizada
A0A067G6K0	5	46,78	Não caracterizada
A0A067H671	3	17,79	Não caracterizada
A0A067DMV2	10	85,63	Não caracterizada
A0A067DQM9	2	12,99	Não caracterizada
A0A067ELY2	2	11,59	Não caracterizada
A0A067H6X7	7	46,07	Não caracterizada
A0A067DXE6	9	82,42	Não caracterizada
A0A067H8Z0	5	52,68	Não caracterizada
A0A067D001	2	16,23	Não caracterizada
A0A067H5H3	2	11,11	Não caracterizada
A0A067EFH2	4	25,69	Não caracterizada
A0A067H0A0	3	17,80	Não caracterizada
A0A067FYP7	5	50,27	Não caracterizada
A0A067E9T9	10	90,06	Não caracterizada
A0A067ETU0	2	13,44	Não caracterizada
A0A067E4J3	4	28,56	Não caracterizada
A0A067EF26	2	11,89	Não caracterizada
A0A067EY13	6	39,14	Não caracterizada
A0A067G4F5	8	53,15	Não caracterizada
A0A067ERT9	2	17,21	Não caracterizada
A0A067DT02	7	50,67	Não caracterizada
A0A067FVE2	2	10,96	Não caracterizada
A0A067H6N7	6	56,34	Não caracterizada
A0A067GIU0	2	32,20	Não caracterizada
A0A067E8H6	26	277,95	Não caracterizada
A0A067EPX5	2	12,14	Não caracterizada
A0A067FSK7	18	226,56	Não caracterizada
A0A067G8J6	5	56,59	Não caracterizada
A0A067GKK4	4	24,57	Não caracterizada
A0A067FV31	8	65,44	Não caracterizada

Acesso	Número de peptídeo	Score ^a	Descrição
A0A067GC64	17	164,44	Não caracterizada
A0A067DQ00	5	45,56	Não caracterizada
A0A067E2G3	8	76,03	Não caracterizada
A0A067DLE6	3	23,41	Não caracterizada
A0A067FEP2	2	11,33	Não caracterizada
A0A067GAE0	14	136,65	Não caracterizada
A0A067GIE1	18	223,41	Não caracterizada
A0A067DK59	6	44,86	Não caracterizada
A0A067H1T8	5	32,20	Não caracterizada
A0A067DNA9	19	168,36	Não caracterizada
A0A067GGQ1	4	32,61	Não caracterizada
A0A067GMT0	2	12,91	Não caracterizada
A0A067GI51	4	28,95	Não caracterizada
A0A067GF15	5	50,72	Não caracterizada
A0A067F278	10	69,46	Não caracterizada
A0A067DZG5	2	11,60	Não caracterizada
A0A067E7M7	6	47,96	Não caracterizada
A0A067EPR8	5	38,01	Não caracterizada
A0A067FBR0	3	17,42	Não caracterizada
A0A067E920	3	19,89	Não caracterizada
A0A067DNN4	4	28,80	Não caracterizada
A0A067GB25	2	12,15	Não caracterizada
A0A067G141	7	67,81	Não caracterizada
A0A067G5E8	4	28,14	Não caracterizada
A0A067FCC9	2	11,67	Não caracterizada
A0A067F728	2	11,37	Não caracterizada
A0A067FKV9	2	10,81	Não caracterizada
A0A067GAG5	3	17,50	Não caracterizada
A0A067FHW1	7	51,11	Não caracterizada
A0A067D8U1	2	10,68	Não caracterizada
A0A067EMD7	12	72,39	Não caracterizada
A0A067GES4	7	102,89	Não caracterizada
A0A067F6J4	3	15,76	Não caracterizada
A0A067F699	7	50,30	Não caracterizada
A0A067EXA7	5	51,11	Não caracterizada
A0A067DSB8	20	177,52	Não caracterizada
A0A067G4J1	3	19,09	Não caracterizada
A0A067FWC3	4	28,72	Não caracterizada
A0A067HBZ2	11	75,14	Não caracterizada
A0A067GSW1	2	14,27	Não caracterizada
A0A067H3Y4	9	85,98	Não caracterizada
A0A067GXY9	2	11,81	Não caracterizada
A0A067DH70	2	11,11	Não caracterizada
A0A067FLB7	8	57,80	Não caracterizada
A0A067DL13	7	69,02	Não caracterizada
A0A067D2G0	2	15,80	Não caracterizada
A0A067ERM7	2	12,30	Não caracterizada
A0A067FD42	2	12,21	Não caracterizada
A0A067E3Z2	2	11,69	Não caracterizada
A0A067EMK3	3	23,93	Não caracterizada
A0A067DYK7	3	18,21	Não caracterizada
A0A067DRQ5	8	73,10	Não caracterizada
A0A067EJL7	7	71,44	Não caracterizada
A0A067GV53	2	19,84	Não caracterizada
A0A067EU92	4	42,08	Não caracterizada
A0A067FTT2	3	26,10	Não caracterizada
A0A067E153	2	11,58	Não caracterizada
A0A067FVB0	4	26,76	Não caracterizada

Acesso	Número de peptídeo	Score ^a	Descrição
A0A067G4U8	3	19,18	Não caracterizada
A0A067E5Z1	19	176,83	Não caracterizada
A0A067EV22	12	96,05	Não caracterizada
A0A067EIA2	4	26,73	Não caracterizada
A0A067DG75	3	17,98	Não caracterizada
A0A067F4K6	8	117,11	Não caracterizada
A0A067E4I5	5	31,28	Não caracterizada
A0A067FLS4	4	39,40	Não caracterizada
A0A067H1T2	2	11,61	Não caracterizada
A0A067DQV1	2	13,83	Não caracterizada
A0A067D4S4	3	20,02	Não caracterizada
A0A067FUB4	3	26,85	Não caracterizada
A0A067D3V4	2	12,47	Não caracterizada
A0A067DXF7	2	12,06	Não caracterizada
A0A067GNV4	3	23,79	Não caracterizada
A0A067DB88	3	16,47	Não caracterizada
A0A067FY25	2	13,88	Não caracterizada
A0A067ENN7	2	11,95	Não caracterizada
A0A067FX03	5	35,29	Não caracterizada
A0A067HDA8	3	22,07	Não caracterizada
A0A067E651	2	18,13	Não caracterizada
A0A067FW29	8	67,52	Não caracterizada
A0A067DN81	2	13,64	Não caracterizada
A0A067F4G4	2	10,94	Não caracterizada
A0A067FAZ5	2	12,05	Não caracterizada
A0A067FE06	4	30,04	Não caracterizada
A0A067EXX7	4	22,12	Não caracterizada
A0A067EKJ7	3	16,56	Não caracterizada
A0A067FXP2	3	18,24	Não caracterizada
A0A067ETB8	4	34,84	Não caracterizada
A0A067ESD6	26	262,25	Não caracterizada
A0A067DZN4	2	11,48	Não caracterizada
A0A067G2M6	2	10,58	Não caracterizada
A0A067ENH7	5	44,26	Não caracterizada
A0A067DFU6	6	37,55	Não caracterizada
A0A067DE17	9	108,17	Não caracterizada
A0A067DL24	2	23,28	Não caracterizada
A0A067FL45	2	11,33	Não caracterizada
A0A067G7P8	3	20,11	Não caracterizada
A0A067GK67	9	86,66	Não caracterizada
A0A067GBH1	2	13,19	Não caracterizada
A0A067F9V1	3	24,89	Não caracterizada
A0A067GSG0	3	16,43	Não caracterizada
A0A067EH25	12	82,75	Não caracterizada
A0A067DVC5	32	364,24	Não caracterizada
A0A067G1M7	5	28,79	Não caracterizada
A0A067FA15	2	12,18	Não caracterizada
A0A067EBP2	15	100,10	Não caracterizada
A0A067EYF9	3	22,49	Não caracterizada
A0A067ECJ4	2	11,13	Não caracterizada
A0A067EF67	7	46,94	Não caracterizada
A0A067DGQ3	6	51,15	Não caracterizada
A0A067EIF3	2	11,16	Não caracterizada
A0A067H9U1	2	12,21	Não caracterizada
A0A067G0G4	5	44,87	Não caracterizada
A0A067E075	2	12,58	Não caracterizada
A0A067DWZ6	4	25,05	Não caracterizada
A0A067G4G8	3	31,72	Não caracterizada

Acesso	Número de peptídeo	Score ^a	Descrição
A0A067EI24	2	10,17	Não caracterizada
A0A067GIJ4	27	271,88	Não caracterizada
A0A067F7P4	17	121,60	Não caracterizada
A0A067DXP4	3	17,68	Não caracterizada
A0A067HFS7	13	139,67	Não caracterizada
A0A067FK09	2	19,54	Não caracterizada
A0A067F028	2	13,16	Não caracterizada
A0A067ER04	2	12,73	Não caracterizada
A0A067CZM9	10	106,67	Não caracterizada
A0A067E1M1	3	16,78	Não caracterizada
A0A067FFC7	2	11,98	Não caracterizada
A0A067FSF4	12	118,04	Não caracterizada
A0A067G1H0	4	44,18	Não caracterizada
A0A067EQI9	2	11,19	Não caracterizada
A0A067ELU9	4	50,51	Não caracterizada
A0A067ESW8	3	29,64	Não caracterizada
A0A067GBE5	4	24,88	Não caracterizada
A0A067DM36	2	11,65	Não caracterizada
A0A067GHJ3	4	22,61	Não caracterizada
A0A067DWR4	3	16,81	Não caracterizada
A0A067E688	6	41,63	Não caracterizada
A0A067H3Y3	9	58,75	Não caracterizada
A0A067H782	3	20,10	Não caracterizada
A0A067GBH9	2	10,72	Não caracterizada
A0A067E2F8	6	49,16	Não caracterizada
A0A067FHT6	21	187,03	Não caracterizada
A0A067H357	2	10,53	Não caracterizada
A0A067ELA9	2	22,14	Não caracterizada
A0A067ES07	2	17,60	Não caracterizada
A0A067FNF7	2	12,31	Não caracterizada
A0A067ER50	6	44,83	Não caracterizada
A0A067DN85	2	16,67	Não caracterizada
A0A067EL60	2	19,70	Não caracterizada
A0A067FZX2	3	19,55	Não caracterizada
A0A067GXA5	16	131,47	Não caracterizada
A0A067FB67	8	62,57	Não caracterizada
A0A067DBJ9	2	11,90	Não caracterizada
A0A067E5M6	2	16,95	Não caracterizada
A0A067ETC4	23	244,67	Não caracterizada
A0A067ES72	3	17,73	Não caracterizada
A0A067FSC3	3	18,41	Não caracterizada
A0A067DCV2	5	31,64	Não caracterizada
A0A067FQC3	2	11,05	Não caracterizada
A0A067ES84	4	32,09	Não caracterizada
A0A067FEY0	4	22,77	Não caracterizada
A0A067DUF1	3	31,48	Não caracterizada
A0A067EYI3	2	11,62	Não caracterizada
A0A067ET14	2	11,53	Não caracterizada
A0A067E1J5	2	11,02	Não caracterizada
A0A067EH71	2	15,48	Não caracterizada
A0A067EX75	2	10,99	Não caracterizada
A0A067FG88	20	178,08	Não caracterizada
A0A067F1B3	2	14,30	Não caracterizada
A0A067DIV4	3	17,06	Não caracterizada
A0A067E3H9	4	31,56	Não caracterizada
A0A067DS53	5	29,26	Não caracterizada
A0A067EZIP9	8	52,47	Não caracterizada
A0A067HAS2	5	28,86	Não caracterizada

Acesso	Número de peptídeo	Score ^a	Descrição
A0A067EDP8	5	33,33	Não caracterizada
A0A067HCD2	2	11,37	Não caracterizada
A0A067DQ74	3	19,02	Não caracterizada
A0A067EAV9	2	10,73	Não caracterizada
A0A067FQX5	2	12,59	Não caracterizada
A0A067GKD3	2	11,85	Não caracterizada
A0A067G8Y3	6	74,77	Não caracterizada
A0A067GEG2	10	92,08	Não caracterizada
A0A067EBF5	2	19,08	Não caracterizada
A0A067FB18	9	55,89	Não caracterizada
A0A067GFE7	2	13,14	Não caracterizada
A0A067FNY5	5	43,53	Não caracterizada
A0A067FTC0	4	57,25	Não caracterizada
A0A067D941	2	10,58	Não caracterizada
A0A067F8V9	3	19,93	Não caracterizada
A0A067EQV8	13	113,79	Não caracterizada
A0A067H773	4	28,22	Não caracterizada
A0A067E431	2	12,20	Não caracterizada
A0A067DXU4	4	47,60	Não caracterizada
A0A067HB29	10	99,75	Não caracterizada
A0A067HEQ7	2	21,93	Não caracterizada
A0A067DGF8	2	13,52	Não caracterizada
A0A067D1G5	2	10,81	Não caracterizada
A0A067FRQ0	2	13,22	Não caracterizada
A0A067G463	2	13,27	Não caracterizada
A0A067E1E4	3	16,67	Não caracterizada
A0A067FSQ5	5	57,33	Não caracterizada
A0A067FP83	3	23,83	Não caracterizada
A0A067E2Q8	5	35,39	Não caracterizada
A0A067FQ46	4	25,84	Não caracterizada
A0A067GK34	3	30,51	Não caracterizada
A0A067FWQ7	5	44,43	Não caracterizada
A0A067GB51	3	23,70	Não caracterizada
A0A067FWS6	4	37,00	Não caracterizada
A0A067EDL8	2	11,08	Não caracterizada
A0A067GAB0	2	25,99	Não caracterizada
A0A067GFU6	5	40,21	Não caracterizada
A0A067EYE8	2	15,88	Não caracterizada
A0A067DEA2	2	12,50	Não caracterizada
A0A067HBF6	24	188,71	Não caracterizada
A0A067EZY8	3	17,25	Não caracterizada
A0A067D4F6	8	86,73	Não caracterizada
A0A067DZX8	12	73,31	Não caracterizada
A0A067FGQ2	2	11,61	Não caracterizada
A0A067EIK1	2	12,50	Não caracterizada
A0A067EVW7	5	35,22	Não caracterizada
A0A067H184	3	17,32	Não caracterizada
A0A067FQW5	12	110,69	Não caracterizada
A0A067GT96	5	35,77	Não caracterizada
A0A067EEQ2	2	12,60	Não caracterizada
A0A067GNJ3	3	21,79	Não caracterizada
A0A067DPP5	4	25,90	Não caracterizada
A0A067DKS8	9	73,52	Não caracterizada
A0A067ESI4	3	18,90	Não caracterizada
A0A067HCG3	2	10,82	Não caracterizada
A0A067DN94	24	209,28	Não caracterizada
A0A067FH02	6	71,75	Não caracterizada
A0A067EJZ1	3	21,70	Não caracterizada

Acesso	Número de peptídeo	Score ^a	Descrição
A0A067GCR2	2	12,28	Não caracterizada
A0A067DT74	2	10,93	Não caracterizada
A0A067FAB3	8	58,43	Não caracterizada
A0A067DEH3	2	19,10	Não caracterizada
A0A067G2B9	19	253,49	Não caracterizada
A0A067DLS9	3	25,15	Não caracterizada
A0A067FS25	5	38,39	Não caracterizada
A0A067EUU6	4	33,70	Não caracterizada
A0A067EP48	3	24,41	Não caracterizada
A0A067ERC6	8	78,70	Não caracterizada
A0A067GV42	2	11,92	Não caracterizada
A0A067FW99	4	21,71	Não caracterizada
A0A067H4L9	2	12,89	Não caracterizada
A0A067ECZ7	3	24,03	Não caracterizada
A0A067EGR7	4	27,38	Não caracterizada
A0A067DPX1	2	18,95	Não caracterizada
A0A067GIRO	2	13,02	Não caracterizada
A0A067ETU5	4	36,48	Não caracterizada
A0A067D335	2	10,28	Não caracterizada
A0A067GFA9	4	29,68	Não caracterizada
A0A067GYG4	2	13,13	Não caracterizada
A0A067E053	4	47,46	Não caracterizada
A0A067EUX6	4	24,26	Não caracterizada
A0A067HDT2	3	30,08	Não caracterizada
A0A067GPP9	8	55,32	Não caracterizada
A0A067FBH5	3	21,90	Não caracterizada
A0A067EJK7	3	25,50	Não caracterizada
A0A067G961	2	11,50	Não caracterizada
A0A067DEE6	19	153,39	Não caracterizada
A0A067FKI1	2	13,49	Não caracterizada
A0A067FMX6	5	30,15	Não caracterizada
A0A067G455	8	93,52	Não caracterizada
A0A067G231	12	84,57	Não caracterizada
A0A067EC26	2	24,56	Não caracterizada
A0A067GJW2	8	59,93	Não caracterizada

^a Os scores foram calculadas pelo Progenesis QI.