

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

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* E GERMINAÇÃO EM ARBÓREAS NATIVAS DA
MATA ATLÂNTICA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO**

ANA PAULA DE SOUZA RIOS

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO/2016**

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* E GERMINAÇÃO EM ARBÓREAS NATIVAS DA
MATA ATLÂNTICA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO**

ANA PAULA DE SOUZA RIOS

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia”.

**Orientadora: Prof^ª. Dra. Claudete Santa Catarina
Co-orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO/2016

**MORFOGÊNESE *IN VITRO* E GERMINAÇÃO EM ARBÓREAS NATIVAS DA
MATA ATLÂNTICA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO**

ANA PAULA DE SOUZA RIOS

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia”.

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dra. Beatriz dos Santos Ferreira (D.Sc. Biociências e Biotecnologia) – CEDERJ

Prof^a. Dra. Olga Lima Machado Tavares (D.Sc. Bioquímica) – UENF

Prof^a. Dra. Maura da Cunha (D.Sc. Ciências) – UENF

Prof. Dr. Vanildo Silveira (D.Sc. Biotecnologia) – UENF
(Co-orientador)

Prof^a. Dra. Claudete Santa Catarina (D.Sc. Biotecnologia) – UENF
(Orientadora)

Dedico ao Deus (EL SHADDAI), O "Deus Todo-Poderoso", por sempre me guiar em todas as etapas da minha vida e aos meus Pais, Irmãos, Cunhadas, Sobrinhos, Tios, Professores e amigos pelo carinho, dedicação, confiança, apoio e principalmente por possibilitarem meu crescimento quanto pessoa em cada amanhecer.

"Uma falsa ciência gera ateus,
mas a verdadeira ciência leva
os homens a se curvar diante
do Criador"

(Voltaire 1694 – 1778).

AGRADECIMENTOS

“Ao meu DEUS que me ensina todos os dias a sentir o Amor. Senhor sem sua presença a minha vida não teria amor, seria vazia, o meu caminho não teria destino e meus ideais não teriam sentido”. Deus o Senhor é Extraordinário.

Ao Pastor Josué Brandão, quantas vezes Deus usava vossa vida, nos Cultos ao Deus Altíssimo, para me trazer Renovo de Deus e Força de Deus para seguir e sonhar os sonhos Dele para mim. Deus lhe abençoe Muitíssimo meu estimado Pastor!

A minha Intercessora fiel, Pastora Gildete Rios, minha irmã você sempre me aconselhou e me ajudou em todos os momentos mais árduos que vivenciei nesse doutoramento. Como você foi Intrumento de Deus e é para minha vida. Minha irmã muito obrigada! Que Deus te faça grandes Maravilhas neste tempo chamado agora!!!! Deus te Bendiga!

Aos meus pais Juventino Rios e Euma Rios, aos meus irmãos Matheus Rios e Paulo Henrique Rios, Maria da Glória, às minhas cunhadas Vivyanne Rios Natva Rios e às sobrinhas Nathalia Rios, Priscila Rios, por estarem presentes em todos os momentos de conquistas e aflições no modo geral, por terem dado base sólida para vencer todos os obstáculos e principalmente por me amarem incondicionalmente. Vocês são meu tesouro na terra. Amo vocês! Muito Obrigada por Tudo! Palavras não podem expressar tamanha gratidão e o meu Amor por vocês.

A minha madrinha e tia Lucia Ramos Mateus, por todas as suas palavras de fé, por todas as vezes que me ligava para consolar-me pela saudade de todos, por financeiramente e espiritualmente ter plantado na minha vida e creio ainda nos frutos que virão para nossa vida minha tia amada. Tia Lúcinha, muito obrigada por ter confiado em mim em todos os momentos difíceis que passei. Deus ainda vai lhe recompensar pelas sementes de amor lançadas em minha vida.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Vanildo Silveira e Professora Dra. Claudete Santa Catarina...Deus me lembra aqui como tudo começou, e como foi difícil a caminhada, mas aprendi muito nestes anos. Obrigada por confiarem em mim até o fim e por me apoiarem sempre, mesmo diante das minhas limitações humanas. Sem Palavras!!! Meu Muito obrigada e jamais esquecerei nossas conversas, reuniões e os momentos de comemorações, nossos almoços, nossos jantares e nossas pizzas!!! Foi muito bom! Deus os Abençoe!

Aos meus tios que estão sempre presentes em minha vida: Salomão Mateus, Valdirene Mateus, muito obrigada pelas orações e por me ajudarem de todas as maneiras para a realização deste trabalho;

Aos meus sobrinhos Marcos Mateus, Lucas Mateus, Vitória Lima, Thiago Maciel...meus queridos sem vocês, com certeza, minha vida seria como uma flor sem perfume, ou como um céu sem estrelas e sem cor, um oceano sem água...Vocês são parte do Reino de DEUS. Obrigada meus amores pelos olhares de amor e por todas as vezes que me perguntavam: “ Dinda a senhora acabou o seu dever da escola ou seus estudos?”. Hoje posso dizer a vocês que já acabei sim uma etapa do meu dever de casa..

Aos meus primos Augusto César e Ilka Áurea por todos os incentivos que me deram. Obrigada viu!

A Dra. Cristina Nepomuceno e a Dra. Alone Rios, minhas amigas Biólogas e minhas irmãs em Cristo, obrigada pelas vossas Palavras de Consolo e Encorajamento. Pela confiança, por acreditarem que eu concluiria mesmo em meio as dificuldades. Vocês são demais!!!! Minha gratidão é eterna!!! Obrigada amigas. Amigas para todo tempo.

Ao meu eterno Professor e Amigo Dr. José Raniere Santana, meu querido Amigo e Irmão em Cristo, muito obrigada pelas Palavras e pelos ensinamentos e principalmente pelo apoio que recebi nos dias mais difíceis neste doutoramento. Deus te recompense pelo que semeou na minha vida.

Aos pesquisadores colegas do LBT e LBCT – UENF, pelo desejo para que tudo corresse muitíssimo bem; Obrigada meus colegas. À todos meu muito obrigada! A Tatiana e colegas Bruno, Carol, André, Yrexam e Lidia e aos doutorandos Jackellinne, Bianca, Ellen, Victor, Lucas, Ricardo...Obrigada pelas contribuições em todos os sentidos. Vocês são brilhantes !

Aos funcionários que prestam serviços ao LBT e LBCT. Obrigada queridos!

E, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia - UENF, à pessoa da amiga Beatriz, pelo seu carinho, compreensão e atenção sem medida. Às Professoras Kátia e Olga por serem tão compreensivas e amigas, além de Coordenadoras da Pós.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

Meu Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 A MATA ATLÂNTICA	4
2.2 ESPÉCIES DE ESTUDO.....	6
2.3 GERMINAÇÃO DA SEMENTE.....	7
2.4 MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	10
3 OBJETIVOS	13
3.1 OBJETIVO GERAL.....	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4 CAPÍTULO 1: ALTOS NÍVEIS DE SACAROSE, ESPERMINA E ESPERMIDINA ESTÃO RELACIONADOS COM A GERMINAÇÃO INICIAL EM <i>PLATHYMENIA FOLIOLOSA</i> COMPARADO COM <i>DALBERGIA NIGRA</i>*	14
4.1 RESUMO	14
4.2 INTRODUÇÃO	15
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.3.1 Material vegetal e germinação da semente.....	17
4.3.2 Determinação de açúcares solúveis	18
4.3.3 Determinação de PAs livres	19
4.3.4 Determinação de aminoácidos livres	19
4.3.5 Análises estatísticas.....	20
4.4 RESULTADOS.....	21
4.4.1 Germinação da semente	21
4.4.2 Carboidratos solúveis.....	23
4.4.3 Conteúdo de PAs livres	24
4.4.4 Conteúdo de aminoácidos livres	26
4.5 DISCUSSÃO	27
4.6 CONCLUSÕES.....	32
5 CAPÍTULO 2: MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i> EM ESPÉCIES ARBÓREAS AMEAÇADAS DE EXINÇÃO.....	33
5.1 RESUMO	33
5.2 INTRODUÇÃO	34
5.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.3.1 Material vegetal	35
5.3.2 Germinação <i>in vitro</i> para estabelecimento de culturas assépticas	35
5.3.3 Efeito do tipo de explante e reguladores de crescimento na morfogênese <i>in vitro</i> em <i>M. brauna</i> e <i>D. nigra</i>	35
5.3.4 Efeito de diferentes reguladores de crescimento vegetal na morfogênese <i>in vitro</i> em segmentos nodais apicais e cotiledonares de <i>P. foliolosa</i>	37
5.3.5 Enraizamento <i>ex vitro</i> e aclimatização em <i>M. brauna</i> e <i>P. foliolosa</i>	38
5.3.6 Análise estatística.....	38
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.4.1 Efeito do tipo de explante e reguladores de crescimento na morfogênese <i>in vitro</i> em <i>M. brauna</i> e <i>D. nigra</i>	39
5.4.2 Efeito de diferentes reguladores de crescimento vegetal na morfogênese <i>in vitro</i> em segmentos nodais apicais e cotiledonares de <i>P. foliolosa</i>	52
5.4.3 Enraizamento <i>ex vitro</i> e aclimatização em <i>M. brauna</i> e <i>P. foliolosa</i>	67
5.5 CONCLUSÕES.....	68
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

RESUMO

Os recursos florestais envolvendo espécies nativas tem sido historicamente explorados de maneira extrativista, resultando na ameaça de extinção para várias espécies arbóreas. Além disso, a floração esporádica, a baixa viabilidade das sementes e o crescimento lento resultam num número reduzido de programas de reflorestamento com as espécies nativas. Neste sentido, estudos bioquímicos associados com a germinação e aplicações biotecnológicas, como a micropropagação, podem representar alternativas viáveis para propagação e conservação de espécies florestais nativas que se encontram ameaçadas, com potencial relevante de aplicação para programas de conservação e recuperação de áreas degradadas. Neste contexto, o objetivo geral foi analisar alterações bioquímicas associadas a germinação de sementes e estabelecer estudos de morfogênese *in vitro* em espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, como a *Dalbergia nigra*, *Melanoxylon brauna* e *Plathymenia foliolosa*. A germinação foi realizada em *P. foliolosa* e *D. nigra*. Sementes de *P. foliolosa* completaram a germinação antes de *D. nigra*. O alto conteúdo de sacarose em sementes maduras e aumento crescente no conteúdo de espermidina e espermina durante a embebição (Fase I) e protusão radicular (Fase II) em *P. foliolosa* pode estar relacionado com a germinação inicial nesta espécie. O alto conteúdo de glicose e a presença de maltose em sementes maduras e nas fases I e II podem estar associadas com o maior tempo necessário para a germinação de sementes de *D. nigra*. Conteúdos de putrescina livre e frutose são necessários para o crescimento das plântulas (fase III) em ambas as espécies. Estudos de micropropagação foram realizadas para as três espécies alvo. Em *M. brauna* e *D. nigra*, explantes oriundos de segmentos nodais apicais, intermediários e cotiledonares foram responsivos aos tratamentos com benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) e isolados ou combinados entre si, enquanto segmentos de hipocótilos, epicótilos e folíolos inteiros não apresentaram resposta morfogênética. A resposta para número e comprimento de brotos para cada espécie foi dependente do tipo de explante e dos tratamentos utilizados. Em *M. brauna* segmentos nodais apicais e intermediários possibilitaram melhor resposta comparativamente aos cotiledonares, sugerindo o uso de 5 μM de BAP para realizar a propagação *in vitro*. Em *D. nigra* sugere-se o uso de segmentos nodais cotiledonares e intermediários para a propagação, utilizando-se os tratamentos com 4 μM de ANA + 20 μM de BAP e 10 μM de BAP, respectivamente. Em *P. foliolosa* verificou-se respostas nos segmentos nodais apicais e cotiledonares para a propagação, usando os tratamentos controle e com 2,5 μM de ANA + 20 μM de BAP, respectivamente. Verificou-se ainda formação de calos em *P. foliolosa* para a maioria dos tratamentos, obtendo-se gemas vegetativas, porém estas não alongaram em brotações. Os resultados obtidos neste estudo são inéditos para estas espécies, e mostram compostos associados com a germinação, assim como, os diferentes tipos de explantes respondem diferenciadamente, em cada espécie, os diferentes tratamentos utilizados.

Palavras chave Aminoácidos, Arbóreas nativas, *Dalbergia nigra*, Germinação, *Melanoxylon brauna*, Micropropagação, *Plathymenia foliolosa*, Poliaminas

ABSTRACT

Forest resources involving native species have been historically exploited in an extractive way, resulting in the threat of extinction for various tree species. In addition, sporadic flowering, low seed viability and slow growth result in a reduced number of programs of reforestation with native species. In this sense, biochemical studies related with germination and micropropagation may represent viable alternatives for propagation and conservation of native wood species endangered, with significant potential application to conservation programs and recovery of degraded areas. In this context, the objective was to analyze biochemical changes associated with seed germination and establish studies of in vitro morphogenesis in native tree species of the Mata Atlântica, such as *Dalbergia nigra*, *Melanoxylon brauna* and *Plathymenia foliolosa*. Germination was performed in *P. foliolosa* and *D. nigra*. *P. foliolosa* seeds completed germination before *D. nigra*. The high sucrose content in mature seeds and increase in spermidine and spermine content during imbibition (Phase I) and root protrusion (Phase II) in *P. foliolosa* may be related to the initial germination in this species. The high content of glucose and the presence of maltose in mature seeds in Phases I and II may be associated with longer time necessary for germination of seeds in *D. nigra*. Content of free putrescine and fructose are necessary for the seedling growth (phase III) in both species. Micropropagation studies were performed for the three target species. In *M. brauna* and *D. nigra*, explants from apical, intermediary and cotyledonary nodal segments were responsive to treatments used, while segments of hypocotyl, epicotyl and foliar showed no morphogenetic response. The response to number and length of shoots for each species was dependent on the type of explant and treatments used. In *M. brauna* apical and intermediary nodal segments allow the better response compared to cotyledonary, using 5 μM BAP to perform in vitro propagation. In *D. nigra* the use of cotyledonary and intermediary nodal segments were suggested for propagation, using 4 μM ANA + 20 μM BAP and 10 μM BAP treatments, respectively. In *P. foliolosa* shoots were developed from apical and cotyledonary nodal segments using the control and 2.5 μM ANA + 20 μM BAP treatments, respectively. It was also found callus formation in most treatments used in *P. foliolosa*, inducing the formation of vegetative buds, but these do not elongated to shoots formation. The results of this study are unpublished for these species, and show differences on compounds associated with the germination, as well as the differently responses according the types of explants and different treatments in each species.

Keywords: Amino acids, *Dalbergia nigra*, Germination, Native trees, *Melanoxylon brauna*, Micropropagation, *Plathymenia foliolosa*, Polyamines.

1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais da Mata Atlântica localizada na encosta Atlântica brasileira foram intensamente exploradas especialmente, para a obtenção de madeira de qualidade (Lima e Capobianco, 1997; Colombo e Joly, 2010). Assim a Mata Atlântica desde o século passado, está reduzida a pequenos fragmentos florestais por conta da exploração de vários tipos de madeira e a substituição da mata nativa por plantações de cana-de-açúcar, café, cacau ou pasto e assim têm reduzido a floresta a pequenos remanescentes, restando atualmente, 7% da sua área original (Câmara, 2003; Mittermeier et al., 2004; Colombo e Joly, 2010).

Em decorrência desta intensa exploração, muitas espécies da Mata Atlântica encontram-se atualmente ameaçadas de extinção e de acordo com a classificação da Red List da International Union of Conservation Nature (IUCN 2015). Em virtude de sua riqueza biológica e estado atual de degradação, a Mata Atlântica foi apontada como um dos hotspots mundiais, ou seja, uma das prioridades para a conservação de biodiversidade em todo o mundo (Myers et al., 2000; Mittermeier et al., 2004).

Levantamentos florísticos e estudos fitossociológicos realizados no Brasil em várias regiões da Mata Atlântica já atestaram a importância da família Leguminosae na composição e estrutura desse bioma. Em estudos realizados no estado de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, Leguminosae está entre as famílias mais bem representadas em número de espécies (Silva e Tozzi, 2013).

Destacam-se algumas espécies arbóreas da família Leguminosae de ocorrência no Estado do Rio de Janeiro tais como *Dalbergia nigra*, *Melanoxylon brauna* e *Plathymeria foliolosa*. Estas espécies foram intensamente exploradas por conta das suas madeiras e encontrando-se, apenas poucas plantas remanescentes nos seus locais de ocorrência (Lorenzi, 2002). Como consequência da forte exploração antrópica, estas espécies encontram-se na lista das espécies que sofrem ameaças de extinção (IUCN 2010; IBAMA, 2012).

O grande desafio deste século é o desenvolvimento de alternativas biotecnológicas eficazes para a conservação e recuperação da Mata Atlântica, pois além de tantos fatores antrópicos da exploração predatória e ocupação do mesmo, a falta de conhecimento sobre a biologia reprodutiva e fisiologia do desenvolvimento, o crescimento lento, a floração esporádica e a baixa viabilidade das sementes de algumas espécies, representam obstáculos para a regeneração natural e produção de mudas para programas de reflorestamento com espécies arbóreas nativas.

A aplicação de técnicas biotecnológicas pode ser uma alternativa viável para a propagação das espécies arbóreas, principalmente por que nestas espécies, os métodos de propagação por estaquia são de difícil controle, devido à relação inversa entre a idade das plantas doadoras e a capacidade de enraizamento das estacas, bem como as sementes apresentarem baixa viabilidade quando armazenadas por longos períodos e baixa taxa de germinação (Jain e Ishii, 1998).

Assim, visando o estabelecimento de programas para recuperação de áreas degradadas, a utilização da cultura *in vitro* de células vegetais é considerada uma alternativa promissora na propagação e produção de mudas de espécies florestais de interesse para futuros estudos de conservação de germoplasma, propagação, e também, produção comercial. Como uma alternativa à técnicas silviculturais, a propagação *in vitro* tem um grande potencial para micropropagar espécies que: (a) ainda não foram domesticadas, como é o caso das espécies arbóreas nativas, (b) que apresentam dificuldades de serem propagadas por metodologias tradicionais e (c) cujas sementes apresentam baixa viabilidade.

A propagação *in vitro* de espécies lenhosas tem sido realizados via embriogênese somática e organogênese (Attree e Fowke, 1993; Jain et al., 1995a, b; Park et al., 1998; Santa-Catarina et al., 2001; Steiner et al., 2008; Oliveira, 2010), visando diferentes objetivos, que vão desde a obtenção de um modelo referência para estudos básicos em fisiologia e bioquímica, até propagação clonal, incluindo a conservação em várias espécies (Attree e Fowke, 1993; Jain e Ishii, 1998; Park et al., 1998; Minocha et al., 1999; Astarita et al., 2003a,b; Silveira et al., 2004a,b; Silveira et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009). A indução da organogênese depende de sinalizações específicas que possibilitem a manifestação da competência para o sucesso da resposta morfogênica *in vitro* (Féher et al., 2003), sendo necessário analisar o efeito de diferentes reguladores de crescimento vegetal, como auxinas e citocininas, na indução, multiplicação das brotações, bem como o enraizamento destas, do meio de cultura, e das condições de cultura como temperatura, fotoperíodo, e da espécie. Estes parâmetros são fundamentais para estabelecer as condições de propagação *in vitro* para cada espécie. Assim, estudos biotecnológicos podem contribuir para a conservação de espécies presentes nesse importante bioma que é a Mata Atlântica.

O estabelecimento de novas estratégias de conservação das espécies florestais nativas exige também informações sobre os aspectos bioquímicos e fisiológicos que controlam o desenvolvimento embrionário e o processo de germinação de sementes. A ontogênese do embrião e a germinação de sementes são processos de desenvolvimento que

resultam de um complexo controle espacial e temporal, onde vários hormônios atuam na regulação da expressão de múltiplos genes (Barendse e Peeters, 1995). Dentre os reguladores e sinalizadores destes processos temos as poliaminas (PAs), aminoácidos, açúcares solúveis e perfil de proteínas associados aos diferentes eventos.

Estudos têm sido desenvolvidos no sentido de identificar marcadores bioquímicos e moleculares associados ao desenvolvimento da embriogênese zigótica e durante a germinação de sementes de espécies arbóreas nativas, especialmente associado com os níveis de PAs, aminoácidos, ácido abscísico (ABA) e auxinas (Astarita et al., 2003a,b,c; Silveira et al., 2004b; Santa-Catarina et al., 2006; Balbuena et al., 2009; Cangahuala-Inocente et al., 2009; Dias et al., 2009, 2010; Aragão et al., 2015), embora ainda seja para um número reduzido de espécies arbóreas.

Desta forma o estudo exposto é relevante para a a compreensão destes processos que utilizam a biotecnologia para a contribuição científica e para conservação de espécies nativas da Mata Atlântica, tendo por objetivo identificar os marcadores bioquímicos associados a germinação de sementes e estabelecer estudos de morfogênese *in vitro* em espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, ameaçadas de extinção, de ocorrência no Estado do Rio de Janeiro, em especial na Região Centro-Norte Fluminense.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Mata Atlântica

A Mata Atlântica está localizada na encosta Atlântica brasileira entre as latitudes 6°S e 30°S e longitudes 30°W e 50°W, com altitudes variando do nível do mar até 2700 metros (Lima e Capobianco, 1997). Encontra-se distribuída no Brasil e apresenta grandes variações de relevo, nos regimes pluviométricos e nas unidades fitogeográficas, as quais contribuem para a grande biodiversidade deste ecossistema (Silva e Casteleti, 2003). Sua área de cobertura inclui em seu domínio a Floresta Ombrófila Densa (FOD), Floresta Ombrófila Mista (FOM), Floresta Ombrófila Aberta (FOA), Floresta Estacional Semidecidual (FES), Floresta Estacional Decidual (FED). Há também, na formação vegetal de Mata Atlântica, os ecossistemas associados, que por sua vez recebem influência direta das águas do mar e dos ventos litorâneos, como é o caso dos manguezais e restingas (Fundação SOS Mata Atlântica, 2010).

Ao longo dos anos, desde o século passado, a Mata Atlântica vem sendo reduzida a pequenos fragmentos florestais por conta da exploração de vários tipos de madeira e a substituição da mata nativa por plantações agrícolas e pastagem, e assim têm reduzido a floresta a pequenos remanescentes. A maior parte dos remanescentes contínuos da Mata Atlântica está localizada principalmente na costa do estado de São Paulo e do Paraná, no sudeste do Brasil, devido principalmente ao relevo irregular da Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba (Câmara, 2003; Mittermeier et al., 2004). Sabe-se que a ação antrópica como: caça predatória, queimada, desmatamento e degradação do solo têm impactado significativamente o perfil natural deste importantíssimo bioma. Estes sucessivos impactos resultantes de diferentes ciclos de exploração, de concentração da população e dos maiores núcleos urbanos e industriais levaram a uma drástica redução na cobertura vegetal natural, que hoje está restringida a 7% da sua área original (Câmara, 2003; Mittermeier et al., 2004).

O aumento do número de espécies ameaçadas na Mata Atlântica está relacionado a estes vários impactos que ocorreram na mesma. A ocupação do território começou pela costa brasileira devido à facilidade de acesso, fazendo com que a exploração se concentrasse nesta região (Dean, 2002; Tonhasca, 2005). A grande ocorrência de espécies endêmicas e a elevada quantidade de espécies arbóreas com potencial exploratório (Lorenzi, 2002), tornaram as espécies, deste bioma, vulneráveis à extinção. Em virtude de sua riqueza biológica e o estado atual de degradação, a Mata Atlântica foi apontada como

um dos *hotspots* mundiais, ou seja, uma das prioridades para a conservação de biodiversidade em todo o mundo (Myers et al., 2000; Mittermeier et al., 2004). A região da Mata Atlântica abriga mais de 60% da população brasileira e é responsável por quase 70% do PIB nacional (Brasil et al., 2000).

Tonhasca (2005) fez uma síntese dos levantamentos fitossociológicos realizados neste bioma, mostrando as famílias com predomínio de vegetação arbórea na Mata Atlântica e são elas: Leguminosae, Myrtaceae, Melastomataceae, Rubiaceae, Arecaceae, Lauraceae, Euphorbiaceae, Bignoniaceae e Meliaceae. Dentre estas, a família Leguminosae, constituída por aproximadamente 727 gêneros e 19.327 espécies (Lewis e Warwick 2003; Lewis et al. 2005), é a segunda maior família de eudicotiledôneas em número de espécies e a segunda mais importante economicamente no mundo, ficando atrás apenas de Poaceae. É composta por três subfamílias: Caesalpinioideae que é formada por quatro tribos, 171 gêneros e 2.250 espécies; Mimosoideae, constituída de quatro tribos, 78 gêneros e 3.270 espécies e Papilionoideae ou Faboideae, que é a maior das três subfamílias, compreende 28 tribos de 478 gêneros e 13.800 espécies (Lewis et al., 2005).

Para o Brasil foram catalogados cerca de 212 gêneros e 2.720 espécies de Leguminosae (Lima et al., 2012), cuja ocorrência é muito significativa na maioria dos tipos vegetacionais, em especial da Floresta Atlântica, onde a família possui elevada representatividade entre os elementos do estrato arbóreo (Lima, 2000). Estimativas recentes de Lima et al. (2009) listam 945 espécies de Leguminosae para a Floresta Atlântica.

Levantamentos florísticos e estudos fitossociológicos realizados no Brasil em várias regiões da Floresta Atlântica já atestaram a importância da família Leguminosae na composição e estrutura desse bioma. Em estudos realizados no estado de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, Leguminosae está entre as três famílias mais bem representadas em número de espécies. (Silva e Tozzi, 2013).

Destacam-se algumas espécies arbóreas da família Leguminosae de ocorrência no Estado do Rio de Janeiro tais como *Dalbergia nigra*, *Melanoxylon brauna* e *Plathymenia foliolosa*. Estas espécies foram intensamente exploradas devido ao valor econômico da madeira, encontrando-se número reduzido de plantas remanescentes nos seus locais de ocorrência da FOD, FES e restinga (Lorenzi, 2002). Como consequência da forte exploração antrópica, estas espécies encontram-se na lista das espécies que sofrem ameaças de extinção (IUCN 2010; IBAMA, 2012).

Muitas espécies arbóreas encontram-se em risco de extinção devido ao alto valor comercial de seus produtos madeireiros e não madeireiros, os quais são explorados

exaustivamente nas florestas brasileiras, sem que ocorra planejamento sustentável (Matos e Bovi, 2002; Peres et al., 2003).

O grande desafio deste século é o desenvolvimento de alternativas eficazes para a conservação e recuperação da Mata Atlântica, pois além de tantos fatores antrópicos da exploração predatória e ocupação do mesmo, a falta de conhecimento sobre a biologia reprodutiva e fisiologia do desenvolvimento, o crescimento lento, a floração esporádica e a baixa viabilidade das sementes de algumas espécies, representam obstáculos para a regeneração natural e produção de mudas para programas de reflorestamento com espécies arbóreas nativas.

A aplicação de técnicas biotecnológicas pode ser uma alternativa viável para a propagação das espécies arbóreas, principalmente por que nestas espécies, os métodos de propagação por estaquia são de difícil controle, devido à relação inversa entre a idade das plantas doadoras e a capacidade de enraizamento das estacas, bem como as sementes apresentam baixa viabilidade quando armazenadas por longos períodos e baixa taxa de germinação (Jain e Ishii, 1998).

2.2 Espécies de estudo

Dentre as espécies de importância econômica e ecológica, a *D. nigra*, *M. brauna* e *P. foliolosa* foram utilizadas como espécies alvo para o estudo. A espécie *D. nigra*, conhecida popularmente como jacarandá-da-bahia, é uma árvore perenifólia a semicaducifólia, com características de secundária tardia a clímax e exclusiva da FOD dos Estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Lorenzi, 1992). É uma espécie com alto potencial para o manejo florestal sustentável. Entre as principais estão a sua facilidade de comercialização no mercado atual, por sua madeira de alta qualidade (Embrapa Florestas, 2003).

A espécie *M. brauna*, conhecida popularmente por braúna preta, é uma árvore nativa da Mata Atlântica, conhecida pela qualidade e durabilidade de sua madeira, sendo encontrada desde o sul da Bahia até São Paulo, Minas Gerais (Lorenzi, 1992), Goiás, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Maranhão e Piauí (IBAMA, 2012).

P. foliolosa, popularmente conhecida como vinhático, é uma árvore de ambientes florestais (Lorenzi, 2002). A espécie chega a alcançar 30 m de altura e mais de 70 cm de diâmetro de tronco (Lorenzi, 2002), estende-se no território brasileiro pela Floresta Atlântica, de São Paulo a Pernambuco, porém com maior frequência no Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Rizzini, 1978).

2.3 Germinação da semente

Define-se germinação por uma sequência de eventos morfogênicos decorrentes da retomada da atividade metabólica do embrião, envolvendo transformações físicas e bioquímicas que o transformam em uma plântula (Ferreira e Borghetti, 2004; Marcos Filho, 2005). Alguns autores consideram germinação com o surgimento da radícula dentro do conceito botânico (Ferreira e Borghetti, 2004).

Fatores como luz, temperatura, água, rigidez do tegumento, oxigênio, patógenos, entre outros, influenciam o processo germinativo (Silveira et al., 2005; Marcos Filho, 2005). Entretanto, cada espécie responde de forma específica a um único fator ou a interação destes fatores durante a germinação. Para a maioria das espécies arbóreas nativas existem ainda poucas informações sobre a fisiologia da germinação, e deve-se considerar a grande diversidade de sementes que muito variam em seus aspectos morfológicos e fisiológicos e nas respostas aos estímulos ambientais (Scalon et al., 2003).

A embriogênese zigótica marca o início do complexo ciclo de vida das plantas, e o desenvolvimento do embrião zigótico ocorre através dos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, culminando no desenvolvimento da plântula jovem, após a germinação. Na fase final do desenvolvimento da maioria das sementes, a maturação dos embriões zigóticos precedida pela desidratação são eventos normais, após os quais, as sementes passam para um estado metabolicamente quiescente, podendo permanecer neste estado por anos, como é o caso das sementes ortodoxas (Hoekstra et al., 2001; Gallardo et al., 2002). No entanto, as sementes recalcitrantes são aquelas que não toleram uma alta desidratação durante a maturação, e por isso não podem ser armazenadas por um longo período, perdendo a viabilidade após poucos meses de armazenamento (Bewley e Black, 1994), como é o caso da *Ocotea odorifera* (Santa-Catarina et al., 2001) e *Ocotea catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2006).

Em condições favoráveis de umidade, a semente, caso não apresente dormência, tem o seu metabolismo reativado e inicia o processo de germinação, que pode ser dividido em três fases: embebição, aumento da atividade metabólica e início do crescimento (Bewley e Black, 1994). Morfologicamente, o início do crescimento corresponde à emergência da radícula e o subsequente crescimento é geralmente definido como crescimento da plântula (Gallardo et al., 2002).

Alguns estudos tem sido desenvolvidos pelo grupo de pesquisa no sentido de identificar marcadores bioquímicos associados ao desenvolvimento da embriogênese

zigótica e durante a germinação de sementes de espécies arbóreas nativas, especialmente associado com os níveis de poliaminas (PAs), carboidratos solúveis, aminoácidos, ácido abscísico (ABA), auxinas e análises proteômica (Astarita et al., 2003a,b,c; Silveira et al., 2004b; Santa-Catarina et al., 2006; Balbuena et al., 2009; Cangahuala-Inocente et al., 2009; Dias et al., 2009, 2010; Aragão et al., 2015), embora ainda seja para um número reduzido de espécies arbóreas. O melhor entendimento do metabolismo bioquímico durante o processo germinativo das sementes destas espécies em estudo é de fundamental importância tanto do ponto de vista de estudos básicos, considerando a importância destes compostos na germinação, quanto para manejo, armazenamento e conservação das sementes, uma vez que um grande número de espécies arbóreas nativas da região da Mata Atlântica apresentam baixa viabilidade durante o armazenamento devido a recalcitrância de suas sementes.

Dentre os compostos sinalizadores durante o desenvolvimento embrionário e germinação pode ser citados as PAs, aminoácidos e açúcares solúveis. As PAs são aminas alifáticas presentes em todos os organismos vivos, e nas plantas atuam na regulação de vários processos, como a biossíntese de macromoléculas, divisão e diferenciação celular, organogênese, embriogênese e germinação (Bouchereau et al., 1999; Minocha et al., 1999; Shoeb et al., 2001; Silveira et al., 2004a,b; Silveira et al., 2006; Santa Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009; Balbuena et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011; Aragão et al., 2015). As principais PAs encontradas nas plantas superiores são a Put (putrescina), a Spd (espermidina) e a Spm (espermina), ocorrendo na forma livre ou conjugada com ácidos fenólicos e moléculas de baixo peso molecular (Bouchereau et al., 1999; Kuznetsov et al., 2006).

Durante a germinação em sementes de arbóreas nativas, estudos mostram a participação das PAs neste processo (Santa-Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011; Aragão et al., 2015). Foi mostrado que os níveis de PAs são alterados durante a germinação de sementes de *O. catharinensis*, no qual os níveis de Put aumentam no início da germinação, enquanto os níveis de Spd e Spm decresceram durante todo o período de germinação (Dias et al., 2009). Estes estudos são importantes para entender o papel destes compostos nestes processos morfogênicos.

A síntese protéica é uma das principais formas de reserva durante o desenvolvimento embrionário, sendo regulada pelo suprimento de nutrientes e aminoácidos livres (Shewry et al., 1995). Nas sementes, os níveis de aminoácidos são alterados ao longo do desenvolvimento, refletindo as alterações entre a produção e a utilização destas moléculas, podendo pequenas alterações na taxa da síntese protéica causar grandes

flutuações nos níveis dos aminoácidos (Macnicol, 1983). Uma absorção ativa de aminoácidos pelos cotilédones é aparente durante os estágios finais do desenvolvimento de embriões, quando grandes quantidades de proteínas de reserva são sintetizadas nas sementes (Santa-Catarina et al., 2006).

Segundo Durzan e Chalupa (1976), as alterações nos níveis de aminoácidos livres durante a embriogênese sugerem um efetivo controle genético quanto ao metabolismo do nitrogênio, determinando forma de crescimento, volume e massa seca da semente. Assim, os aminoácidos armazenados durante o desenvolvimento da semente são utilizados no processo de germinação, servindo como nutrientes e substrato para o desenvolvimento inicial da plântula até o autotrofismo (Rock e Quatrano, 1995; Santa-Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009).

Os aminoácidos representam os produtos iniciais de assimilação primária durante a germinação das sementes (Ortiz-Lopez et al., 2000). O padrão de aminoácidos totais foi observado durante a germinação de sementes de *O. catharinensis*, no qual valores máximos foram observados na fase de semente madura e após o processo germinativo (Dias et al., 2009). Este aumento no conteúdo de aminoácidos no final da germinação pode estar relacionado com a síntese de novos aminoácidos pelas plântulas em desenvolvimento, cujos compostos serão utilizados para o seu crescimento (Coruzzi e Last, 2000).

Em sementes da espécie lenhosa *Qualea grandiflora* não foi verificado redução no teor de nitrogênio nos cotilédones durante a germinação (Paulilo e Felipe, 1994). Por outro lado, resultados obtidos por Suda e Giorgini (2000) evidenciam a translocação de aminoácidos provenientes da degradação de proteínas de reserva dos cotilédones para o embrião em *Euphorbia heterophylla* e da mesma forma em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Borges et al., 2005). Em *Apuleia leiocarpa* e em *Cedrela fissilis* foi demonstrada a mobilização de reservas dos cotilédones para o eixo embrionário no processo de embebição durante a germinação (Pontes et al., 2002).

Dentre as substâncias de reserva, os carboidratos são fontes de energia para células e estruturas de carbono para os processos de biossíntese (Corte et al., 2006; Pescador et al., 2008). A utilização destas reservas é variável de espécie para espécie durante a germinação e crescimento da plântula (Pontes et al., 2002).

A disponibilidade de açúcares é um importante direcionador do crescimento e desenvolvimento embrionário e na germinação de sementes uma vez que estes compostos atuam como substrato intermediário para o metabolismo e como moléculas sinalizadoras (Baud et al., 2002; Smeekens et al., 2010). Durante a germinação e crescimento da plântula, reservas do cotilédone são degradadas e seus produtos, translocados para os

pontos de crescimento do embrião e da plântula em desenvolvimento, em que são usados para vários processos metabólicos (Kandler e Hopf, 1980; Borges et al., 2002, 2005).

A mobilização pode também ser variável entre os diferentes compartimentos da semente durante a embebição, de cotilédones para eixo embrionário (Pontes et al., 2002; Dantas et al., 2008). Para tanto, cada espécie realiza a mobilização de determinadas reservas que serão úteis para a formação de estruturas físicas, como parede celular, ou para respiração, sintetizando intermediários metabólicos com finalidades diversas no metabolismo celular (Borges, 2003; Buckeridge et al., 2004).

Sendo assim o conhecimento do metabolismo dos açúcares solúveis em cada espécie no processo germinativo é importante para a compreensão da importância das reservas dos mesmos durante os eventos germinativos.

2.4 Morfogênese *in vitro*

A cultura de tecidos possui um papel importante na preservação e multiplicação de espécies nativas que estejam em vias de extinção, pois possibilita a obtenção de um grande número de plantas e por propagar espécies que apresentam dificuldades de propagação por métodos convencionais, como estaquia ou sementes. Isto é possível graças ao conceito de totipotência preconizada por Haberlandt em 1902, que dita que todas as células de um indivíduo possuem capacidade de gerar um novo indivíduo (George et al., 2008).

As células cultivadas *in vitro* podem manifestar sua totipotência por duas principais rotas: organogênese, que conduz a diferenciação de órgãos como meristemas, brotos e raízes; e embriogênese somática, que conduz a formação de embriões somáticos, seguindo as fases de desenvolvimento similares do embrião zigótico, embora devidamente sem fecundação (Segura, 1993).

A organogênese é uma via de regeneração muito utilizada em cultura de tecidos. É o processo pelo qual as células somáticas são induzidas a mudanças que levarão a formação de uma estrutura unipolar denominada primórdio caulinar ou radicular (Thorpe, 1994). No caso do explante já possuir células meristemáticas ou meristemas pré-existent, ocorrerá a organogênese direta, e quando há a formação de calo antes do estabelecimento das células competentes, ocorrerá a organogênese indireta (Peres, 2002).

Segundo Christianson e Warnick (1988) o processo de organogênese pode ser dividida em três fases: aquisição de competência, indução e diferenciação. Na primeira etapa, a desdiferenciação inicial de células dos explantes resulta em células ou grupos de células competentes, ou seja, capazes de responder aos efeitos estimuladores do meio de

cultura para a formação de gemas, compreendendo a fase de indução (fase 2). Na terceira fase, a transferência destas células já competentes para meios indutores de gemas torna-as determinadas, isto é, comprometidas com uma rota específica de desenvolvimento. As células, a partir desta etapa, diferenciam-se em primórdios de gemas, mesmo se transferidas para meios não indutores (Cary et al., 2001). A obtenção de organogênese *in vitro* é atualmente um processo empírico, necessitando ser testadas para cada espécie as condições relativas a fonte de explante; composição mineral do meio de cultura (e também suas vitaminas e fontes de carbono); balanço hormonal e condições ambientais (Peres, 2002).

Quanto a fonte do explante normalmente é observado maior sucesso na resposta morfogênética se for utilizado explantes de tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogênica. Explantes que contém tecidos meristemáticos são preferidos, sendo encontrados em gemas caulinares apicais e axilares. Em estudos com espécies lenhosas para a indução de múltiplos brotos, utilizou-se explantes de segmentos nodais apicais e/ou cotiledonares (Kielse et al., 2008; Costa et al., 2010; Gutiérrez et al., 2011; González-Rodríguez, 2010; Gomes et al., 2010), mas há outros estudos que utilizou-se cotilédones (Rodrigues et al., 2009), hipocótilos (Cerdas e Gusman, 2004; Yaya et al., 2005; Peña-Ramirez et al., 2010) e folhas (Rahman et al., 2010).

Na micropropagação pode-se utilizar explantes oriundos de plântulas obtidas da germinação *in vitro*, como fonte de explantes. Estes explantes apresentam vantagens sobre os explantes oriundos de brotações a campo ou casa de vegetação, por já se encontrarem em condições assépticas e por apresentar maior juvenilidade. (Noletto e Silveira, 2004).

Além da fonte e tipo do explante, o meio de cultura e seus constituintes tem papel importante na resposta morfogênética. Ao se variar a composição mineral, as vitaminas e as fontes de açúcares do meio de cultura, diferenças significativas na capacidade organogênica *in vitro* são encontradas. Contudo, os componentes mais críticos adicionados ao meio de cultura são os reguladores de crescimento. Skoog e Miller (1957) demonstraram que a formação *in vitro* de caule e raiz é controlada pelas concentrações relativas entre auxina e citocinina. Meios de cultura contendo um balanço auxina/citocinina favorável à auxina promoveram a formação de raízes em tabaco (*Nicotiana tabacum*). De modo inverso, balanços hormonais favoráveis à citocinina promoveram a formação de gemas caulinares. Os balanços hormonais intermediários levaram ao crescimento do calo decorrente da multiplicação celular sem diferenciação. O calo é considerado um tecido pouco diferenciado, podendo ser induzido, tornando-se determinado e, finalmente sofrer

diferenciação para formar gemas caulinares ou raízes conforme o balanço hormonal aplicado (Skoog e Miller, 1957; Perez, 2002).

Em geral, as brotações são induzidas em um meio de cultura enriquecido com citocininas e, subsequentemente, estas brotações são enraizadas em meio de cultura contendo auxina (Nicioli et al., 2008). Existem vários estudos de regeneração de plantas lenhosas com a utilização dos diferentes tipos de hormônios como ácido naftalenoacético (ANA), benzilaminopurina (BAP) ácido giberélico (GA₃) e ácido indolbutírico (AIB), isolados e/ou combinados entre si e muitos na presença de carvão ativado (Cerdas e Guzmán, 2004; Chen et al., 2010; González-Rodríguez et al. 2010; Golle et al., 2012; Junior e Scherwinski-Pereira, 2012; Assis et al., 2012). Nestes estudos foi verificado o uso do meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), onde se obteve bons resultados para o estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de várias espécies lenhosas.

A micropropagação via organogênese, apresenta um grande potencial de aplicação na produção de mudas que podem ser utilizadas em programas de reflorestamento e restauração de áreas degradadas, bem como em programas de conservação de germoplasma, especialmente de espécies arbóreas nativas ameaçadas de extinção (Viana et al., 1999; Rocha et al., 2007; George et al., 2008; Muñoz-Concha e Davey, 2011; Gomes et al., 2010). Em espécies lenhosas a micropropagação vem sendo estudada e tem como objetivo básico o estabelecimento de uma metodologia alternativa às convencionais de multiplicação de indivíduos superiores (Teixeira, 2001; Peña-Ramírez et al., 2010; Gutiérrez et al., 2011). Atualmente têm-se utilizado a cultura de tecidos para obter novos conhecimentos nos aspectos fisiológicos, genéticos e moleculares que modulam a morfogênese *in vitro* em espécies vegetais arbóreas (Shukla et al., 2012; Gupta et al., 2014; Ahmed e Anis, 2014a,b; Akdemir et al., 2014; Devi et al., 2014).

Para as espécies deste projeto não existem relatos em pesquisas divulgadas quanto ao estabelecimento de estudos associados com a micropropagação. Desta forma o estudo exposto é de fundamental importância para a compreensão destes processos que utilizam a biotecnologia para a contribuição científica e para conservação de espécies nativas da Mata Atlântica, visando estabelecer estudos de morfogênese *in vitro* em espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, ameaçadas de extinção, de ocorrência no Estado do Rio de Janeiro, em especial na Região Centro-Norte Fluminense.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi analisar alterações bioquímicas associadas a germinação de sementes e estabelecer a morfogênese *in vitro* das espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica: *D. nigra*, *M. brauna* e *P. foliolosa*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Analisar alterações bioquímicas associadas ao conteúdo de açúcares solúveis, PAs e aminoácidos durante a germinação de sementes de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica: *D. nigra*, *M. brauna* e *P. foliolosa*.
- b) Identificar as melhores concentrações e combinações de reguladores de crescimento para a indução e desenvolvimento de brotações *in vitro* e enraizamento das mesmas brotações de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica: *D. nigra*, *M. brauna* e *P. foliolosa*.

4 CAPÍTULO 1: Altos níveis de sacarose, espermina e espermidina estão relacionados com a germinação inicial em *Plathymenia foliolosa* comparado com *Dalbergia nigra**

*Dados publicados: Rios, AP de S, Aragão, VPM, Passamani, LZ, Macedo, AF, Fulgêncio, LAP, Floh, EIS, Barroso, DG, Silveira, V, Santa-Catarina, C. High level of sucrose, spermine and spermidine are related with the early germination in *Plathymenia foliolosa* compared to *Dalbergia nigra*. Theoretical and Experimental Plant Physiology. DOI 10.1007/s40626-015-0048-0, 2015.

4.1 Resumo

As sementes são as principais estruturas responsáveis pela continuidade do ciclo de vida das plantas. O objetivo deste estudo foi investigar a relação entre os carboidratos solúveis, poliaminas (PAs) e aminoácidos na germinação da semente e crescimento inicial das plântulas em *Plathymenia foliolosa* Benth. E *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth., duas fabáceas nativas da Mata Atlântica, ameaçadas de extinção. As análises foram realizadas em sementes maduras (antes) e após 1, 2, 5 e 8 dias de embebição para *P. foliolosa* e após 2, 5, 8 e 11 dias para *D. nigra*, correspondendo as fases embebição (fase I), protusão radicular (fase II), alongamento da raiz e crescimento da plântula (fase III). Sementes de *P. foliolosa* completaram a germinação antes de *D. nigra*. O alto conteúdo de sacarose em sementes maduras e aumento crescente no conteúdo de espermidina e espermina durante a embebição (Fase I) e protusão radicular (Fase II) em *P. foliolosa* podem estar relacionado com a germinação inicial nesta espécie. O alto conteúdo de glicose e a presença de maltose em sementes maduras desidratadas e nas fases I e II podem estar associadas com o maior tempo necessário para a germinação de sementes de *D. nigra*. Conteúdos de putrescina livre e frutose são necessários para o crescimento das plântulas (fase III) em ambas as espécies. Este é o primeiro trabalho a mostrar uma associação entre estes compostos durante a germinação e crescimento inicial da plântula nestas espécies. Esta caracterização contribui para o conhecimento bioquímico da germinação de sementes em espécies arbóreas e pode ser utilizada para programas de conservação de espécies arbóreas ameaçadas de extinção, bem como em abordagens biotecnológicas para melhorar os métodos alternativos de propagação *in vitro*, como embriogênese somática.

Palavras chave : Germinação, *Plathymenia foliolosa*, *Dalbergia nigra*, Mata Atlântica.

4.2 Introdução

As sementes são os principais órgãos responsáveis pela manutenção evolutiva da linhagem da planta. Estas armazenam o material genético, garantindo assim a continuação do ciclo de vida da planta na geração seguinte. Durante o desenvolvimento, as sementes acumulam quantidades significativas de compostos de reserva, como nutrientes, os quais serão utilizados como fonte de energia nos estágios iniciais de germinação das sementes, enquanto a plântula ainda permanece heterotrófica (Galili et al., 2014).

O processo de germinação ocorre em três fases distintas: embebição (fase I), germinação *stricto sensu* (a ocorrência da germinação, fase II), e crescimento de plântulas (fase III) (Bewley, 1997). A germinação é completada pela protrusão da radícula visível através das camadas de revestimento (testa), ocorrendo o estabelecimento da plântula (Weitbrecht et al., 2011). A germinação das sementes é regulada de forma organizada, envolvendo a geração de um potencial de crescimento no embrião necessário para superar a resistência mecânica do endosperma, bem como a reorganização de estruturas subcelulares e a reativação do metabolismo (Rosental et al., 2014). A presença e abundância de enzimas metabólicas armazenadas, proteínas associadas com a síntese de aminoácidos, amido e mobilização de proteínas estão presentes nas sementes maduras, o que sugere um papel fundamental dos processos metabólicos nos estágios iniciais de germinação (Rosental et al., 2014). Além destes compostos, outros como as poliaminas (PAs), também estão envolvidos no desenvolvimento de sementes e da germinação (Minocha et al., 1999; Astarita et al., 2003b; Silveira et al., 2004b; Dias et al., 2009; Balbuena et al. 2009; Dias et al., 2010; Pieruzzi et al., 2011; Joosen et al., 2013).

Aminoácidos livres são armazenados em sementes maduras para utilização durante as primeiras horas de embebição (Weitbrecht et al., 2011), proporcionando um substrato para a produção de energia nas sementes em processo de germinação (Rosental et al., 2014). No entanto, em algumas espécies, a síntese *de novo* de proteínas é necessária para a germinação, uma vez que os aminoácidos livres armazenados nas sementes maduras não são suficientes para a síntese de proteínas durante a germinação (Bewley et al., 2012). Assim, a degradação das proteínas de reserva inicia durante as primeiras horas de embebição (Sreenivasulu et al., 2008). Proteínas de reserva são concentradas em vacúolos de armazenamento de proteína de reserva no eixo embrionário e em células dos cotilédones em dicotiledóneas, assim como no endosperma e camada de aleurona nos cereais. Estas proteínas são as primeiras a serem degradadas no embrião e são utilizadas localmente (Bewley et al., 2012).

Os açúcares solúveis estão envolvidos na sinalização celular, transporte e expressão do gene em plantas (Smeeckens et al., 2010), bem como podem também atuar na sinalização de hormônios de crescimento vegetal para modular processos essenciais como estabelecimento dos embriões, germinação de sementes, e o crescimento das plântulas (Eveland e Jackson 2012). Durante a embebição, alguns carboidratos como a sacarose, é consumido durante as primeiras 48 horas após a embebição, até a protrusão da raiz (Joosen et al., 2013), enquanto em outras espécies, a síntese de sacarose é mais importante para o estabelecimento de plântulas no processo pós-germinativo (Penfield et al., 2004; Holdsworth et al., 2008; Weitbrecht et al., 2011). Os níveis de glicose armazenada reduzem no início da embebição seguido de aumento em seus conteúdos (Joosen et al., 2013), sugerindo reposição de glicose. Este fenômeno também é sugerido para os níveis de frutose, que são baixos no início da germinação e aumentam gradualmente (Allen et al., 2010). O papel dos açúcares solúveis durante o desenvolvimento do embrião foi estudado utilizando predominantemente sementes de leguminosas como modelos (Borisjuk et al., 2004; Hills, 2004). Em leguminosas arbóreas nativas, pouco se sabe sobre estas moléculas durante o desenvolvimento da semente e germinação. Assim, uma melhor compreensão dos sinais associados com diferentes respostas ao carboidrato será útil na caracterização das vias de resposta (Gibson, 2005).

Estudos mostram que as PAs livres, principalmente putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) são necessários para diferentes processos de desenvolvimento da planta (Tiburcio et al., 2014), incluindo o desenvolvimento de sementes e germinação de espécies arbóreas (Astarita et al., 2003a; Silveira et al., 2004b; Santa-Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011). As PAs são fontes de nitrogênio assimilável, devido às suas elevadas concentrações intracelulares, como os grupos nitrogenados de PAs ao longo de sua cadeia de carbono, sendo eficientemente reciclados e re-assimilado em várias reações bioquímicas como parte de várias funções fisiológicas importantes em plantas (Moschou et al., 2012).

Foi estudada a germinação das sementes nas espécies arbóreas *Plathymenia foliolosa* Benth. (Fabaceae - Mimosoideae) e *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (Fabaceae - Faboideae) nativas da Mata Atlântica brasileira. Estas espécies estão ameaçadas de extinção devido à sua importância econômica para a produção de madeira, sendo classificadas na categoria vulnerável na Lista Vermelha das espécies ameaçadas, pela Internacional Union for Conservation of Nature (IUCN) (IUCN, 2015).

Neste sentido, o conhecimento das características genéticas, demográficas e ecológicas das espécies ameaçadas de extinção deste bioma será necessária para garantir a

manutenção de populações naturais (e das espécies) nos fragmentos remanescentes (Lacerda et al., 2002), bem como os aspectos biológicos relacionados para propagação, tais como a germinação das sementes. Assim, o objetivo do nosso trabalho foi estudar as alterações fisiológicas e bioquímicas durante a germinação das sementes e o crescimento inicial de plântulas de duas espécies arbóreas, *P. foliolosa* e *D. nigra*, nativas da Mata Atlântica brasileira. Temos a intenção de verificar se há diferenças nos teores e tipos de compostos endógenos como carboidratos, aminoácidos e PAs durante a germinação destas espécies. Responder a esta pergunta pode ser chave para entender o processo de germinação nessas espécies que estão ameaçadas de extinção.

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Material vegetal e germinação da semente

Sementes maduras de *P. foliolosa* e *D. nigra* foram utilizadas para ensaios de germinação e análises bioquímicas. Sementes de *D. nigra* foram obtidas do Viveiro Caiçara em Brejo Alegre, SP, Brasil (21°10' S, 50°10' W) e sementes de *P. foliolosa* foram obtidas na cidade de Santa Maria Madalena – RJ, Brasil (21°57' S, 42°00' W).

Para a germinação, as sementes foram desinfestadas de acordo com Santa-Catarina et al. (2001). As sementes foram lavadas com 250 mL de água destilada e imersas em etanol 70% (v/v) por 1 min, seguido de água sanitária comercial Qboa® (Anhembi AS, Osasco, Brasil) contendo 2-2,5 % (v/v) de cloro ativo e suplementada com fungicida Derosal® 500 SC (Bayer, São Paulo, Brasil) (ingrediente ativo carbendazim 500 g.L⁻¹; 200 µL de Derosal® por 1000 mL de solução) por 30 min. As sementes foram enxaguadas por cinco vezes em água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram transferidas para placas de Petri contendo duas camadas de papel de germinação (germibox) com 10 mL de água destilada autoclavada. As sementes foram incubadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 22 µmol m² s⁻¹ e 25 ± 2 °C.

Um experimento prévio foi conduzido para estabelecer as datas de coleta das amostras para cada espécie, sendo a germinação monitorada diariamente por 12 dias. A partir deste ensaio, as datas estabelecidas para análises foram: sementes maduras (antes da embebição), embebição (fase I), germinação com protusão radicular (fase II) e alongamento da raiz e crescimento da plântula (fase III – eventos pós-germinativos) (Tabela 1).

Para as análises bioquímicas, triplicatas biológicas para cada análise bioquímica foram coletadas em cada fase determinada. Cada amostra biológica foi obtida de um volume de pelo menos 100 sementes, com retirada do tegumento. As amostras foram armazenadas em microtubos de 2 mL contendo 200 mg de massa fresca (MF) para as análises de PAs e aminoácidos e 300 mg de MF para análises de carboidratos solúveis. As amostras foram armazenadas a -20°C até a realização das análises bioquímicas.

O conteúdo de água (CA), MF e massa seca (MS) foram avaliados durante a germinação para cada espécie. Para esta análise, triplicatas biológicas contendo 10 sementes cada foram utilizadas em cada tempo de análise. Para análise da MS as sementes foram pesadas antes e após 48 h de incubação a 105°C . MS foi determinada usando a seguinte fórmula: $AC = MF - MS$.

4.3.2 Determinação de açúcares solúveis

Os carboidratos solúveis foram determinados a partir de três amostras biológicas (300 mg MF cada triplicata) de acordo com Aragão et al. (2015). As amostras maceradas em nitrogênio líquido foram extraídas com 1 mL de solução de extração composta de etanol 80 % (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha), a 4°C . Os extratos foram incubados a 70°C por 90 min. Em seguida, foram centrifugadas a $20,000 \times g$ por 10 min, e o sobrenadante foi separado, e os pellets foram lavados com 1 mL da solução de extração e centrifugado novamente a $20,000 \times g$ por 10 min. Os sobrenadantes foram unidos e filtrados com membrana $20 \mu\text{m}$. Os carboidratos solúveis foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com detector de espalhamento de luz (ELSD-LT II - Shimadzu) a 40°C , e gás de nitrogênio com pressão de 350 MPa, e configuração de ganho em 9 e filtro em 4. Foram usadas uma coluna de HPLC Prevail Carbohydrate ES (Alltech Associates, Deerfield, USA) $5 \mu\text{m}$ ($250 \times 4,6 \text{ mm}$) e pré-coluna Prevail Carbohydrate ES (Alltech Associates) $5 \mu\text{m}$ ($7,5 \times 4,6 \text{ mm}$). O gradiente foi obtido pela mistura de solventes de acetonitrila absoluta (Merck) e água tipo MilliQ. O gradiente de acetonitrila foi programado para: 80 % durante os primeiros 16 min, 80 a 70 % entre 16 e 23 min e 70 % de 23 a 30 min. O fluxo foi de 1 mL min^{-1} a 25°C . Foram injetados $5 \mu\text{L}$ da amostra, e os carboidratos solúveis foram determinados pela área do pico e o tempo de retenção obtido em curva padrão de carboidratos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): sacarose, frutose, glicose e maltose.

4.3.3 Determinação de PAs livres

As PAs livres foram determinadas de acordo com a metodologia de Santa-Catarina et al. (2006) a partir de 3 amostras biológicas (200 mg MF cada). As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e extraídas com 1,6 mL de ácido perclórico a 5 % (v/v) (Merck), e incubadas por 1 h, a 4 °C. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 20 min a 20.000 x g, a 4 °C. As PAs livres, obtidas a partir do sobrenadante, foram dansiladas com cloreto de dansil (Merck) e identificadas por HPLC, usando uma coluna de fase reversa 5 µm (Shimadzu Shin-pack CLC ODS). Os solventes utilizados foram acetonitrila absoluta (100 %) e acetonitrila 10 % em água tipo MilliQ, pH 3,5 ajustado com ácido acético glacial (Merck). O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65 % nos primeiros 10 min, seguido de 65 a 100 % entre 10 e 13 min, e 100 % entre 13 e 21 min, com fluxo de 1 mL min⁻¹, a 40 °C. A concentração das PAs foi determinada usando detector de fluorescência a 340 e 510 nm de excitação e emissão, respectivamente. As áreas dos picos e tempos de retenção foram mensurados com base na curva padrão de PAs (Sigma-Aldrich): Put (putrescina), Spd (espermidina) e Spm (espermina).

4.3.4 Determinação de aminoácidos livres

Os aminoácidos foram analisados de acordo com a metodologia de Santa-Catarina et al. (2006) a partir de três amostras biológicas (200 mg MF cada triplicata). As amostras foram maceradas com 6 mL de etanol 80 % (v/v) (Merck). Em seguida, as amostras foram concentradas em “speed vac” (Labconco, Fort Scott, KS, USA), até a eliminação do etanol. Em seguida, as amostras foram resuspendidas para 2 mL de água tipo Milli-Q, e centrifugadas a 20000 x g por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana (20 µm). Os aminoácidos foram derivatizados com o-ftaldialdeído (OPA) (Merck) e identificado por HPLC (Shimadzu) usando coluna de fase reversa 5 µm (Shimadzu Shin-pack CLC ODS). O gradiente foi obtido pela mistura de soluções de metanol 65 % (Merck) com solução salina contendo acetado de sódio (Merck, 50 mM), fosfato de sódio (Merck - 50 mM), 20 mL L⁻¹ de metanol, 20 mL L⁻¹ de tetraidrofurano (Merck), com pH 8,1 ajustado com ácido acético (Merck). O gradiente da corrida para metanol 65 % foi programado para 20 % durante os primeiros 32 min, de 20 a 100 % entre 32 e 71 min, e 100 % entre 71 e 80 min, com fluxo de 1 mL min⁻¹, a 40 °C. Para a detecção de aminoácidos foi usada detector de fluorescência com excitação e emissão em 250 e 480 nm, respectivamente. A quantificação de aminoácidos foi determinada a partir de áreas dos picos e tempos de retenção de curva padrão (Sigma-Aldrich): ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina,

serina, glutamina, histidina, glicina, arginina, treonina, alanina, ácido γ -aminobutírico (GABA), tirosina, metionina, triptofano, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina, ornitina e lisina.

4.3.5 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram analisados pela análise da variância (ANOVA) ($P < 0,05$) seguido de teste de separação de médias Student–Newman–Keuls (SNK) (Sokal e Rohlf, 1995) usando o programa R (Fundação R para estatística computacional, versão 3.1.1., 2014, Viena - Áustria).

4.4 Resultados

4.4.1 Germinação da semente

Sementes de *P. foliolosa* completaram a germinação no 2º dia de incubação, quando ocorreu a protrusão da radícula (fase II), seguido de alongamento da raiz (5º dia) e crescimento da plântula (8º dia). Sementes de *D. nigra* apresentaram protrusão da raiz (fase II) no 5º dia de embebição, seguido de alongamento da raiz (8º dia) e crescimento da plântula até 11º dia (fase III) (Tabela 1).

Tabela 1. Esquema mostrando a metodologia para a obtenção de amostras durante a germinação e crescimento inicial da plântula em *P. foliolosa* e *D. nigra*, destacando as principais fases deste processo: embebição (fase I), protrusão da raiz (fase II) e alongamento radicular + crescimento da plântula (fase III). Sementes de *P. foliolosa* germinaram no 2º dia de incubação, seguido de alongamento radicular no 5º dia e crescimento da plântula no 8º dia. Sementes de *D. nigra* germinaram no 5º dia de incubação, seguido de alongamento radicular no 8º dia e crescimento da plântula até o 11º dia.

	Germinação		Desenvolvimento da plântula	
	Embebição (Fase I)	Protusão da raiz (Fase II)	Alongamento radicular (Fase III)	Crescimento da plântula (Fase III)
<i>P. foliolosa</i>	1	2	5	8
<i>D. nigra</i>	2	5	8	11

Incubação (dias)

Sementes de *D. nigra* apresentaram aumento significativo nos valores de MF e CA comparado com sementes de *P. foliolosa* (Fig. 1). Por outro lado, sementes de *P. foliolosa* apresentaram valores significativamente superiores de MS durante a embebição, protrusão da raiz e alongamento da raiz (Fig. 1b). Foi observado que sementes de *D. nigra* necessitam maior absorção de água que as de *P. foliolosa*, as quais germinaram mais rapidamente e com menor absorção de água (Fig. 1). Além disso, ambas as espécies mostraram uma padrão trifásico durante a germinação, com a menor fase de embebição (fase I) em *P. foliolosa* enquanto as sementes de *D. nigra* mostraram fase I mais longa.

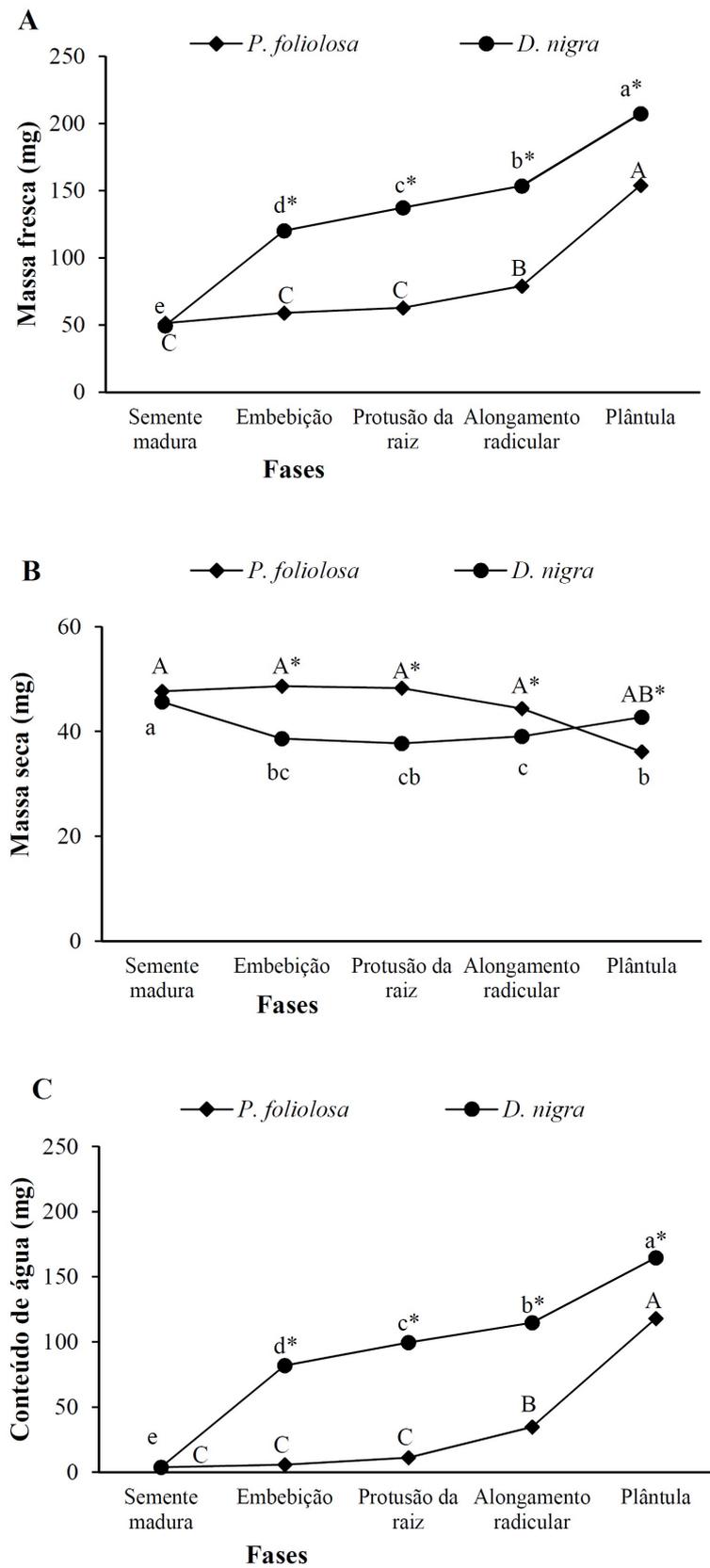


Figura 1. Valores (mg) de massa fresca (MF) (A), massa seca (MS) (B) e conteúdo de água (CA) (C) em sementes maduras e durante as diferentes fases de germinação e desenvolvimento inicial da plântula em *P. foliolosa* (◆) e *D. nigra* (●). Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas para *P. foliolosa* entre as fases. Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas para *D. nigra* entre as fases. Asteriscos (*) mostram diferenças significativas entre as espécies em cada fase. Médias seguidas por letras diferentes e asterisco são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. CV = coeficiente de variação ($n = 5$, CV MF = 7,1 %, CV MS = 6,5%, CV CA = 13,9%).

4.4.2 Carboidratos solúveis

Entre os carboidratos analisados, sementes de *P. foliolosa* apresentaram sacarose (Fig. 2A), frutose (Fig. 2B) e glicose (Fig. 2C). Já as sementes de *D. nigra* apresentaram além da sacarose (Fig. 2A), frutose (Fig. 2B) e glicose (Fig. 2C), o açúcar solúvel maltose (Fig. 2D).

Em *P. foliolosa* o conteúdo de sacarose decresceu significativamente da semente madura (antes da embebição) até as fases de germinação (2º dia) e crescimento inicial da plântula, enquanto em *D. nigra*, o conteúdo de sacarose aumentou significativamente durante a embebição (fase I) e protusão da raiz (fase II) no 5º dia, seguido por uma redução significativa durante o crescimento da plântula (Fig. 2A). Entretanto, um conteúdo significativamente alto de sacarose foi observado nas sementes maduras de *P. foliolosa* comparado com as de *D. nigra*.

O açúcar solúvel frutose não foi observado nas sementes maduras de ambas as espécies (Fig. 2B). Este açúcar teve seu conteúdo aumentado significativamente após o final da germinação em *P. foliolosa*, na fase III, durante o alongamento radicular (5º dia) e desenvolvimento da plântula (8º dia). Em *D. nigra*, o conteúdo de frutose aumentou após a embebição (fase I) no 2º dia, até a fase III, no crescimento da plântula (5º dia). Sementes de *P. foliolosa* apresentaram alto conteúdo de frutose durante o alongamento da raiz e crescimento da plântula (fase III) comparado com *D. nigra*.

O conteúdo de glicose foi observado em ambas as espécies (Fig. 2C). Entretanto, em *D. nigra* o conteúdo deste açúcar solúvel foi maior em sementes maduras e durante embebição (Fase I), protusão da raiz (fase II) comparado com *P. foliolosa*. Nesta espécie, o conteúdo de glicose aumentou significativamente após o final da germinação, a partir do alongamento radicular (5º dia) e crescimento da plântula (8º dia), na fase III. Por outro lado, em sementes de *D. nigra* o conteúdo deste açúcar solúvel decresceu significativamente da semente madura até o alongamento da raiz e aumentou novamente na plântula (Fig. 2C).

Maltose foi o carboidrato solúvel somente detectado em sementes de *D. nigra* com decréscimo significativo do conteúdo na fase I e II, da semente madura até o final da germinação, no 5º dia de incubação (Fig. 2D).

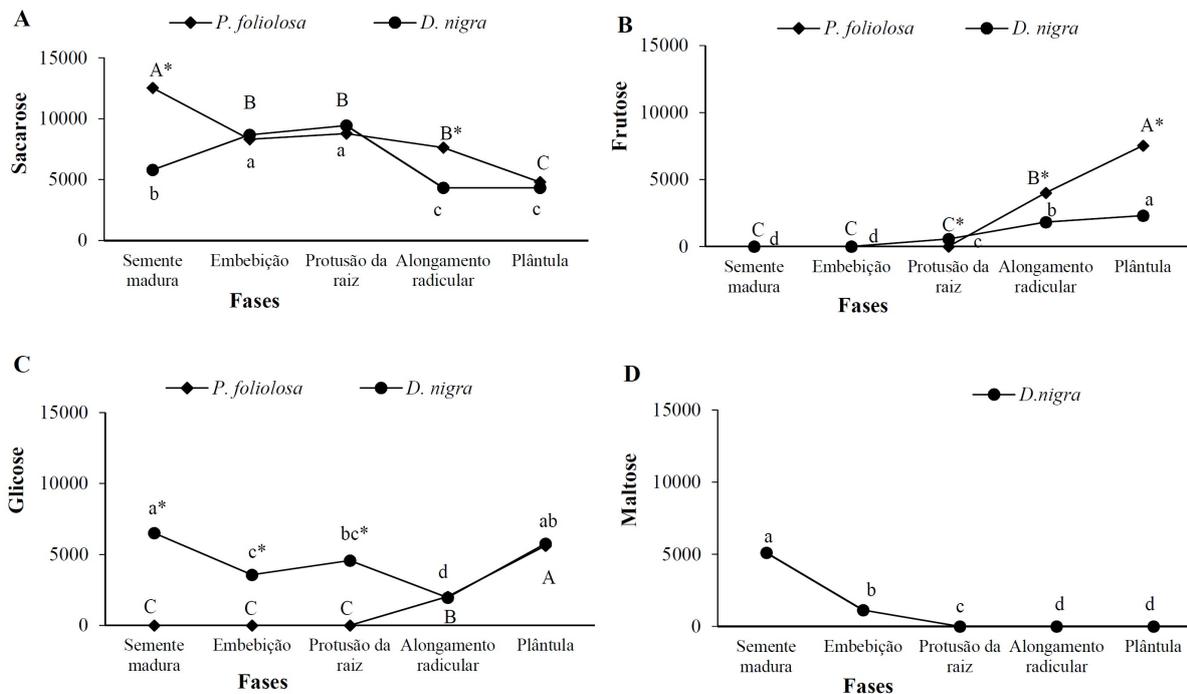


Figura 2. Conteúdo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) de sacarose (A), frutose (B), glicose (C) e maltose (D) na semente madura e durante as diferentes fases da germinação e crescimento inicial da plântula em *P. foliolosa* (◆) e *D. nigra* (●). Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças estatísticas significativas para *P. foliolosa* entre as fases. Letras minúsculas diferentes mostram diferenças estatísticas significativas entre as espécies em cada fase. Médias seguidas por letras diferentes e asteriscos são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. FM = Massa fresca; CV = coeficiente de variação ($n = 3$; CV sacarose = 9,3 %; CV frutose = 10,4 %; CV glicose = 25,6 %, CV maltose = 17,0 %).

4.4.3 Conteúdo de PAs livres

Entre as PAs analisadas, verificou-se a presença de Put, Spd e Spm durante a germinação em ambas as espécies (Fig. 3). Em *P. foliolosa*, os conteúdos de Put (Fig. 3A), Spd (Fig. 3B) e Spm (Fig. 3C) livre foram observados maiores quantidades quando comparados aos conteúdos nas sementes de *D. nigra*.

Em *P. foliolosa* o conteúdo de Put livre (Fig. 3A) aumentou significativamente na embebição (fase I) e decresceu significativamente após a germinação, durante o alongamento da raiz. Os conteúdos de Spd (Fig. 3B) e Spm (Fig. 3C) livres aumentaram significativamente durante a embebição (fase I) e protusão da radícula (fase II), apresentando altos valores nesta fase. Entretanto, conteúdos endógenos de Spd e Spm livres decresceram significativamente durante o desenvolvimento da plântula (fase III) enquanto Put livre aumentou, apresentando altos conteúdos desta PA.

Em sementes de *D. nigra*, o conteúdo de Put livre aumentou significativamente no desenvolvimento da plântula (Fig. 3A). Por outro lado, os conteúdos de Spd (Fig. 3B) e Spm (Fig. 3C) livres não alteraram significativamente durante as diferentes fases analisadas.

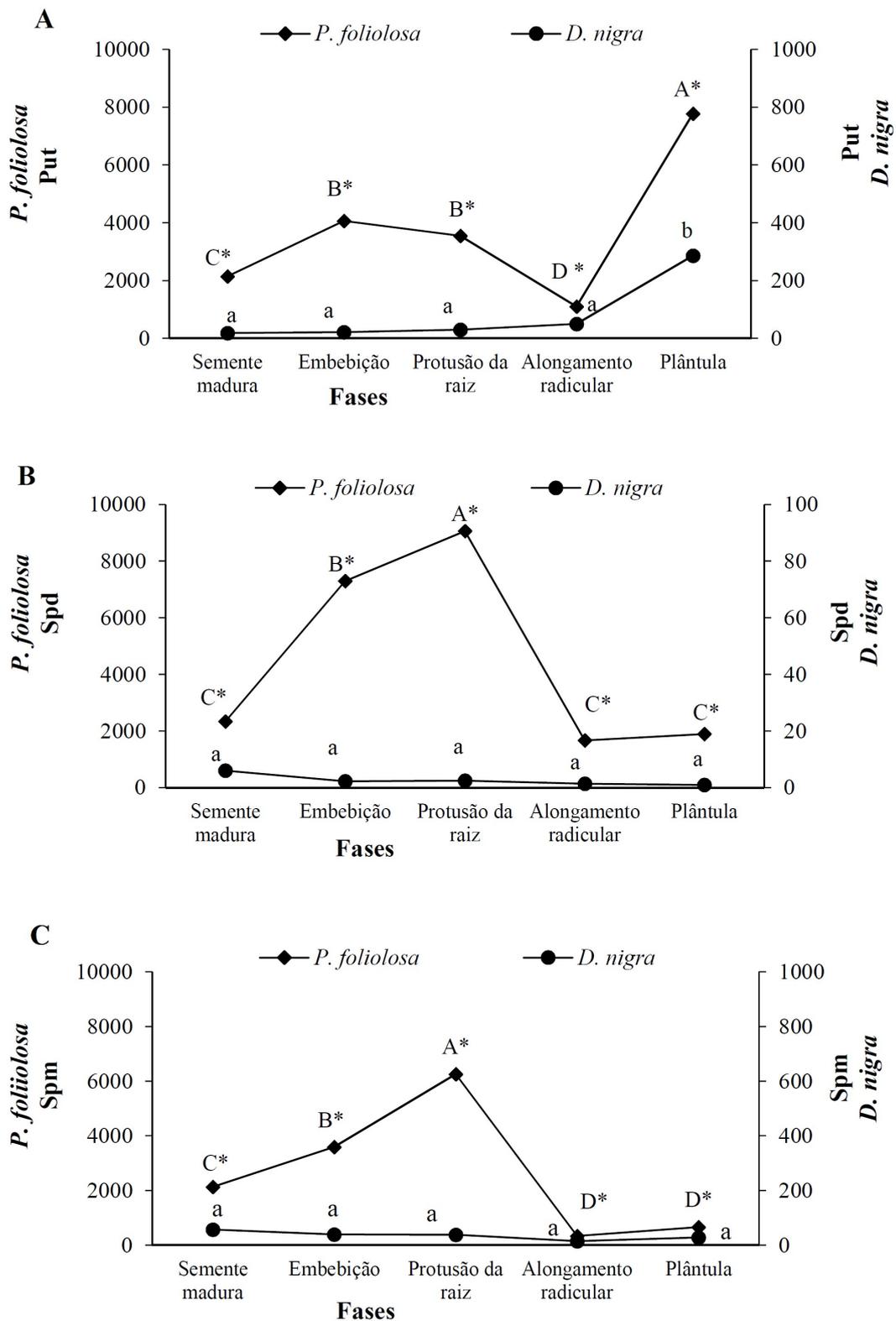


Figura 3. Conteúdo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) de Put (a), Spd (b) e Spm (c) livres em sementes maduras e durante diferentes fases da germinação e crescimento inicial da plântula em *P. foliolosa* (\blacklozenge) e *D. nigra* (\bullet). Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças estatísticas para *P. foliolosa* entre as fases. Letras minúsculas diferentes mostram diferenças estatísticas para *D. nigra* entre as fases. Asterisco (*) mostram diferenças significativas entre as espécies em cada fase. Médias seguidas por letras diferentes e asteriscos são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK. FM = massa fresca. CV = coeficiente de variação ($n = 3$; CV Put 23,4%; CV Spd = 21,1%; CV Spm = 21,5%).

4.4.4 Conteúdo de aminoácidos livres

Em ambas as espécies foram identificados 18 aminoácidos (Tabela 2). Entre os aminoácidos, sementes de *P. foliolosa*, apresentaram conteúdos significativamente maiores para a maioria dos aminoácidos analisados na maioria das fases (Tabela 2 - asteriscos).

Em sementes de *P. foliolosa*, 14 aminoácidos analisados (ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, histidina, glicina, arginina, treonina, alanina, GABA, tirosina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina e ornitina) apresentaram alto conteúdo na semente madura, reduzindo o conteúdo durante a fase I (embebição) e II (protusão da raiz). Entre estes, 10 aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, glicina, arginina, alanina, valina, fenilalanina, leucina e ornitina) apresentaram redução nos conteúdos também na fase III, durante o alongamento da raiz e desenvolvimento da plântula. Além disso, entre os 18 aminoácidos listados, quatro deles (asparagina, glutamina, tirosina e lisina) apresentaram um aumento durante a germinação, com alto conteúdo no alongamento da raiz e desenvolvimento da plântula na fase III (Tabela 2).

Entre os 18 aminoácidos analisados em sementes de *D. nigra*, 7 destes (ácido aspártico, alanina, GABA, tirosina, valina, fenilalanina, isoleucina e leucina) apresentaram alto conteúdo na semente madura, decrescendo seus valores durante a embebição (fase I) e protusão da raiz (fase II), mantendo conteúdos similares na fase III. O conteúdo dos aminoácidos histidina e glicina aumentaram o durante o desenvolvimento da plântula (fase III), enquanto o conteúdo de arginina aumentou durante a embebição (fase I) e protusão da raiz (fase II) (Tabela II). Por outro lado, para 8 dos 18 aminoácidos analisados não foram observadas diferenças significativas no conteúdo durante a germinação e crescimento da plântula em *D. nigra*.

Tabela 2. Conteúdo ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) de aminoácidos livres na semente madura e após diferentes fases da germinação e crescimento inicial da plântula em *P. foliolosa* e *D. nigra*.

Aminoácido	Espécie	Fases					Plântula	CV (%)
		Semente madura	Embebição	Protusão da raiz	Alongamento radicular			
Ácido aspártico	<i>P. foliolosa</i>	23.160,9 A*	4.325,3B*	3.234,9B	2.982,7B*	3.715,2B*	21,1	
	<i>D. nigra</i>	3.617,8 a	1.520,9 b	1.767,7 b	753,1 b	944,6 b		
Ácido glutâmico	<i>P. foliolosa</i>	27.314,0 A*	11.221,2B*	11.070,9B*	11.954,7B*	11.183,9B*	18,1	
	<i>D. nigra</i>	7.378,2 a	6.336,0 a	7.136,9 a	5.165,1 a	4.030,2 a		
Asparagina	<i>P. foliolosa</i>	51.385,5 B*	11.707,8 C	12.762,6 C	51.081,0B*	140.383,6A*	26,6	
	<i>D. nigra</i>	6.887,8 a	3.282,1 a	3.275,3 a	4.740,5 a	3.898,6 a		
Serina	<i>P. foliolosa</i>	57.418,1 A*	33.387,2B*	34.404,0 B*	17.644,8 C*	31.263,6 B*	27,7	
	<i>D. nigra</i>	1.452,0 a	659,6 a	810,5 a	1.306,4 a	1.550,7 a		
Glutamina	<i>P. foliolosa</i>	76.089,2 E*	115.140,7D*	197.466,0C*	299.960,3B*	346.411,5A*	10,4	
	<i>D. nigra</i>	27.769,0 a	30.951,5 a	31.841,4 a	29.433,5 a	31.576,1 a		
Histidina	<i>P. foliolosa</i>	186.791,0AB*	58.884,4 C*	59.404,4 C*	191.940,1A*	166.790,7B*	14,8	
	<i>D. nigra</i>	23.693,4 b	7.618,6 b	8.753,4 b	65.458,0 a	27.227,7 b		
Glicina	<i>P. foliolosa</i>	6.105,6 A*	1.517,6B*	1.853,3B*	433,1 C	203,4 C	16,6	
	<i>D. nigra</i>	162,2 b	461,7 ab	133,3 b	603,4 a	829,6 a*		
Arginina	<i>P. foliolosa</i>	25.853,6 A*	7.520,8 B	6.026,8 BC	3.912,8CD*	2.541,2 D	23,6	
	<i>D. nigra</i>	2.171,0 b	11.402,9 a*	9.624,2 a*	120,3 b	2.140,9 b		
Treonina	<i>P. foliolosa</i>	25.853,6A*	7.520,8 B*	6.026,8 BC*	3.912,8 CD*	2.541,2Da	34,9	
	<i>D. nigra</i>	854,2 a	516,0 a	527,2 a	144,0 a	241,3Ab		
Alanina	<i>P. foliolosa</i>	13.611,0A*	4.741,6CD*	5.464,8BC*	4.243,1 D*	6.079,3B*	14,0	
	<i>D. nigra</i>	3.389,4a	1.569,6b	710,5b	911,7 b	1.288,3 b		
GABA	<i>P. foliolosa</i>	14.920,8A*	4.741,6B*	5.464,8B*	4.243,1B*	6.079,3B*	21,7	
	<i>D. nigra</i>	3.486,0 a	1.548,6 b	1.095,1 b	743,4 b	769,2 b		
Tirosina	<i>P. foliolosa</i>	405,9 C	1.204,5 B*	1.430,8B*	3.525,0A*	3.408,6A*	35,1	
	<i>D. nigra</i>	57,6 A	0,0 A	0,0 a	0,0 a	8,2 a		
Valina	<i>P. foliolosa</i>	16.431,4A*	4.824,1C*	5.514,0B*	4.261,8C*	6.035,0B*	9,9	
	<i>D. nigra</i>	1.221,5 a	442,8 b	275,9 ab	427,8 ab	419,7 ab		
Fenilalanina	<i>P. foliolosa</i>	12.682,0A*	5.562,6B*	3.248,3C*	2.843,6C*	1.532,1D*	9,9	
	<i>D. nigra</i>	1.270,0 a	813,2 ab	448,8 b	442,5 b	408,6 b		
Isoleucina	<i>P. foliolosa</i>	2229,7A*	584,1C*	682,3C*	1.047,8B*	1.174,6B*	12,3	
	<i>D. nigra</i>	480,0 a	270,1 b	146,2 b	264,2 b	302,6 b		
Leucina	<i>P. foliolosa</i>	2.259,1A*	682,1B*	561,6C*	376,6D*	493,1 C	10,1	
	<i>D. nigra</i>	541,2 a	585,9 a	319,8 B	454,5 ab	431,6 ab		
Ornitina	<i>P. foliolosa</i>	2.834,8 A*	565,3B*	0,0 C	0,0 C	0,0 C	25,7	
	<i>D. nigra</i>	178,6 a	184,2 a	152,2a*	203,4 a*	132,9 a*		
Lisina	<i>P. foliolosa</i>	2.349,4B*	1.355,9C*	1.507,7C*	3.457,2A*	783,2D*	20,5	
	<i>D. nigra</i>	92,3 a	80,8 a	70,1 a	64,8 a	71,2 a		

CV – coeficiente de variação. Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças estatísticas para *P. foliolosa* entre as fases. Letras minúsculas diferentes mostram diferenças estatísticas para *D. nigra* entre as fases. Asteriscos (*) mostram diferenças significativas entre as espécies em cada fase. Médias seguidas por letras diferentes e asteriscos são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste SNK ($n = 3$).

4.5 Discussão

A germinação é um processo complexo durante o qual a semente retoma a intensidade metabólica necessária para suportar eventos celulares essenciais para permitir que o embrião inicie o crescimento e se preparar para o posterior crescimento da plântula (Nonogaki et al., 2010). Este trabalho é o primeiro a mostrar uma associação entre açúcares solúveis, PAs e aminoácidos livres durante a germinação da semente e crescimento inicial das plântulas em *P. foliolosa* e *D. nigra*, duas espécies ameaçadas de

extinção, nativas da Mata Atlântica, uma das florestas mais ameaçadas no mundo. A partir deste trabalho observou-se que as espécies apresentam diferenças na germinação, onde sementes de *P. foliolosa* germinaram antes das sementes de *D. nigra*. Esta germinação inicial pode estar associada com diferenças significativas nos compostos analisados. O alto conteúdo de sacarose em sementes maduras secas e aumentos no conteúdo de Spd e Spm livres até a protusão da raiz (fases I e II) em *P. foliolosa* pode estar associado com a germinação inicial nesta espécie. Por outro lado, o alto conteúdo de glicose durante as fases I e II, provavelmente pela presença de maltose, pode estar associado com o maior tempo necessário para a germinação da semente em *D. nigra*. Além disso, um aumento no conteúdo de Put livre e frutose é necessário para o crescimento e desenvolvimento de plântulas (fase III) em ambas as espécies. Esta caracterização é importante e pode contribuir para o conhecimento bioquímico da germinação de sementes de espécies de arbóreas, ser utilizada em programas de conservação de espécies ameaçadas, bem como, em pesquisas biotecnológicas para melhorar métodos alternativos de propagação *in vitro*, como a embriogênese somática.

A germinação das sementes começa com a absorção de água pela semente madura e termina com protrusão da radícula (Bewley, 1997), sendo os eventos subsequentes classificados como eventos pós-germinativo (Gallardo et al., 2002). As sementes de *P. foliolosa* apresentaram uma fase de embebição menor comparando com *D. nigra*, a qual mostrou maior absorção de água (Fig. 1). A rápida embebição na fase I resulta na re-iniciação do metabolismo básico. Durante esta fase, conhecida como a embebição física, uma ativação das vias metabólicas é causada por um aumento gradual na hidratação da semente (Bove et al., 2001). Na segunda fase, a taxa de hidratação diminui, e novos mecanismos fisiológicos permitem a expansão das células ao longo dos eixos embrionários, que culmina no aparecimento de alongamento das células da radícula, ocorrendo a protusão da raiz (Bove et al., 2001). Em *P. foliolosa*, a germinação foi finalizada (fase II) com a protrusão da raiz no 2º dia de embebição; enquanto a protrusão da raiz ocorreu no 5º dia de incubação para as sementes de *D. nigra*, mostrando que sementes de *P. foliolosa* germinaram mais rapidamente. Na segunda fase, a taxa de hidratação desacelera e novos mecanismos fisiológicos habilitam a expansão celular ao longo do eixo embrionário, levando ao alongamento celular que resultará na protusão da raiz (Bove et al., 2001). Em *P. foliolosa*, a germinação é finalizada (fase II) com protrusão da raiz no 2º dia de incubação, enquanto em *D. nigra* a protrusão da radícula ocorre no 5º dia, mostrando que sementes de *P. foliolosa* germinam mais rapidamente. Na segunda fase, substâncias osmoticamente activas, tais como açúcares e aminoácidos são acumuladas,

resultando no aumento da absorção de água que pode coincidir com o afrouxamento da parede celular de tecidos circundantes (endosperma), ocorre o alongamento do eixo embrionário e a germinação é finalizada (Bove et al., 2001). Os tecidos que revestem o embrião, como a testa e o endosperma, em *D. nigra* podem exercer uma resistência mecânica, necessitando assim de maior tempo para a germinação das sementes comparando com *P. foliolosa*. Esta hipótese está baseada no fato que, entre as espécies leguminosas, é comum encontrar sementes duras ou impermeáveis à água, como no espécies Fabaceae (Rolston, 1978; Smykal et al., 2014). Durante a fase III, o conteúdo de água (AC) e a MF aumentou significativamente em ambas as espécies, possivelmente pelo alongamento da radícula e subsequente crescimento da plântula. A determinação da curva de embebição é importante para analisar a permeabilidade do tegumento e sua relação com a absorção de água (Carvalho e Nakagawa, 2000).

Algumas moléculas desempenham um papel importante no crescimento vegetal. Dentre estas, os carboidratos são essenciais para o crescimento. Sementes maduras de leguminosas podem conter mais de 30 carboidratos solúveis diferentes, sendo a sacarose o principal componente do conteúdo de açúcares solúveis totais (Obendorf e Gorecki, 2012). Entre os carboidratos analisados, um alto conteúdo de sacarose na semente madura sementes de *P. foliolosa* comparado com *D. nigra* (Fig. 2) pode estar relacionado com a germinação mais rápida nesta espécie. De acordo com Obendorf e Gorecki (2012), a aquisição da tolerância a dessecação e habilidade em germinar em condições de rehidratação em sementes de muitas espécies leguminosas, como *Pisum sativum* L., *Glycine max* L., *Vicia faba* L., *Lupinus luteus* L. e *Vicia villosa* Roth, é acompanhada do acúmulo de quantidades elevadas de sacarose durante a maturação da semente. A presença de substâncias osmoticamente ativas, como açúcares, pode aumentar a absorção de água e, em conjunto com o enfraquecimento dos tecidos circundantes (endosperma), promovendo o alongamento dos eixos embrionários e a germinação (Bove et al., 2001). Além disso, o decréscimo no conteúdo de sacarose em sementes de *P. foliolosa* durante a germinação (Fig. 2a) pode ser associado com a demanda por energia nos estágios iniciais e posteriores da germinação. Joosen et al. (2013) demonstraram em sementes de *Arabidopsis* que a sacarose é consumida durante as primeiras 48 horas após a embebição, antes da protusão da raiz. Em sementes oleaginosas, açúcares não-redutores, como a sacarose, pode ser convertido temporariamente em amido, o qual reduz a concentração osmótica intracelular, a qual é requerida para o crescimento do eixo embrionário (Obendorf e Gorecki, 2012).

O aumento no conteúdo de frutose (Fig. 2b) e glicose (Fig. 2c) em *P. foliolosa* (Fig. 2) bem como frutose em *D. nigra* (Fig. 2b) após a germinação pode estar relacionado com

a degradação de sacarose, e sugere a relevante função destes compostos nos eventos pós-germinativos, quando células em divisão são requeridas para o crescimento da plântula e o desenvolvimento. É conhecido que estas hexoses possuem um grande potencial de sinalização na promoção do crescimento de órgãos e proliferação celular durante o crescimento da plântula, enquanto a sacarose está tipicamente associada com a diferenciação do embrião e maturação da semente em várias espécies (Borisjuk et al., 2004; Koch, 2004; Allen et al., 2010). Estudos prévios do desenvolvimento de embriões de leguminosas sugere a ligação entre hexoses e ciclo celular, aumentando a atividade mitótica (Borisjuk et al., 1998; Borisjuk et al., 2003). Estas informações sugerem que os açúcares controlam o ciclo celular pela modulação da expressão do gene da ciclina D (CycD) (Eveland e Jackson, 2012).

Além disso, a adição exógena de glicose inibe a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas em várias espécies (Price et al., 2003; Gibson, 2005; Hu et al., 2012). Neste sentido, a presença de glicose em sementes de *D. nigra*, mas não em *P. foliolosa*, durante a embebição (fase I) e protusão da radícula (fase II) pode estar relacionada com o atraso na germinação em *D. nigra*, alterando a taxa entre hexoses e sacarose, o qual pode retardar a protusão da raiz. Adicionalmente, o alto conteúdo de glicose observado em *D. nigra* pode estar associado com a presença de maltose (Fig. 2d), observada somente em sementes de *D. nigra*, disponibilizando mais glicose pela sua degradação.

As PAs são moléculas orgânicas de baixo peso molecular associadas com o desenvolvimento de sementes (Minocha et al., 1999; Urano et al., 2005; Santa-Catarina et al., 2006) e germinação (Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011) em espécies arbóreas. O alto conteúdo de Put livre observado na plântula em desenvolvimento pode estar associado com a promoção da divisão celular, uma vez que a Put pode regular o ciclo celular na transição G1/S e G2/M em meristemas apicais de *Sinapis alba* (Havelange et al., 1996). Neste sentido, o aumento no conteúdo endógeno de Put livre após a germinação (fase III) pode induzir a divisão celular necessária para o crescimento e desenvolvimento das plântulas em *P. foliolosa* e *D. nigra*. Resultados similares foram também observados em *Cedrela fissilis* Vell., onde o aumento significativo de Put livre e decréscimo de Spm livre em plântulas foi associado com os processos de divisão durante o crescimento da plântula (Aragão et al., 2015).

Adicionalmente, Matilla (1996) mostrou que o conteúdo de Put está mais associado com a divisão celular, enquanto a diferenciação e alongamento celular durante a protusão da raiz pode estar relacionado com alto conteúdo de Spd e Spm durante a germinação. Neste sentido, o aumento de Spd e Spm durante a embebição (fase I) e protusão da raiz

(fase II) de sementes de *P. foliolosa* (Fig. 3) poder ser relevante para promover a germinação mais rápida nesta espécie comparado com *D. nigra*.

Os aminoácidos apresentam rotas diversas e essenciais no desenvolvimento das plantas, incluindo desenvolvimento da semente e germinação (Santa-Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009). Estas moléculas são sintetizadas e armazenadas durante o desenvolvimento da semente e são mobilizadas durante a germinação e crescimento inicial da plântula (Catusse et al., 2008). O conteúdo significativo de aminoácidos nas sementes maduras secas seguido pelo decréscimo em alguns destes durante a embebição (Tabela 2) sugerem seu uso no metabolismo intracelular durante a germinação e desenvolvimento da plântula em ambas, *P. foliolosa* e *D. nigra*. Como bases de enzimas e outras proteínas, os aminoácidos fornecem importantes componentes para o metabolismo e estrutura das plantas. Além disso, eles servem como precursores ou doadores de nitrogênio para a síntese de uma grande variedade de compostos essenciais para o desenvolvimento das plantas, incluindo nucleotídeos, clorofila, hormônios e metabólitos secundários (Tegeder, 2012).

Alguns aminoácidos como ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, valina, treonina, fenilalanina, isoleucina, leucina e GABA, com alto conteúdo na semente madura em ambas as espécies, apresentaram padrão similar de seus conteúdos durante a germinação, exceto ácido glutâmico em *D. nigra*. Em *O. catharinensis*, alto conteúdo de ácido aspártico e ácido glutâmico também foram observados em sementes maduras (Santa-Catarina et al., 2006). Alguns aminoácidos, como ácido glutâmico e ácido aspártico, agem como compostos transportadores de nitrogênio para a biossíntese de uma grande variedade de substâncias (Radwanski e Last, 1995; Von Wettstein et al., 1995). O ácido aspártico, além de estar envolvido na translocação de nitrogênio, é também precursor da biossíntese de asparagina, treonina, metionina, lisina e isoleucina (Lam et al., 1995). Desta forma, o ácido aspártico e o ácido glutâmico podem ser compostos doadores e transportadores de nitrogênio durante a germinação da semente e crescimento da plântula.

O aminoácido GABA também foi observado em altos conteúdos na semente madura, antes da embebição, decrescendo durante a germinação, com baixo conteúdo nas plântulas de ambas as espécies (Tabela 2). Vários estudos tem mostrado o envolvimento deste aminoácido no desenvolvimento de embriões somáticos em várias espécies, como em *Daucus carota* L. (Kamada e Harada, 1984) e em embriões zigóticos de *O. catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2006), porém pouca informação está disponível sobre a relação entre GABA e a germinação de sementes. A degradação de PAs fornece aproximadamente 30 % de GABA durante a germinação de sementes de feijão fava (*V. faba*) (Yang et al., 2011), e

em condições de estresse, o acúmulo de GABA ocorre nos cotilédones (Yang et al., 2013). Neste sentido, o pool deste aminoácido pode ter um papel relevante durante a embebição de sementes, quando os níveis de energia e oxigênio são limitantes, e as reservas armazenadas ainda não foram remobilizadas (Rosental et al., 2014).

Asparagina é um aminoácido relativamente inerte e altamente solúvel, o qual é usado como a maior fonte de armazenamento e transporte de nitrogênio em muitas plantas (Lam et al., 1995). A asparagina é acumulada nas plântulas em desenvolvimento após a germinação de várias espécies leguminosas, como *Vicia sativa* L. e espécies de *Lupinus*, e corresponde por mais de 50 % do nitrogênio total nestas plântulas (Lea et al., 2007). O conteúdo de asparagina aumentou significativamente nas plântulas de *P. foliolosa* (Tabela 2), enquanto em *D. nigra* não foram observadas diferenças significativas, mostrando um padrão diferente no metabolismo de asparagina durante a germinação nestas duas espécies arbóreas de leguminosas. Adicionalmente, a glutamina é um aminoácido doador e transportador de nitrogênio em plantas, assimilado mais rapidamente em esqueletos de carbono de proteínas do que outras fontes de nitrogênio inorgânico (Lea, 1993), e pode ser usado no desenvolvimento de plântulas em *P. foliolosa* comparado com *D. nigra*.

4.6 Conclusões

Pode-se concluir que há uma relação entre os compostos analisados entre as diferenças na germinação destas espécies.

Sugere-se que diferenças no conteúdo de sacarose, Spd e Spm em *P. foliolosa* podem estar relacionadas com a germinação inicial nesta espécie. Por outro lado, a presença de maltose pode estar associada com o maior tempo necessário para a germinação de sementes de *D. nigra*. Entretanto, o padrão no perfil de Put e frutose similar para as duas espécies sugerem que estas são necessárias para o crescimento das plântulas, nos eventos pós-germinativos.

Este estudo é o primeiro trabalho a mostrar uma associação entre estes compostos durante a germinação e crescimento inicial da plântula nestas espécies arbóreas do bioma Mata Atlântica. Esta caracterização é importante e contribui para o conhecimento bioquímico da germinação de sementes em espécies arbóreas nativas, e pode ser útil em futuros estudos visando o estabelecimento de programas de conservação de espécies arbóreas ameaçadas de extinção, bem como em abordagens biotecnológicas para melhorar os métodos alternativos de propagação *in vitro*, como embriogênese somática.

5. CAPÍTULO 2: MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM ESPÉCIES ARBÓREAS AMEAÇADAS DE EXINÇÃO

5.1 Resumo

Os recursos florestais envolvendo espécies nativas tem sido historicamente explorados de maneira extrativista. Adicionalmente, alguns fatores como a floração esporádica, a baixa viabilidade das sementes e o crescimento lento levam a um número reduzido de programas de reflorestamento com as espécies nativas. Neste sentido, técnicas biotecnológicas, como a micropropagação podem representar uma alternativa viável para propagação e conservação de espécies florestais que se encontram ameaçadas, apresentando um grande potencial de aplicação em programas de conservação, reflorestamento e recuperação de áreas degradadas. Desta forma, o objetivo foi estabelecer estudos de morfogênese *in vitro* em espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, como a *Dalbergia nigra*, *Melanoxylon brauna* e *Plathymenia foliolosa*. Em *M. brauna* e *D. nigra*, verificou-se o efeito do tipo de explantes (segmentos nodais apicais, intermediários, cotiledonares, foliares, hipocótilo e epicótilo), sob diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento. Verificou-se para estas espécies que segmentos nodais apicais, intermediários e cotiledonares foram responsivos aos tratamentos utilizados, enquanto segmentos de hipocótilos, epicótilos e folíolos inteiros, não apresentaram resposta morfogenética. A resposta para número e comprimento de brotos para cada espécie foi dependente do tipo de explante e dos tratamentos utilizados. Em *M. brauna* segmentos nodais apicais e intermediários possibilitaram melhor resposta comparativamente aos cotiledonares, sugerindo o uso de 5 μM de BAP para realizar a propagação *in vitro*. Em *D. nigra* sugere-se o uso de segmentos nodais cotiledonares e intermediários para a propagação, utilizando-se os tratamentos com 4 μM de ANA + 20 μM de BAP e 10 μM de BAP, respectivamente. Em *P. foliolosa* verificou-se o efeito de diferentes reguladores de crescimento, em diferentes concentrações, na morfogênese *in vitro* utilizando-se segmentos nodais apicais e nodais cotiledonares. Verificou-se para esta espécie respostas significativas nos segmentos nodais apicais e cotiledonares para a propagação *in vitro*, sugerindo-se os tratamentos controle e com 2,5 μM de ANA + 20 μM de BAP, respectivamente. Verificou-se também a formação de calos em *P. foliolosa* e a formação de gemas vegetativas.

Palavras chave: Arbóreas nativas, Mata Atlântica, Micropropagação.

5.2 Introdução

As técnicas de propagação vegetativa, especialmente a micropropagação via cultura de tecidos vegetais, constituem alternativas para superar as dificuldades na propagação convencional de espécies nativas, podendo ser utilizadas para fins comerciais, assim como auxiliar no resgate e conservação de recursos genéticos florestais. A cultura de tecidos é uma técnica biotecnológica, considerada por uma alternativa via de propagação que vem colaborando para novos conhecimentos nos aspectos fisiológicos, genéticos e moleculares que modulam a morfogênese *in vitro* em espécies vegetais arbóreas (Shukla et al., 2012; Gupta et al., 2014; Ahmed e Anis, 2014a,b; Akdemir et al., 2014; Devi et al., 2014).

Dentre as técnicas utilizadas na cultura de tecidos vegetais destaca-se a organogênese *in vitro* como alternativa muito utilizada na regeneração de plantas de interesses comercial e ecológico, incluindo arbóreas (Pijut et al., 2012). A obtenção de respostas morfogenéticas via organogênese *in vitro* é complexa, com a atuação de múltiplos fatores envolvendo interação entre a fonte de explante, o meio de cultura e os fatores do ambiente (Alves et al., 2004; Xavier, 2009).

Quanto a fonte do explante, normalmente há melhor sucesso na resposta morfogenética se for utilizado tecidos jovens com células pouco diferenciadas, e com isso, possuem maior competência para a indução brotações. Os explantes que contêm tecidos meristemáticos são preferidos, sendo encontrados em gemas caulinares apicais e axilares localizados em segmentos nodais. Entretanto a resposta do explante para a morfogênese depende da sensibilidade do tecido ao regulador de crescimento vegetal utilizado, o que está relacionado a um equilíbrio no gradiente hormonal do explante, receptores celulares, e transdução de sinal para induzir a morfogênese (CID, 2010).

As brotações organogênicas são induzidas em um meio de cultura enriquecido com citocininas, sendo auxinas também utilizadas em combinação com citocininas (Nicioli et al., 2008). Outros reguladores de crescimento vegetal, como giberelinas, também pode, muitas vezes, ser utilizada em processos de regeneração por organogênese, visando especialmente alongamento caulinar (Peres, 2002).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer estudos de morfogênese *in vitro* nas espécies *Dalbergia nigra*, *Melanoxylon brauna* e *Plathymenia foliolosa* via organogênese *in vitro*. Estas espécies são endêmicas da Mata Atlântica e devido a alta ação antrópica, encontram-se atualmente em vias de extinção.

5.3 Material e métodos

5.3.1 Material vegetal

As sementes de *M. brauna* e *P. foliolosa* foram obtidas em remanescentes naturais de propriedades particulares localizadas em São Francisco do Itabapoana – RJ e Santa Maria Madalena –RJ, respectivamente. As sementes de *D. nigra* foram obtidas no Viveiro Caiçara, localizada em Brejo Alegre – SP.

5.3.2 Germinação *in vitro* para estabelecimento de culturas assépticas

Para a germinação, as sementes foram desinfestadas de acordo com Santa-Catarina et al. (2001). Resumidamente, as sementes foram lavadas com água destilada e uma gota de detergente comercial, enxaguadas por três vezes com água destilada. Em seguida, foram imersas em etanol 70% por 1 min, e 30 min em solução de hipoclorito de sódio 2,5 % (v/v) (água sanitária comercial Qboa® 100%) com fungicida Derosal® 500 SC (ingrediente ativo carbendazim 500 g.L⁻¹) (Bayer, São Paulo, Brasil) (200 µL da solução comercial/L de água destilada). Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas por cinco vezes em água destilada autoclavada. Utilizou-se para a inoculação os tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura MS (Muraschige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e geleificado com 2 g.L⁻¹ de Fitagel. O pH do meio foi ajustado para 5,8 ±0,1 antes da autoclavagem à 121°C, 1,5 atm por 15 min. Posteriormente, as sementes foram transferidas para os tubos de ensaio contendo o meio, já atutoclavado anteriormente, em câmara de fluxo laminar.

Após a inoculação, as sementes foram incubadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de 22 µmol m² s⁻¹ a 25 ± 2 °C. Após 30 dias da germinação foram utilizadas as plântulas como fonte de explantes (segmentos nodais) para os experimentos de multiplicação *in vitro* das espécies, estudando o efeito de diferentes tipos de explantes e diferentes reguladores de crescimento na morfogênese *in vitro*.

5.3.3 Efeito do tipo de explante e reguladores de crescimento na morfogênese *in vitro* em *M. brauna* e *D. nigra*

Primeiro, foi estudado o efeito de diferentes tipos de explante e reguladores de crescimento sobre o potencial de indução de resposta morfogenética *in vitro* das espécies *M. brauna* e *D. nigra*.

Foram testados seis tipos de explantes: segmento nodal apical, segmento nodal intermediário (abaixo do apical e acima do cotiledonar), segmento nodal cotiledonar, segmento de epicótilo, segmento hipocótilo e segmento foliar (fólios inteiros) (Fig. 1).

Explantes (± 1 cm de comprimento) obtidos de plântulas com 30 dias de germinação foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP - 0, 5; 10 e 20 μM) e ácido naftalenoacético (ANA - 0, 2 e 4 μM), combinados entre si. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem à temperatura de 121°C, 1,5 atm, por 15 min. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de 22 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$.

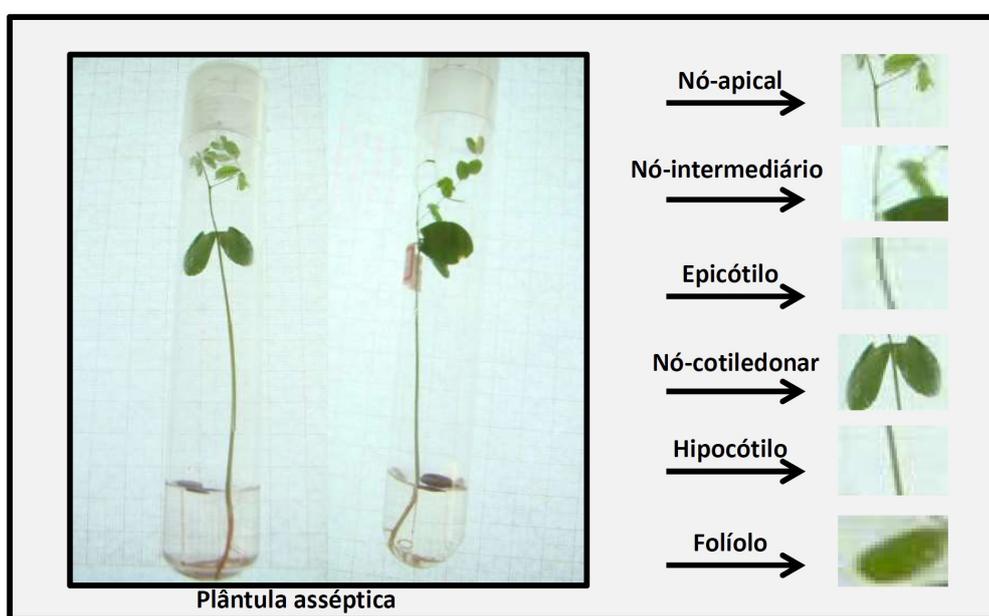


Figura 1. Plântula com 30 dias de germinação *in vitro* ilustrando a posição dos diferentes tipos de explantes utilizados para os estudos de morfogênese *in vitro* em *D. nigra* e *M. brauna*.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 6 x 4 x 3 (seis tipos de explantes x três concentrações de ANA x quatro concentrações de BAP), totalizando 72 tratamentos. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição composta de quatro tubos de ensaio, totalizando 20 tubos de ensaio por tratamento.

Após 30 dias da inoculação, foram avaliadas as variáveis número de brotos por explante e comprimento das brotações, utilizando régua milimetrada de (20cm).

5.3.4 Efeito de diferentes reguladores de crescimento vegetal na morfogênese *in vitro* em segmentos nodais apicais e cotiledonares de *P. foliolosa*

Para analisar o efeito de diferentes reguladores de crescimento vegetal sobre a morfogênese *in vitro* foram utilizados segmentos nodais cotiledonares e apicais (Fig. 2) obtidos de plântulas germinadas *in vitro* de *P. foliolosa*, após 30 dias de germinação.

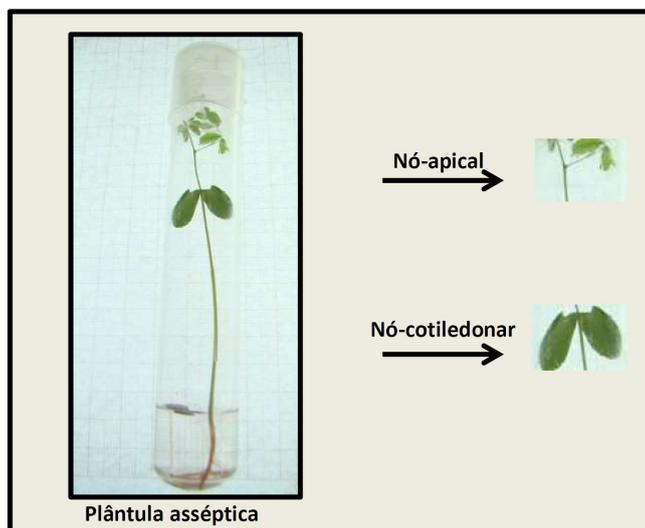


Figura 2. Plântula com 30 dias de germinação *in vitro* ilustrando a posição dos diferentes tipos de explantes utilizados para os estudos de morfogênese *in vitro* em *P. foliolosa*.

Os segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}), fitagel (2 g.L^{-1}), e diferentes concentrações de BAP (0 e $20 \text{ }\mu\text{M}$), GA_3 (0 e $20 \text{ }\mu\text{M}$) e ANA (0; 0,5; 1 e $2,5 \text{ }\mu\text{M}$), isoladamente ou combinadas as concentrações de ANA com BAP, ANA com GA_3 e BAP com GA_3 , totalizando 13 tratamentos (Tabela 1). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem à temperatura de 121°C , 1,5 atm, por 15 min. Após a inoculação, os explantes foram em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de $22 \text{ }\mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$. Após 30 dias da inoculação foram avaliadas as variáveis número de brotos por explante e comprimento das brotações, utilizando régua milimetradas de (20cm).

Tabela 1. Tratamentos resultantes das combinações entre os diferentes reguladores de crescimento para o experimento de morfogênese *in vitro* em *P. foliolosa*.

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÕES HORMONAIS		
	ANA (μM)	BAP (μM)	GA ₃ (μM)
T1	0,0	0,0	0,0
T2	0,5	-	-
T3	1,0	-	-
T4	2,5	-	-
T5	0,5	-	20,0
T6	1,0	-	20,0
T7	2,5	-	20,0
T8	0,5	20,0	-
T9	1,0	20,0	-
T10	2,5	20,0	-
T11	-	-	20,0
T12	-	20,0	-
T13	-	20,0	20,0

5.3.5 Enraizamento *ex vitro* e aclimatização em *M. brauna* e *P. foliolosa*

Para a pré-aclimatização as brotações micropropagadas a partir de 3 cm de altura foram excisadas do explante e transferidas para copos plásticos (50 mL), contendo substrato comercial tipo solo de mata atlântica (Plantmax®) + vermiculita (autoclavados em a 121 °C, por 30 min), na proporção (2:1, v/v) e logo umedecido com água destilada autoclavada. As brotações foram regadas uma vez ao dia (todas as manhãs) por 30 dias.

Para a aclimatização as mudas de *M. brauna* e *P. foliolosa* que sobreviveram do processo de pré-aclimatização foram diretamente levadas para a estufa por 30 dias. Avaliou-se apenas a taxa de sobrevivência para as duas espécies.

5.3.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey, através do uso do software SisVar (Ferreira, 2011).

4.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Efeito do tipo de explante e reguladores de crescimento na morfogênese *in vitro* em *M. brauna* e *D. nigra*

De acordo com os resultados observados para estas duas espécies, os explantes oriundos de segmentos de hipocótilos, epicótilos e folíolos inteiros, não apresentaram resposta morfogênética, ou seja, não responderam às concentrações de BAP e ANA utilizadas para a indução de brotos adventícios. Esta resposta pode ter ocorrido, provavelmente, devido a alta taxa de oxidação nestes explantes, os quais apresentaram tonalidade amarelada a marrom nos tecidos. Limitações comumente encontradas no cultivo *in vitro* das espécies lenhosas são as altas concentrações de compostos fenólicos, que acabam oxidando e matando o material vegetal e promovendo a abscisão foliar precoce, ocasionada pelo acúmulo de etileno nos tecidos submetidos ao ambiente *in vitro*, tornando o explante mais frágil e reduzindo o crescimento (Kerbaui, 2004). Em pata-de -vaca (*Bauhinia cheilantha*), não foi possível observar, diante dos tratamentos testados, o desencadeamento do processo morfogênético formando brotos nos explantes hipocótilo e epicótilo (Gutiérrez et al., 2010). Segundo Ezura et al. (2000), a regeneração *in vitro* de muitas leguminosas é considerada difícil. Contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo, em *Psoralea coryfolia*, a utilização de explantes oriundos de segmentos de hipocótilo mostraram alta capacidade organogênica, produzindo 48,5 brotos/explante quando inoculados em meio de cultura combinando-se três citocininas (0,66 mg L⁻¹ de TDZ, 0,11 mg L⁻¹ de BAP e 0,11 mg L⁻¹ de KIN) com auxina (0,37 mg L⁻¹ de ANA) (Baskaran e Jayabalan, 2009).

Entretanto, segmentos nodais apicais, intermediários e cotiledonares obtidos de plântulas germinadas *in vitro* apresentaram resposta positiva para o desenvolvimento de brotações nos diferentes tratamentos utilizados para *M. brauna* e *D. nigra*. É descrito que, para a micropropagação pode-se utilizar explantes oriundos de plântulas obtidas da germinação *in vitro* como fonte de explantes de maior competência ao crescimento via sinalização hormonal (Noletto e Silveira, 2004), corroborando com o presente estudo.

Observou-se para a espécie *M. brauna* efeito significativo ($P \leq 0,01$) dos fatores isolados “tratamentos” e “explantes” para a variável número de brotos e da interação dupla “tratamentos x explantes” para comprimento de brotos (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância (ANOVA) para as variáveis número de brotos por explante (NB) e comprimento (cm) da parte aérea dos brotos (CB) em função do tipo de explante de *M. brauna* sob diferentes concentrações de ANA e BAP, combinadas ou não entre si.

Fonte de variação	Graus de liberdade	QUADRADOS MÉDIOS	
		Número	Comprimento
Tratamentos	11	3,82**	3,21**
Explantes	2	1,31**	0,19 ^{ns}
Tratamento x Explantes	22	0,29 ^{ns}	0,27**
Resíduo	144	0,25	0,12
CV (%)		52,75	65,20

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($P < 0,01$) pelo teste F.

^{ns} Não significativo

Ao analisar os explantes que possibilitaram resposta morfogênética, observou-se que os tratamentos constituídos de 5, 10 e 20 μM de BAP isolados apresentaram as maiores médias para o número de brotos (com 1,58; 1,70 e 1,6 de brotos por explante, respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si e do tratamento com 2 μM de ANA + 20 μM de BAP (1,3 brotos por explante) (Tabela 3). Estes resultados sugerem que a adição de BAP nas concentrações, é necessária para a indução de maior número de brotos.

Em relação ao tipo de explante utilizado, observou-se o maior número de brotos quando utilizado segmentos nodais cotiledonares, contudo este resultado não apresentou diferença estatística significativa em relação ao resultado aos segmentos nodais apicais (Tabela 4).

Tabela 3. Valores médios para o número de brotos obtidos em segmentos nodais de *M. brauna* em função dos tratamentos com as diferentes concentrações de BAP e ANA, combinadas ou não entre si.

	TRATAMENTOS	NÚMERO DE BROTOS
1	CONTROLE	0,56 de
2	ANA 2,0 µM	0,29 e
3	ANA 2,0 µM + BAP 5,0 µM	0,96 cd
4	ANA 2,0 µM + BAP 10,0 µM	1,05 bcd
5	ANA 2,0 µM + BAP 20,0 µM	1,30 abc
6	BAP 5,0 µM	1,58 ab
7	BAP 10,0 µM	1,70 a
8	BAP 20,0 µM	1,65 ab
9	ANA 4,0 µM	0,53 de
10	ANA 4,0 µM + BAP 5,0 µM	0,46 de
11	ANA 4,0 µM + BAP 10,0 µM	0,50 de
12	ANA 4,0 µM + BAP 20,0 µM	0,76 cde

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste Tukey.

Tabela 4. Valores médios para o número de brotos por explante obtidos em *M. brauna* em função dos tipos de explante com resposta (segmentos nodais cotiledonar, apical e intermediário). Segmento nodal = segmento nodal intermediário.

TIPOS DE EXPLANTES	NÚMERO DE BROTOS
Nó-apical	0,92 ab
Nó-cotiledonar	1,10 a
Segmento nodal	0,81 b

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste Tukey.

Em *M. brauna*, verificou-se a formação de brotos em todos os tratamentos testados em meio MS quando se utilizou os três tipos de segmentos nodais (apical, cotiledonar e intermediário) excisados das plântulas com 30 dias de cultivo *in vitro*. Foi possível verificar que segmentos nodais cotiledonares possibilitaram maior número de brotos, porém com alongamento menor aos demais tipos de explantes utilizados. Contrariamente, segmentos nodais apicais e intermediários possibilitaram maior comprimento das brotações comparativamente aos cotiledonares, sendo estes explantes os mais indicados para a propagação em *M. brauna*. Similarmente ao observado para *M. brauna*, em *Erythrina*

velutiva, explantes oriundos de segmentos nodais cotiledonares apresentaram a maior capacidade de regeneração, seguido do segmento nodal intermediário (Costa et al., 2010). Por outro lado, segmentos nodais intermediários de *Bauhinia cheilantha* apresentaram maior capacidade organogênica comparativamente ao cotiledonar (Gutiérrez et al., 2011). Em *Acacia catechu* também foi observada a regeneração de plântulas *in vitro* a partir de explantes oriundos de segmentos nodais (Sahni e Gupta, 2002).

No presente estudo também verificou-se a necessidade de uso de BAP para a indução da organogênese em *M. brauna*, verificando-se maior número de brotos formados em todas as concentrações (5, 10 e 20 μM) de BAP. A concentração de 5 μM de BAP pode ser a indicada para realizar a propagação *in vitro* nesta espécie visto que possibilitou maior alongamento e também valores superiores para número de brotos por explante para os três tipos de explantes utilizados. A necessidade de BAP também foi observada para *B. cheilantha*, obtendo-se o maior número de brotos (2,1) no tratamento com 1,5 mg L^{-1} de BAP (Gutiérrez et al., 2011), bem como em *Annona glabra* L., observando-se a formação de 1,33 brotos por explante quando adicionou ao meio de cultura 1 mg L^{-1} de BAP (Oliveira, 2006). No presente trabalho foi escolhida a citocinina BAP por possuir maior capacidade de indução de brotos quando comparada com outras citocininas (Cerdas et al., 1998; Ibañez et al., 2003) e por ser a mais utilizada na multiplicação de espécies lenhosas (Bennet et al., 1994). Samsudeen-Varisai et al. (1999) também mostraram que BAP, isoladamente ou em combinação com outras citocininas, induz a organogênese a partir de ápices caulinares de *Macrotyloma uniflorum*.

Ao analisar os tratamentos nos quais as concentrações de BAP foram associadas a ANA (2 e 4 μM) verificou-se uma tendência ao aumento do número de brotos a medida que se aumentava a concentração de BAP em *M. brauna*. Para algumas espécies como *E. velutiva* (Costa et al., 2010) e *Cordia trichotoma* (Mantovani et al., 1996) a maior capacidade de regeneração foi observado em segmentos nodais quando ANA e BAP foram adicionados ao meio de cultivo. Existem vários estudos de regeneração de plantas lenhosas com a utilização dos diferentes tipos de hormônios como ANA, BAP, GA_3 e AIB, isolados e/ou combinados entre si (Cerdas e Guzmán, 2004; Chen et al., 2010; González-Rodríguez et al., 2010; Golle et al., 2012; Junior e Scherwinski-Pereira, 2012; Assis et al., 2012). Estes resultados sugerem que a média de regeneração pode ser aumentada com a promoção de um balanço hormonal entre ANA e BAP, aumentando assim o número de brotações. As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e o alongamento celular e as citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical. O balanço entre estes dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e

organogênese nas culturas de tecidos e órgãos (Pasqual, 2001). Destaca-se que em *M. brauna* pôde-se observar também a formação de brotos, em menor quantidade, mesmo na ausência de reguladores de crescimento em todos os tipos de explantes testados (segmentos nodais). Este resultado sugere que a quantidade de citocinina endógena contida no explante pode promover a indução de brotações. A menor exigência de citocinina para determinados genótipos pode estar associada aos altos teores endógenos, que aliados à adição deste regulador de crescimento ao meio de cultura, pode contribuir para um efeito decrescente na taxa de multiplicação.

A maior média referente ao comprimento dos brotos (1,49 cm) foi observada em explantes oriundos de segmentos nodais apicais mantidos no tratamento com 5 μM de BAP, não diferindo significativamente do tratamento com 10 μM de BAP (1,18 cm) (Fig. 3A). Em relação aos segmentos nodais cotiledonares, os maiores valores para o comprimento de brotos (1,04 e 1,07 cm, respectivamente) foram obtidos nos tratamentos com 5 e 10 μM de BAP, respectivamente, não diferindo significativamente entre si (Fig. 3B). Ao utilizar explantes oriundos de segmentos nodais intermediários, verificou-se os maiores comprimentos de brotos nos tratamentos com 5 e 10 μM de BAP isoladamente, obtendo-se 1,52 e 1,32 cm, respectivamente (Fig. 3C). Estes tratamentos por sua vez não diferem estatisticamente dos tratamentos com 20 μM de BAP isoladamente, e 10 e 20 μM de BAP combinados com 2 μM de ANA (Fig. 3C).

Neste sentido, para a variável comprimento de brotos foi possível verificar que segmentos nodais apicais e intermediários possibilitaram maior comprimento das brotações comparativamente aos cotiledonares, sendo estes explantes os mais indicados para a propagação em *M. brauna*. Adicionalmente, observou-se os maiores valores para este parâmetro nos tratamentos com 5, 10 e 20 μM de BAP isolados. As citocininas podem favorecer o alongamento de brotos, contudo, é necessário que se adicione ao meio a concentração adequada, sendo esta específica para cada espécie (Grattapaglia e Machado, 1998). Entretanto, alguns autores afirmam que o aumento da concentração de citocininas adicionadas no meio de cultura pode provocar a diminuição do comprimento dos brotos (Erig et al., 2002; Nicioli et al., 2008).

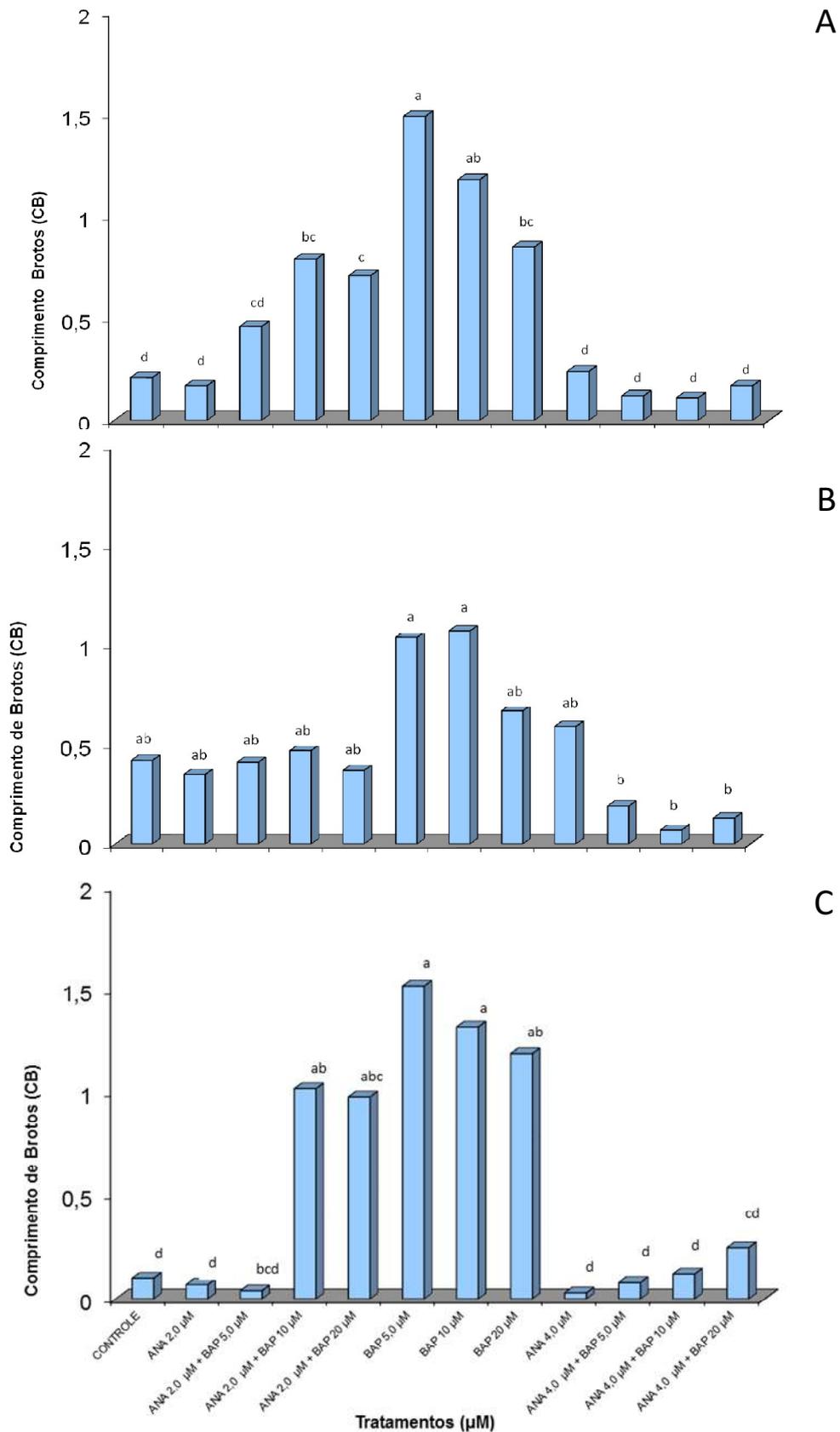


Figura 3. Comprimento (cm) de brotos obtidos na morfogênese *in vitro* em *M. brauna* a partir de explantes oriundos de segmentos nodais apicais (A), cotiledonares (B) e nodais intermediários (C) sob diferentes concentrações de ANA e BAP, combinados ou não entre si. As médias seguidas de mesma letra não diferentes estatisticamente entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

A Figura 4 mostra o aspecto morfológico das brotações de *M. brauna* obtidas a partir de explantes oriundos de segmentos nodais apicais e cotiledonares.

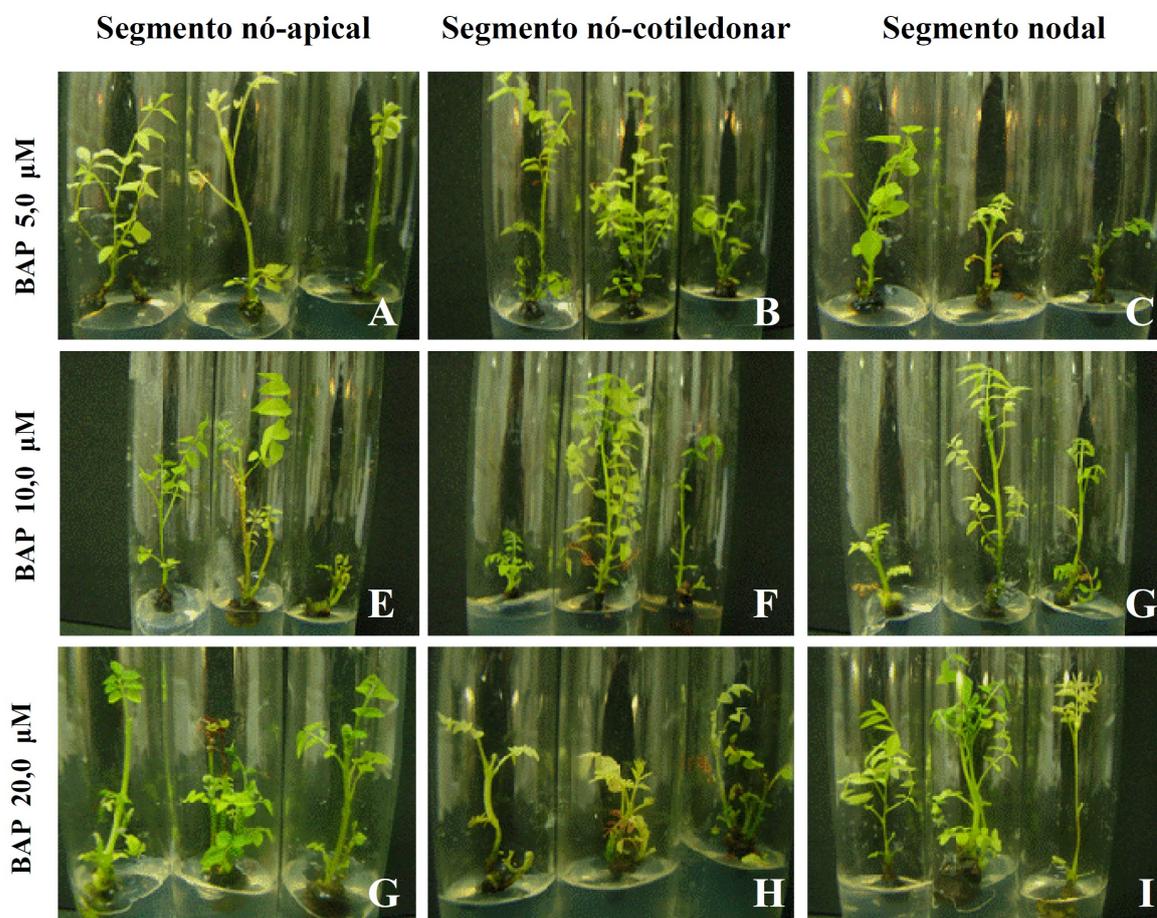


Figura 4. Aspecto morfológico de brotações de *M. brauna* obtidas a partir de explantes oriundos de segmentos nodais apical, cotiledonare e intermediários (nodal) após 30 dias de incubação em diferentes concentrações da citocinina BAP.

Similarmente ao observado para *M. brauna*, em *D. nigra* somente foi observada a formação de brotos para os explantes oriundos de segmentos nodais apicais, intermediários e cotiledonares. Pela análise estatística verificou-se efeito significativo ($P \leq 0,01$) para a interação “tratamentos x explantes” para as variáveis analisadas (Tabela 5) utilizando-se segmentos nodais apicais, cotiledonares e intermediários em *D. nigra*.

Tabela 5. Resumo da análise de variância (ANOVA) para as variáveis número de brotos por explante e comprimento (cm) da parte aérea dos brotos em função do tipo de explante de *D. nigra* sob diferentes concentrações de ANA e BAP, combinadas ou não entre si.

Fatores de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS	
		Número de brotos	Comprimento de brotos
Tratamentos	11	1,57**	1,49**
Explantes	2	1,88**	1,88**
Tratamento x Explantes	22	0,94**	0,48**
Resíduo	144	67,7	56,1
CV (%)		43,6	74,6

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($P < 0,01$) pelo teste F.

Explante oriundos de segmentos nodais apicais apresentaram maior número de brotos por explante no tratamento com 10 μM de BAP (1,35 brotos por explante), não diferindo estatisticamente dos tratamentos com 5 μM (1,25 brotos por explante) e 20 μM de BAP (1,27 brotos por explante) (Fig. 5A), mostrando a necessidade somente de citocinina para a indução de brotos neste tipo de explante. Similarmente, Andrade et al. (2000) também verificaram em *Myracrodruon urundeuva* que os segmentos nodais apicais e intermediários foram mais responsivos quando inoculados em meio de cultura contendo somente BAP (4,5 μM).

Por outro lado, em segmentos nodais cotiledonares de *D. nigra* verificou-se maior número de brotos por explante nos tratamentos com 4 μM de ANA + 20 μM de BAP (2,15 brotos por explante) e 4 μM de ANA + 10 μM de BAP (1,8 brotos por explante), os quais não diferiram estatisticamente do tratamento com 5 μM de BAP (1,3 brotos por explante) (Fig. 5B). Para este tipo de explante, os resultados mostram que a combinação de auxina com citocinina é fundamental para induzir maior número de brotos. Similarmente, em *Tectona grandis* também foi verificado a maior formação de brotos (1,75) em segmentos nodais quando combinado ANA (0,5 μM) e BAP (2,2 μM) (Junior et al., 2009), bem como em *Eugenia dysenterica* o maior número de brotações foi obtido utilizando BAP (8,5 μM) e ANA (0,5 μM) (Martinotto, 2004). Arello & Pinto também obtiveram resultados satisfatórios na indução de brotações de pau-santo (*Kielmeyera coriacea* Martius) utilizando a combinação de BAP (22 μM) com ANA (0,5 μM). Utilizando segmentos nodais intermediários, o maior número de brotos foi observado no tratamento com 10 μM de BAP (2,1 brotos por explante), não diferindo estatisticamente dos tratamentos com 5 e 20 μM de BAP isoladamente, e o tratamento com 2 μM de ANA + 10 μM de BAP, com 1,55 1,45 e 1,35 brotos por explante, respectivamente (Fig. 5C). Neste tipo de explante,

localizado entre o apical e o cotiledonar, verifica-se resultados positivos tanto com BAP isoladamente, mas também a combinação deste com a auxina ANA. Segmentos nodais intermediários de *M. unundeuva* também foram mais responsivos em meio de cultura contendo somente BAP (4,5 μM). Estes resultados sugerem necessidades específicas de reguladores de crescimento, e combinações destes, conforme o tipo de explante utilizado em várias espécies, incluindo *D. nigra*.

Verificou-se que as altas concentrações de BAP utilizadas em *D. nigra* não interferiram na regeneração de brotos nos diferentes tipos de explantes, pois sabe-se que para muitas espécies lenhosas pode gerar uma menor eficiência nas respostas organogênicas in vitro, reduzindo principalmente o número e altura dos brotos formados, por apresentar um efeito fitotóxico ao explante. O uso de baixas concentrações de BAP ao meio de cultura também tem sido indicado como eficiente na multiplicação de brotos para espécies lenhosas como *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá), *Eucalyptus globulus* Labill e sucupira branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.) (Ponte, 1999; Coelho 1999; Cordeiro et al., 2004).

Para a variável comprimento de brotos o maior valor (0,85 cm) foi obtido no tratamento com 5 μM de BAP ao utilizar segmentos nodais apicais como fonte de explante, entretanto, não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Fig. 6A). Ao utilizar segmentos nodais cotiledonares, o maior comprimento de brotos foi obtido no tratamento com 2 μM de ANA (1,53 cm), não diferindo estatisticamente dos tratamentos contendo BAP (5, 10 e 20 μM) isoladamente, e a combinação de ANA (2 e 4 μM) com a maior concentração (20 μM) de BAP (Fig. 6B). Em relação ao segmento nodal intermediário, verificou-se maior número de brotos no tratamento com 10 μM de BAP (1,31 cm) não diferindo estatisticamente dos tratamentos com 5 e 20 μM de BAP, menor concentração de ANA (2 μM) combinada com 10 e 20 μM de BAP, a menor concentração de ANA (2 μM) isoladamente, e o controle (Fig. 6C).

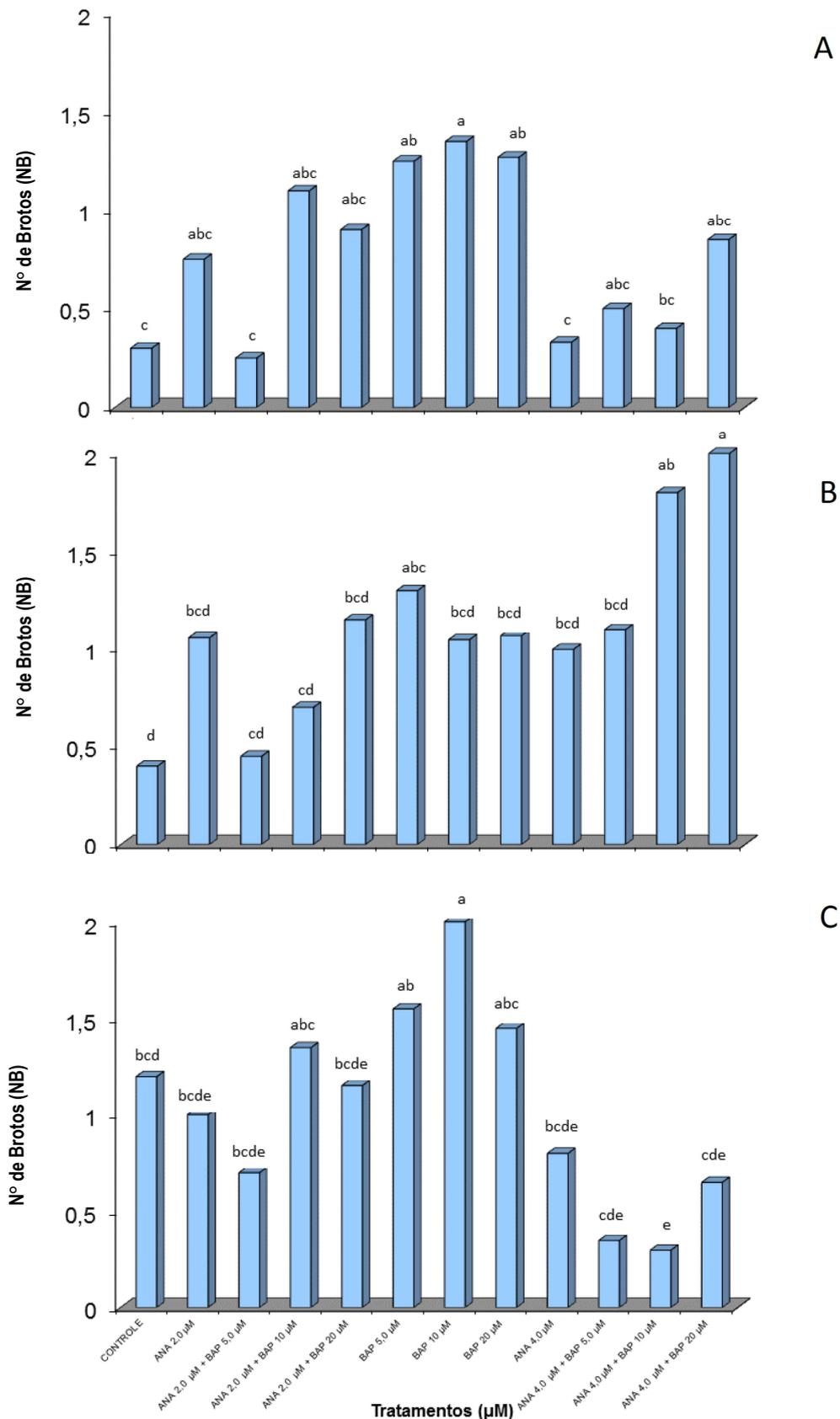


Figura 5. Número de brotos obtidos na morfogênese *in vitro* em *D. nigra* a partir de explantes oriundos de segmentos nodais apicais (A), cotiledonares (B) e intermediários (C) sob diferentes concentrações de ANA e BAP, combinados ou não entre si. Médias seguidas de mesma letra não diferentes estatisticamente entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

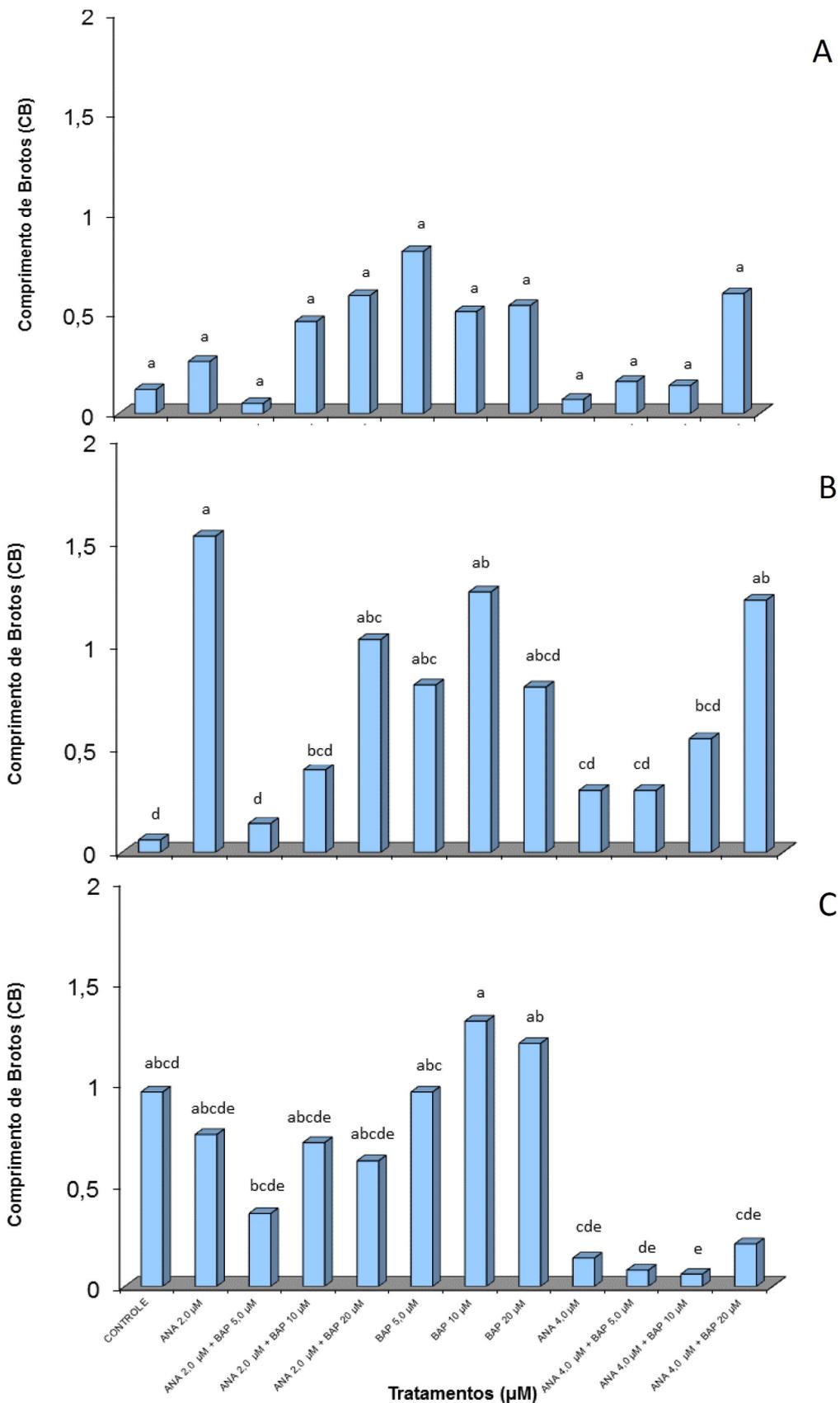


Figura 6. Comprimento (cm) de brotos obtidos na morfogênese *in vitro* em *D. nigra* a partir de explantes oriundos de segmentos nodais apicais (A), cotiledonares (B) e intermediários (C) sob diferentes concentrações de ANA e BAP, combinados ou não entre si. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir o uso de segmentos nodais cotiledonares e intermediários para a propagação em *D. nigra*. Para os segmentos nodais cotiledonares, sugere-se o tratamento com 4 μM de ANA + 20 μM de BAP, o qual apresentou maior número de brotos (Fig. 5B) e um bom alongamento dos brotos (Fig. 6B). Para os segmentos nodais intermediários, sugere-se o tratamento com 10 μM de BAP, o qual propiciou maior número (Fig. 5C) e alongamento (Fig. 6C) dos brotos. Pelos resultados observados, explantes oriundos de segmentos nodais apicais não apresentaram boa resposta para estes parâmetros (Figs. 5A e 6A) comparativamente aos cotiledonares e intermediários.

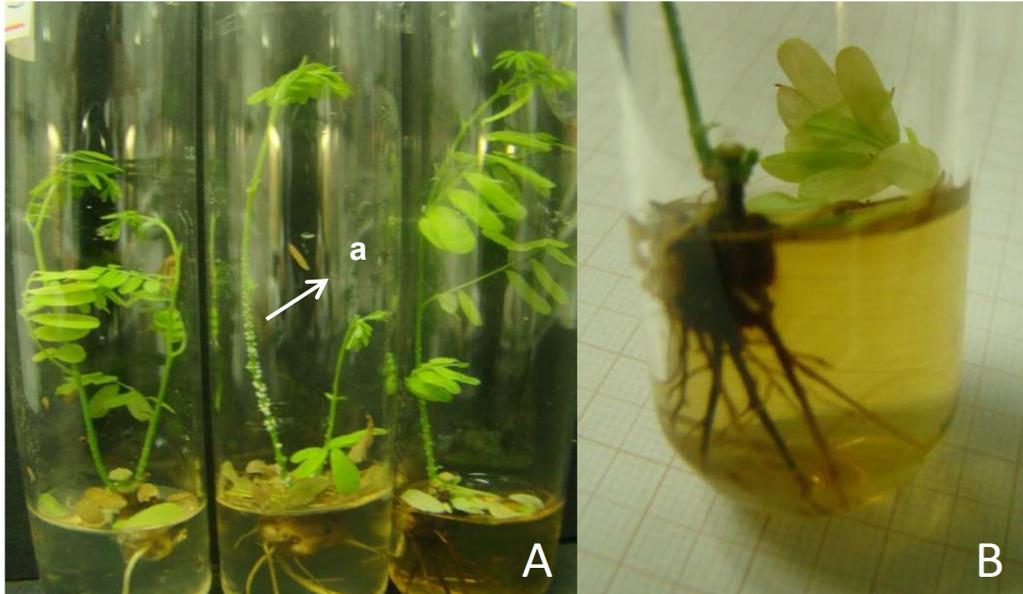
Nos resultados com *D. nigra*, verificou-se que, apesar dos tratamentos com BAP induzirem brotos e não interferirem no comprimento dos mesmos, alguns destes brotos apresentaram entre-nós próximos, queda das folhas e oxidação, sendo observado quando utilizou-se as concentrações de BAP associadas a ANA. Este resultado pode ser em decorrência da presença de BAP, uma vez que Sartor et al. (2013) verificaram na multiplicação *in vitro* de *D. nigra* a partir de meristemas apicais e gemas axilares de plântulas em meio com BAP (4, 9 e 18 μM) a presença de explantes oxidados, porém a concentração de 18 μM foi a que promoveu maior oxidação dos explantes.

A Figura 7 ilustra o aspecto morfológico de brotações de *D. nigra* obtida a partir de explantes oriundos de segmentos nodais cotiledonares e intermediários aos trinta dias de inoculação e verificou-se no tratamento ANA 2,0 μM a queda das folhas das brotações, possivelmente em decorrência da produção de etileno, propiciando assim esta resposta (Fig. 7A e D). Também verificou-se aos trinta dias a formação de lenticelas em alguns brotos no tratamento ANA 2,0 μM , provavelmente pela necessidade de aumentar a superfície de absorção para o oxigênio e sugerindo a transferência destas brotações para o ambiente de pré-aclimatização.

Segmento nó-cotiledonar

Segmento nodal

ANA 2,0 μ M



ANA 2,0 μ M

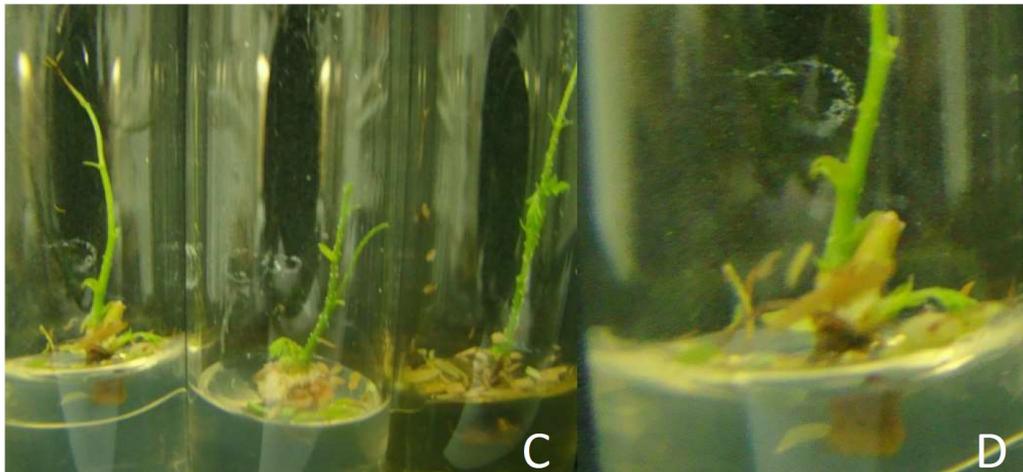


Figura 7. Aspecto morfológico de brotos de *D. nigra* a partir dos explantes segmentos nodais cotiledonares e intermediário (nodal) aos 30 dias de cultivo *in vitro*. A e C: abscisão foliar. A e B: enraizamento *in vitro* das brotações. (a)- lenticelas.

Ressalta-se a formação de raízes nas brotações induzidas *in vitro* nos tratamentos controle e com 2 μ M de ANA (Figs. 7 e 8). Este resultado para *D. nigra* sugere que não é necessário suplementar o meio de cultura MS com auxina para induzir o enraizamento, o que pode representar uma grande vantagem econômica, pois reflete na imediata redução dos custos com a eliminação do uso de reguladores na fase de enraizamento *in vitro*, além de facilitar a etapa de aclimatização das plantas. Este resultado também foi verificado em *E. velutina*, quando houve formação de raízes em meio de cultura suplementado com auxina (Costa et al., 2010).



Figura 8. Regeneração de raízes via organogênese direta em brotos de *D. nigra* provenientes de explantes de segmentos nodais cotiledonar aos 30 dias *in vitro* nos tratamentos controle (A) e 2 μM de ANA (B).

5.4.2 Efeito de diferentes reguladores de crescimento vegetal na morfogênese *in vitro* em segmentos nodais apicais e cotiledonares de *P. foliolosa*

Em *P. foliolosa* verificou-se que ambos os tipos de explantes oriundos de segmentos nodais (apicais e cotiledonares) responderam aos estímulos dos reguladores de crescimento exógenos testados neste estudo, nas diferentes combinações ou isoladamente, para estimular a formação de brotos (Figs. 9 e 10). A grande vantagem desse tipo de explante é que por envolver órgãos meristemáticos pré-formados, propicia maior estabilidade genética das plantas micropropagadas. Os ápices e gemas laterais isolados de plântulas germinadas *in vitro* são os principais tipos de explantes utilizados na micropropagação das espécies florestais (Oliveira et al, 2013). Salienta-se que a indução e expressão das possíveis respostas morfogênicas em culturas de células, tecidos e órgãos *in vitro* são dependentes de fatores externos, como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais (Vasil, 1987), e também de fatores inerentes ao material vegetal, como tipo e estado fisiológico do explante e da planta que lhe deu origem (Thorpe et al., 1991).

Em segmentos nodais apicais verificou-se o maior número de brotos por explante nos tratamentos onde a auxina ANA (0,5, 1 e 2,5 μM) foi combinada com 20 μM de GA₃, e também esta auxina (0,5 e 1,0 μM) combinada com 20 μM de BAP (Fig. 9A). Entretanto, a presença de ANA combinada com estes reguladores de crescimento (GA₃ e BAP), exceto o tratamento com ANA 2,5 μM + BAP 20 μM , reduziu o comprimento dos brotos, embora sem diferenças estatísticas significativas entre os demais tratamentos (Fig. 9B). Desta forma, ao avaliar os resultados para número (Fig. 9A) e comprimento (Fig. 9B) dos brotos nos tratamentos testados, sugere-se o meio de cultura sem reguladores de crescimento

(controle) para a propagação de *P. foliolosa in vitro*, quando utilizado segmentos nodais apicais.

Similarmente ao observado para segmentos nodais apicais, os explantes oriundos de segmentos nodais cotiledonares apresentaram maior número de brotos nos tratamentos combinando ANA com GA₃ e ANA com BAP, exceto no tratamento 2,5 µM de ANA + 20 µM de BAP (Fig. 10A). Por outro lado, o maior comprimento (8,8 cm) das brotações foi obtido neste tratamento combinando 2,5 µM de ANA com a maior concentração (20 µM) de BAP (Fig. 10B). Desta forma, para este tipo de explante, sugere-se o uso de 2,5 µM de ANA + 20 µM de BAP para a propagação *in vitro*, pois embora tenha propiciado um menor número de brotos, estes foram significativamente mais longos.

Comparando os dois tipos de explante, foi possível observar que explantes nodais cotiledonares (Fig. 10) possibilitaram maior número de brotações comparativamente aos nodais apicais (Fig. 9).

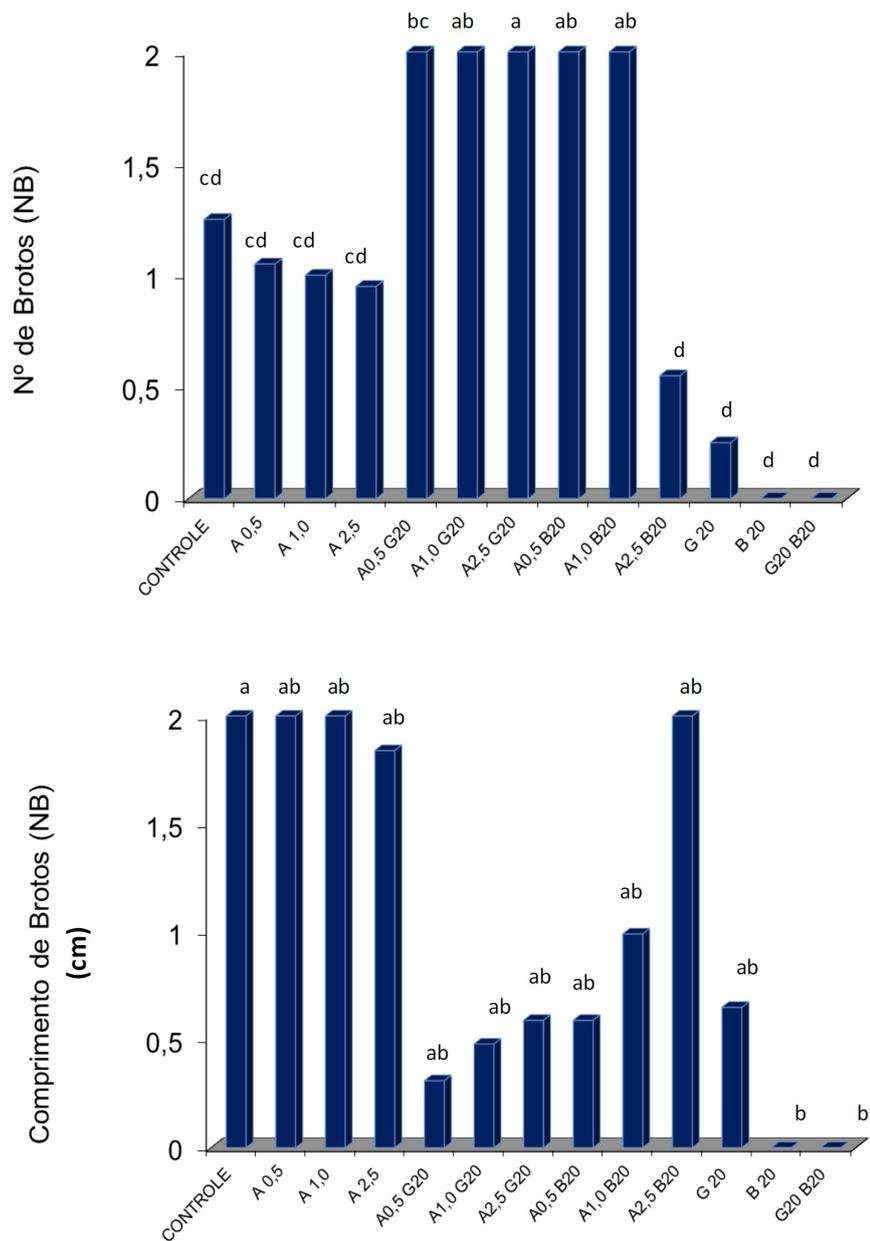


Figura 9. Número (A) e comprimento (B) de brotos em *P. foliolosa* obtidos a partir de segmentos nodais apicais sob diferentes concentrações de ANA, BAP e GA₃. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0,05$) pelo teste Tukey. A = ANA; B = BAP, G = GA₃, CV = coeficiente de variação. (CV número de brotos = 23,2 %, CV comprimento de brotos = 13,2 %).

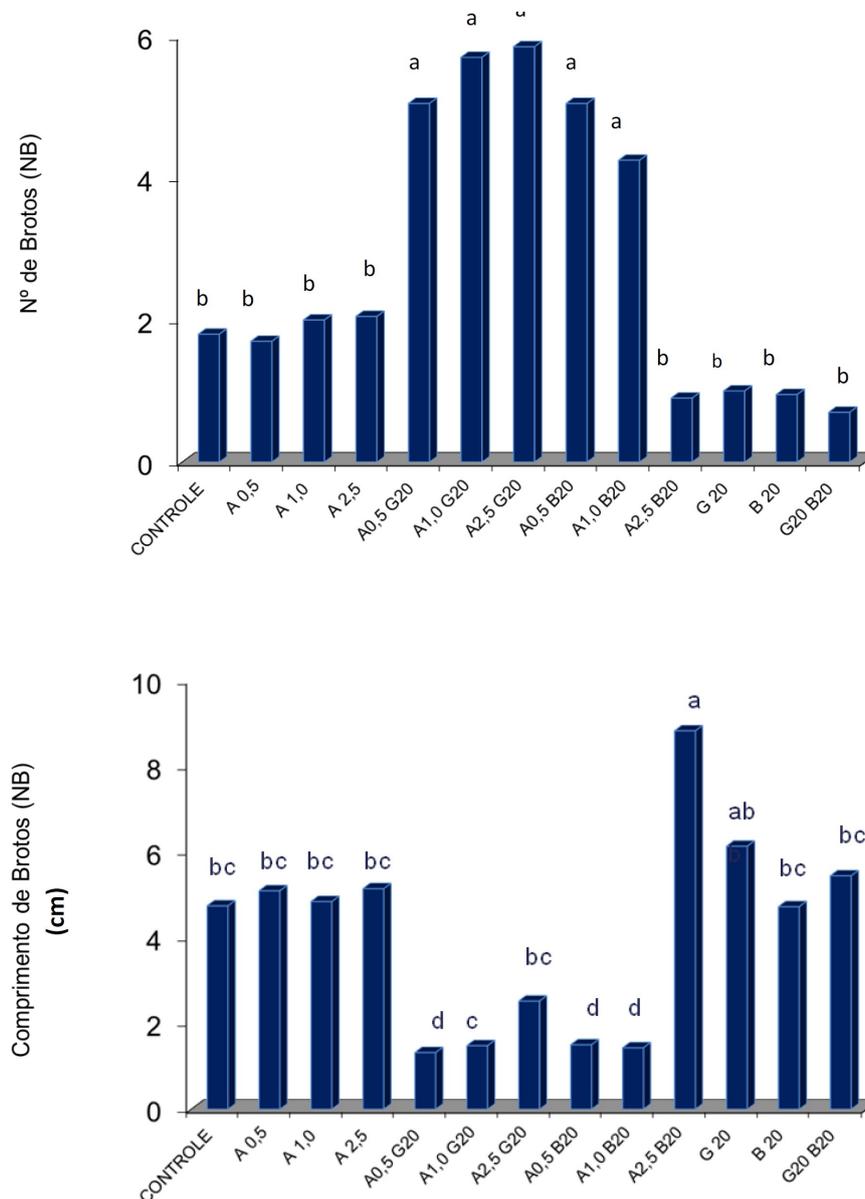


Figura 10. Número (A) e comprimento (B) dos brotos em *P. foliolosa* obtidas a partir de segmentos nodais cotiledonares sob diferentes concentrações de ANA, BAP e GA₃. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0,05$) pelo teste Tukey. A = ANA; B = BAP, G = GA₃, CV = coeficiente de variação. (CV número de brotos = 23,2 %, CV comprimento de brotos = 13,2%).

Em *P. foliolosa*, observou-se o maior número de brotos por explantes ao se utilizar o explantes oriundos de segmentos nodais cotiledonares (Fig. 10). Este resultado pode estar relacionado há existência de cotilédones neste tipo de explante, o qual pode ter resultado em maior habilidade na emissão de brotos nestes tipos de segmentos nodais devido à maior juvenildade desse tipo de explante, já que o cotilédone é uma estrutura embrionária formada por meristema, tecido não diferenciado, capaz de multiplicar-se por divisão celular e formar outros tecidos (Ferri et al., 1981). Resultados semelhantes foram encontrados por Costa et al. (2010), onde o segmento cotiledonar apresentou a maior capacidade de regeneração em relação ao segmento nodal intermediário em explantes de *E.*

velutina. Para *Plathymenia reticulata*, também verificou-se que os explantes de segmentos cotiledonares apresentaram maior número de brotos (7,8) por explante (Moura et al., 2012). Nascimento (2008), observou que o segmento cotiledonar foi o melhor tipo de explante para regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida* ao comparar com o segmento nodal intermediário. Adicionalmente, Curti (2011) verificou que o uso de epicótilo contendo o nó cotiledonar aumentou o número de brotações axilares em *Peltophorum dubiu*.

A utilização dos reguladores de crescimento, como as citocininas, são indispensáveis à divisão celular, quebra da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias (Preece, 1995; Grattapaglia e Machado, 1998) e as auxinas, outro grupo de reguladores de crescimento fundamentais na indução da divisão celular e diferenciação de raízes, muitas vezes utilizadas nas fases de multiplicação para favorecer o crescimento das culturas, como a caixeta (Mantovani e Franco, 1998). Desta forma, o sinergismo entre auxinas e citocininas é crítico para o controle da morfogênese *in vitro*. Elevadas concentrações de citocininas e baixas de auxinas induzem, predominantemente, a formação de gemas em detrimento da formação de raízes e calos e vice-versa. Este efeito sinérgico entre auxinas e citocininas foi verificado para muitas plantas propagadas *in vitro* (Casado et al., 2002; Salvi et al., 2002; Martin, 2003). Este balanço hormonal adequado entre os reguladores de crescimento é necessário para desencadear ou induzir e estimular os processos organogênicos em diversas espécies vegetais, como observado em *P.foliolosa* no presente estudo. Desta forma, o balanço entre auxina (ANA) e citocinina (BAP) promoveram maiores médias nos tratamentos ANA 0,5 μM + BAP 20 μM (1,9) e ANA 1,0 μM + BAP 20 μM (1,95) para a variável número de brotos.

Em *P. foliolosa* também ocorreu a formação de brotos no tratamento com ausência de reguladores de crescimento para os dois tipos de explantes utilizados. Este resultado aponta para a existência de quantidades endógenas de citocinina e auxina nos diferentes explantes que permitem o desenvolvimento das brotações. Benmahioul et al. (2009) constataram melhor crescimento ($\sim 2,5$ cm) da parte aérea de embriões isolados de pistache (*Pistacia vera* L.), em meio MS na ausência de regulador de crescimento vegetal. Também observou-se a formação de brotos nos tratamentos em que utilizou-se a auxina ANA isoladamente para os dois tipos de explantes utilizados neste estudo, sendo maior para segmentos nodais cotiledonares. Lundergan e Janick (1979) confirmam a tendência das auxinas, quando adicionadas ao meio de cultura, contribuírem para o alongamento das

brotações. Este resultado é interessante para dar promover ou possibilitar às etapas de enraizamento e aclimatização dos brotos desenvolvidos *in vitro* de *P. foliolosa*.

De forma geral, as combinações utilizadas de BAP e GA3 isoladas quando associadas às diferentes concentrações de ANA, resultaram na redução do comprimento de brotos axilares em *P. foliolosa*, pois obtiveram um comprimento abaixo de 1,2 e 2,2 cm para segmentos nodais apicais e cotiledonares, respectivamente, exceto para ANA 2,5 µM + BAP 20 µM. Similarmente, também foram verificados resultados baixos para altura de brotos em *Plathymenia reticulata* quando utilizou-se combinações de BAP e ANA para alongamento de brotos (Moura et al, 2012). A altura dos brotos é fator importante, necessário para os subcultivos das brotações e para dar seguimento às etapas de enraizamento dos brotos e posterior aclimatização das mudas. Sabe-se que brotos com tamanho reduzido apresentam dificuldades ao enraizamento, e assim comprometer o desenvolvimento da muda e posteriormente originar uma baixa sobrevivência na fase de aclimatização.

Verificou-se também que quando as concentrações de ANA foram associadas às maiores concentrações de BAP (20 µM) e GA₃ (20 µM), houveram formações de calos na base dos explantes (95%) e esta resposta interferiu negativamente comprometendo o crescimento e desenvolvimento dos brotos formados (Figs. 11, 12 e 13). Resultados similares à ação calogênica do ANA também foram observados em *C. trichotoma* (Mantovani et al., 2001). Provavelmente esta calogênese deve ter ocorrido em pelo balanço entre a auxina e elevadas concentrações de citocinina (20 µM), resultando no desenvolvimento de calos. De maneira geral, concentrações elevadas de reguladores de crescimento vegetal favorecem a formação de calos (Bandeira et al., 2005), por ativar a divisão celular em células da base do explante exposta ao meio de cultura.

O maior comprimento dos brotos (2 cm) em *P. foliolosa* foi observado na ausência dos reguladores de crescimento vegetal utilizando-se segmento nodais apicais, sugerindo que este explante possa apresentar uma alta taxa endógena de auxina, já que se sabe que as auxinas são substâncias que controlam o crescimento e o alongamento celular. Este resultado também foi encontrado por Kang et al. (2009), que também registraram o maior comprimento dos brotos de *Populus trichocarpa* em meio isento de reguladores de crescimento vegetal. Benmahioul et al. (2009) constataram melhor crescimento (~ 2,5 cm) da parte aérea de embriões isolados de pistache (*Pistacia vera* L.) em meio MS sem regulador de crescimento vegetal. Por outro lado, segmentos nodais cotiledonares de *P. foliolosa* necessitaram de BAP e ANA para induzir maior número e comprimento de brotos, sugerindo a necessidade de um balanço entre estes dois reguladores de crescimento

para que ocorra a resposta morfogenética nesta espécie. De acordo com Santos et al. (2006) as variações nas respostas obtidas decorrem, certamente, do balanço hormonal interno de cada planta, bem como do tipo de explante para desenvolver a resposta morfogenética. Sabe-se que a indução ou a inibição dos processos morfogenéticos *in vitro* dependem do balanço e da interação entre as substâncias de crescimento endógenas e exógenas (Monfort et al., 2012). Neste sentido, estudos futuros analisando a quantidade e tipos de auxinas e citocininas em cada tipo de explante é fundamental para entender esta variação na resposta morfogenética associando os diferentes explantes aos diferentes tratamentos.

Verificou-se aos trinta dias de incubação a senescência de folhas dos brotos em *P. foliolosa*, indicando a possível presença de etileno no microambiente (tubo de cultura) e assim estimulando a abscisão de folhas (Figs. 11, 12 e 13). Embora não quantificado, esta queda das folhas é um forte indicativo da presença de etileno, que segundo Grattapaglia e Machado (1998) o acúmulo desse regulador de crescimento pode interferir na morfogênese das culturas, acelerando a senescência destas. Sabe-se que o etileno é um hormônio gasoso, cujo aumento está associado à perda de clorofilas e ao desaparecimento gradual da cor, que são aspectos característicos da senescência de folhas (Alvarenga et al., 2012). Neste sentido, a senescência de folhas *in vitro* é totalmente indesejável (Canto et al. 2009), uma vez que o acúmulo de etileno tem efeito adverso no desenvolvimento das plantas, afetando a diferenciação, desenvolvimento, morfologia e crescimento, diminuindo a expansão foliar e o comprimento dos brotos, inibindo a regeneração de novos brotos e causando necrose apical (Erig e Schuch, 2005), além de promover abscisão foliar nos cultivos *in vitro*. Em *Anadenanthera colubrina*, também foi verificado a presença do etileno no cultivo *in vitro*, causando abscisão foliar e assim dificultando o crescimento dos brotos adventícios com diminuição do comprimento da parte aérea dos brotos (Nepomuceno et al., 2009). Lemos e Blake (1994) também relatam que em algumas espécies lenhosas ao serem cultivadas *in vitro* apresentam algumas respostas ao ambiente em que foram submetidas, e como consequência, observou-se a abscisão foliar e a redução no crescimento *in vitro*, impossibilitando a continuação do processo de micropropagação. Em cultivos com *Annona*, Zobayed et al. (2002) verificaram uma alta abscisão foliar quando os explantes são cultivadas em recipientes com restrição de trocas gasosas.

As figuras 11, 12 e 13 mostram os aspectos morfológicos das brotações oriundas de segmento nodais apicais e cotiledonares de *P. foliolosa* incubadas nos diferentes tratamentos testados. Pode-se verificar o desenvolvimento das brotações em alguns experimentos, bem como a presença de calos na combinação de ANA com BAP ou GA₃.

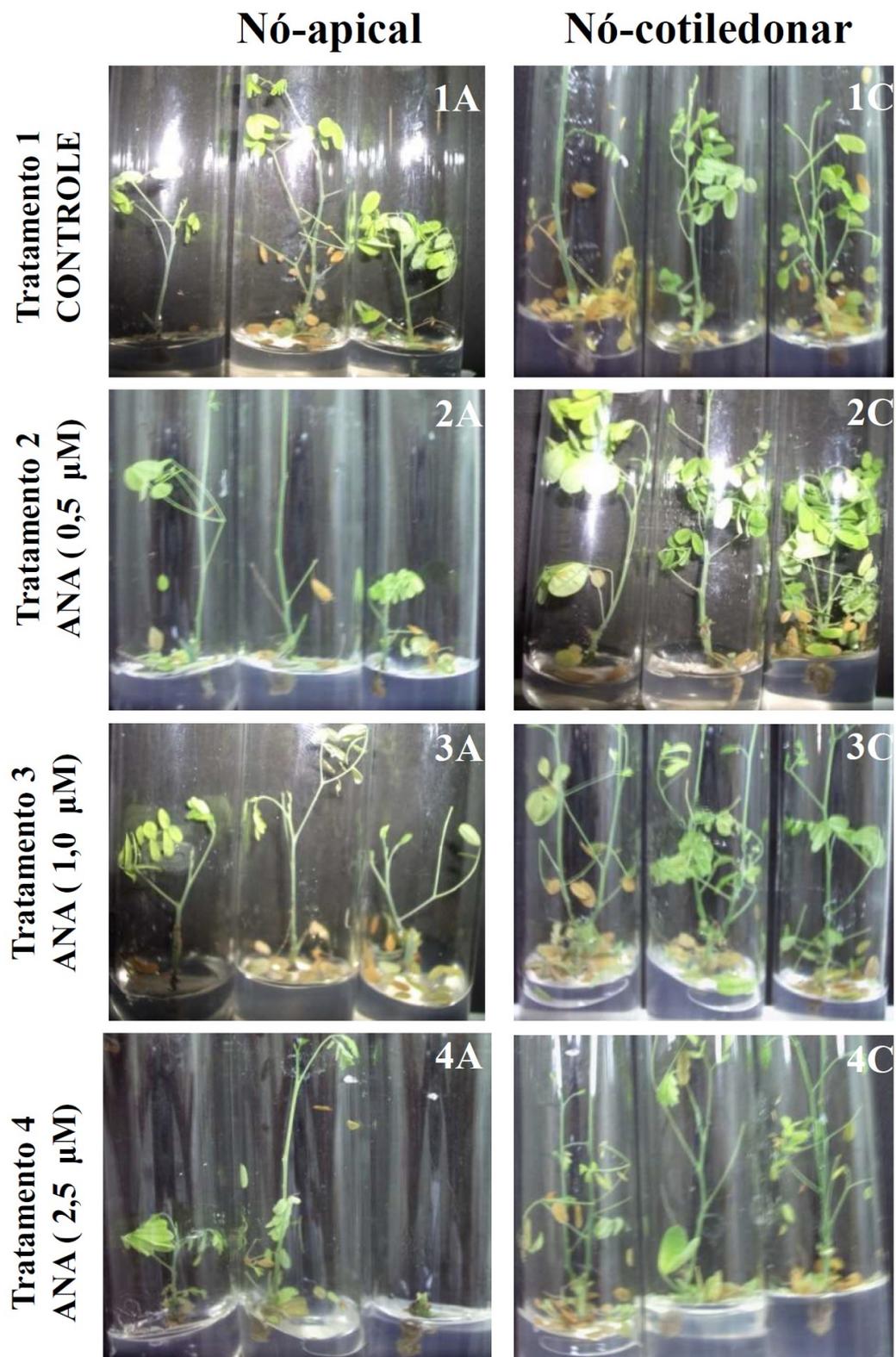


Figura 11. Regeneração de brotos via organogênese direta em *P. foliolosa*, a partir dos explantes segmento nodais cotiledonar e apical aos 30 dias de cultura *in vitro* com diferentes tratamentos, verificando-se a abscisão foliar nas brotações.

Nó-apical

Nó-cotiledonar

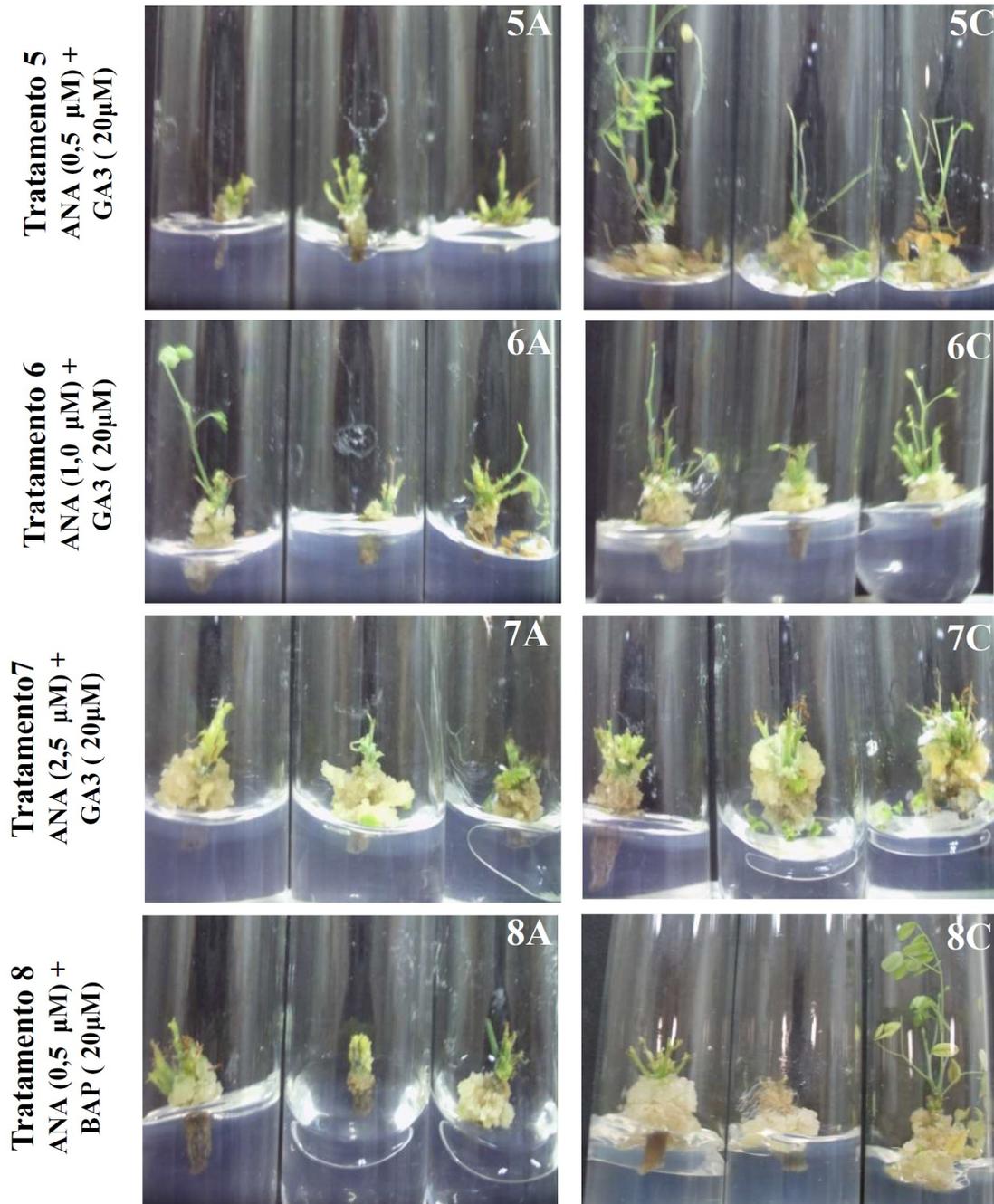


Figura 12. Regeneração de brotos via organogênese direta em *P. foliolosa*, a partir dos explantes segmento nodais cotiledonar e apical aos 30 dias de cultura *in vitro* com diferentes tratamentos, verificando-se a abscisão foliar nas brotações.

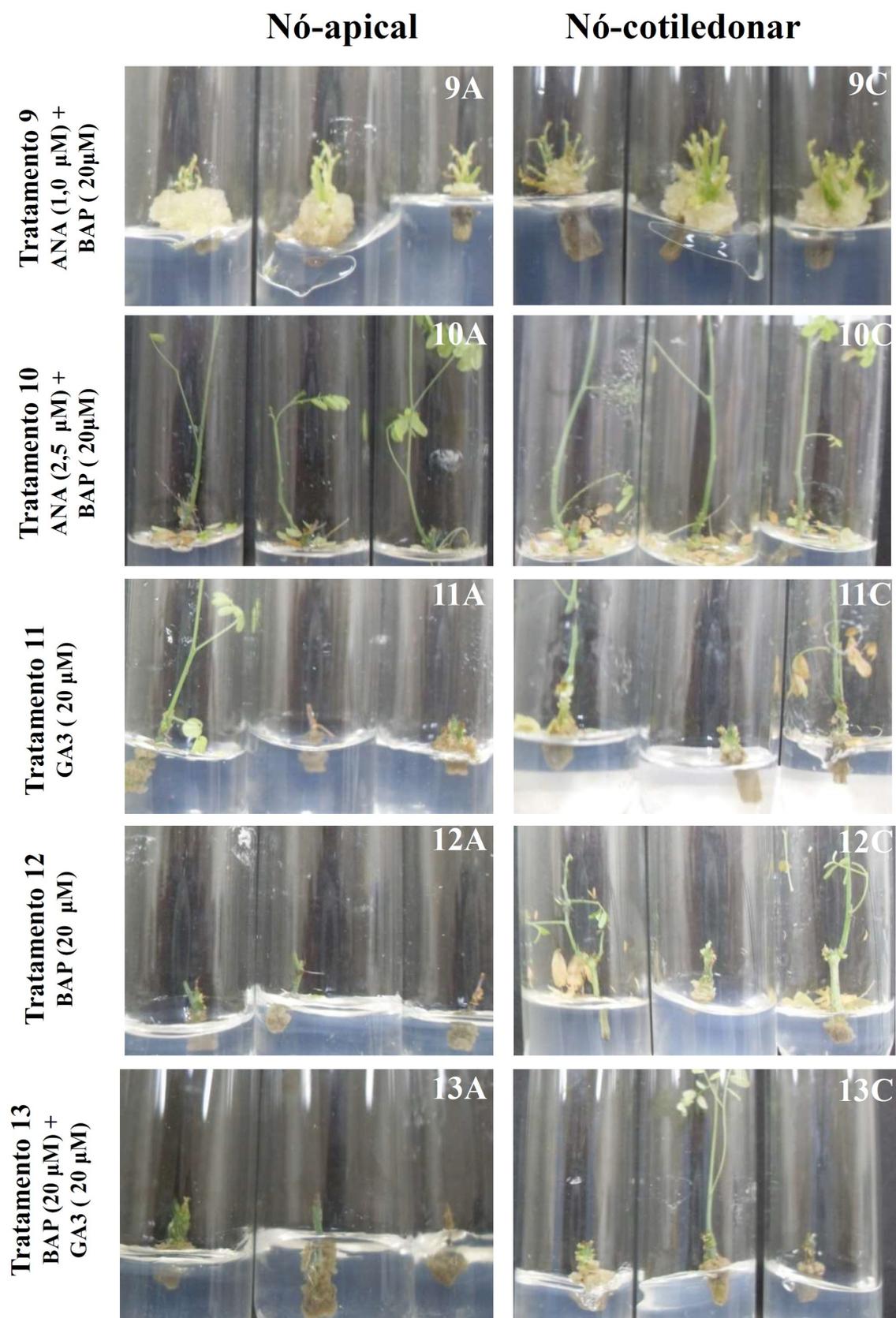


Figura 13. Regeneração de brotos via organogênese direta em *P. foliolosa*, a partir dos explantes segmento nodais cotiledonar e apical aos 30 dias de cultura *in vitro* com diferentes tratamentos, verificando-se a abscisão foliar nas brotações.

Apesar de ter ocorrido o desenvolvimento de brotações em *P. foliolosa* ao final de 30 dias de incubação (Figs. 11-13), observou-se a formação de calos e botos em alguns tratamentos utilizando auxina (ANA), citocinina (BAP) e ácido giberélico (GA₃) em ambos os tipos de explantes (segmentos nodais apicais e cotiledonares) (Fig. 14). Sabe-se que reguladores de crescimento abrangem moléculas de ocorrência endógena nos tecidos vegetais e seus análogos, chamados por sintéticos, são sinalizadores e influenciam o desenvolvimento da planta quando aplicados de forma exógena. Na planta, as auxinas são produzidas nas regiões de crescimento celular localizadas nos ápices dos ramos e, em menor quantidade, nas raízes, e seu transporte ocorre do topo da planta em direção à base. As citocininas estão envolvidas em processos de divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea e são utilizadas nas culturas *in vitro* para a regeneração das plantas. Na planta, a síntese das citocininas ocorre nas raízes e seu transporte é feito da base em direção à parte aérea (Hartmann al., 1988; Taiz e Zeiger, 2009).

Nunes (2000) relata que cada tecido possui um balanço endógeno de hormônios, definido principalmente pela idade e pela localização do explante, que irá interagir com os reguladores de crescimentos exógenos que são fornecidos no meio de cultura, promovendo ou inibindo os processos de divisão e diferenciação celular. Para a indução de calos é possível com a adição de uma auxina ao meio de cultura, ou utilizando uma combinação de auxina e citocinina podem induzir calos (Nwewan et al., 1996). O balanço entre auxinas e citocininas, que podem agir sinergisticamente na regulação da divisão celular, processo essencial para a formação do calo (Johri e Mitra, 2001; Roy e Banerjee, 2003). Também é conhecido que altas concentrações de citocininas no meio de cultura podem induzir excessiva formação de calos em explantes de espécies lenhosas. Neste sentido, o desenvolvimento de calo pode ser independente de auxinas e citocininas, dependente de auxinas, dependente de citocininas ou dependente de ambas (Jaime et al., 1995).

Nos dois tipos de explantes utilizados em *P. foliolosa*, os calos formados apresentaram dois tipos principais de calos: a) calos com aspecto friável e translúcidos com tonalidades verde/amarelado, e b) calos com aspecto compacto e tonalidade bege/marrom, sendo este observado em menor quantidade. Alguns calos formados também apresentaram aspecto heterogêneos misturando estes dois tipos de calos. Verificou-se a formação dos calos nos tratamentos controle, BAP (20 µM) associado com as diferentes concentrações de ANA (0,5, 1 e 2,5 µM), bem como a maior concentração de BAP (20 µM) associado com GA₃ (20 µM) (Fig. 14). Amaral (2006) verificou a formação de calos em 95% dos explantes oriundos de segmentos nodais cotiledonar em *Cedrela fissilis* quando utilizou 5 µM de BAP.

De maneira geral, calos com potencial morfogenético para desenvolvimento de brotações ou para a embriogênese somática são caracterizados pela morfologia e coloração. As porções translúcidas amareladas dos calos são consideradas friáveis e com potencial para formar embriões somáticos (Guerra et al., 1999; Ipekci e Gozukirmizi, 2005; Arunyanart e Chaitrayagun, 2005). Os calos com aspecto friável e translúcido verdes/amarelados obtidos em *P. foliolosa* (Fig. 11) sugere que possam ter potencial morfogenético, enquanto os compactos de coloração bege/marrom visualmente não apresentam potencial morfogenético. Entretanto, aliado aos aspectos morfológicos citados, análises anatômicas são importantes para caracterizar adequadamente quanto ao potencial para a resposta morfogenética, permitindo identificar a presença de células com características merismáticas, ou seja, células menores e isodiamétrica, com citoplasma denso e núcleo evidente ocupando maior volume da célula. A presença destas células permitem a organização de centros meristemáticos, os quais, dependendo do estímulo recebido, podem diferenciar embriões somáticos ou gemas vegetativas. Adicionalmente, a presença de regiões esverdeadas em calos pode ser atribuída a síntese de pigmentos de clorofila nas células de calos mantidos na presença de luz (Corredoira et al. 2002). Similarmente, Machado et al. (2010) obtiveram sucesso na formação de calos friáveis em *Jatropha curcas* quando combinaram ANA e BAP em meio de cultura MS, obtendo calos friáveis com coloração verde, creme e marrom.

Adicionalmente, a variação na pigmentação dos calos formados nos diferentes tipos de explantes de *P. foliolosa* variou, mostrando que esta variação da pigmentação e ausência da mesma, pode ocorrer de acordo a cada tipo de espécie. Geralmente, a pigmentação do calo é igual à do tecido que o originou, mas a pigmentação pode também ser perdida durante a cultura. O desenvolvimento de pigmentação verde, devido às clorofilas, está associado ao desenvolvimento de cloroplastos, que ocorre na presença de luz (Corredoira et al., 2002).

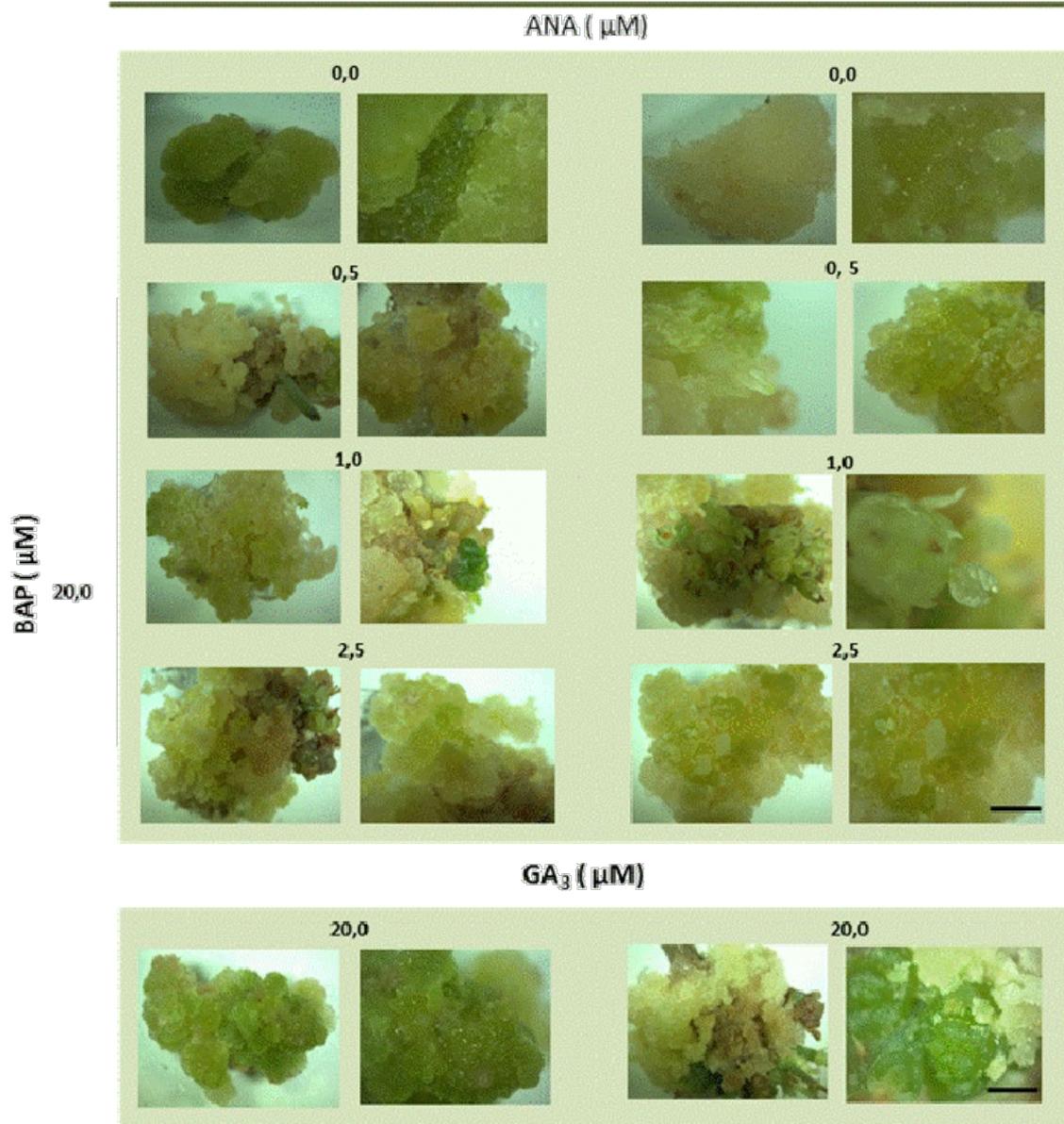


Figura 14. Aspectos morfológicos dos calos induzidos na morfogênese *in vitro* em *P. foliolosa* a partir de explantes oriundos de segmentos nodais apicais e cotiledonares incubados com BAP, ANA e GA₃, combinados ou não entre si. Barras: 1cm

Explantos oriundos de segmentos nodais cotiledonares de *P. foliolosa* incubados nos tratamentos com 20 μM de BAP; 0,5 μM de ANA + 20 μM de BAP e 1 μM de ANA resultaram na formação de gemas vegetativas (Fig. 14) a partir dos calos induzidos.

No tratamento com 20 μM de BAP + 1 μM de ANA foi possível observar o desenvolvimento das gemas vegetativas a partir de segmentos nodais cotiledonares, das quais é possível observar a presença de primórdios foliares (Fig. 15 - setas). Entretanto, análises anatômicas são necessárias para definir se a resposta obtida ocorreu por organogênese direta (a partir de gemas axilares pré-existentes) ou indireta (a partir da formação de gemas adventícias a partir de células do calo). O ápice meristemático é uma

estrutura organizada, que pode desenvolver-se diretamente da parte aérea em meio de cultura adequado, sem passar pela fase de calo (Torres et al., 1998).

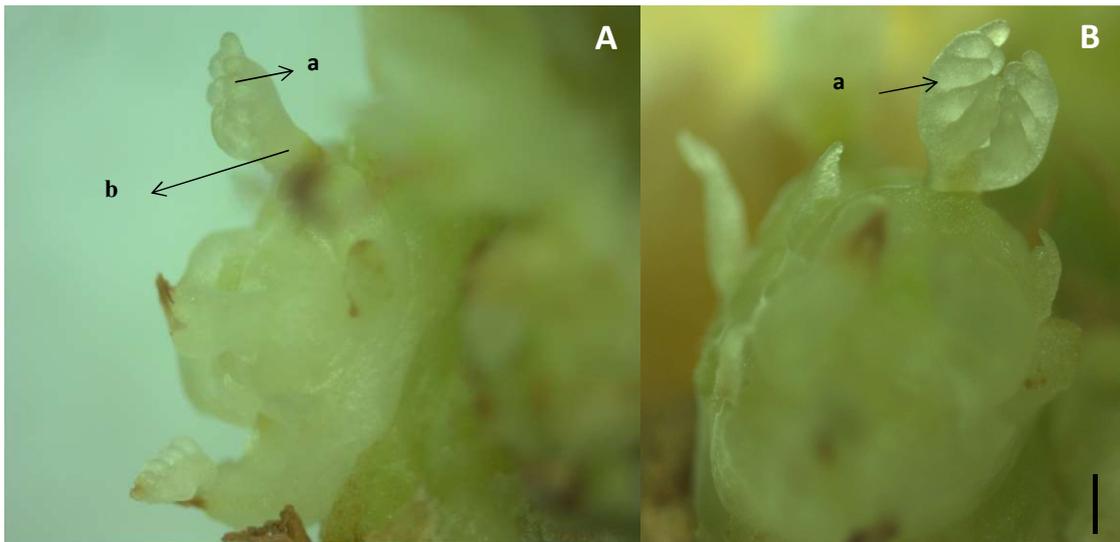


Figura 15. Aspectos morfológicos de gemas vegetativas (A e B) formadas a partir de segmentos nodais cotiledonares em *P. foliolosa*, mostrando o ápice (a - seta) e base (b - seta) da gema vegetativa, em meio de cultura contendo 20 μM de BAP + 1 μM de ANA. Barra: 1cm

Calos friáveis e translúcidos de tonalidade verde formados nos diferentes tratamentos apresentaram diferenças quanto à morfologia de gemas vegetativas em desenvolvimento, apresentando tonalidade verde-escuro (Fig. 16A-B) e verde-claro (Fig. 16C-D).

Também verificou-se a formação de gemas vegetativas para os tratamentos contendo 20 μM de BAP+ 0,5 μM de ANA (Fig. 17A-B) e 20 μM de BAP + 1 μM de ANA (Fig. 17C-D), em ambos os tipos de explantes (apicais e cotiledonares).

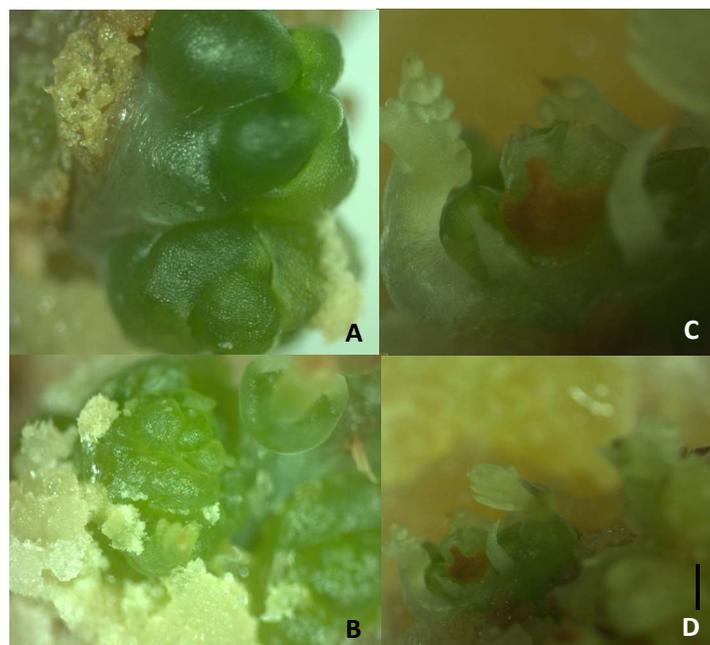


Figura 16. Aspectos morfológicos de calos translúcidos e friáveis mostrando o desenvolvimento inicial de gemas vegetativas com tonalidades verde-escuro (A e B) e tonalidades verde-claro (C e D). Barras: 1cm (A-D).

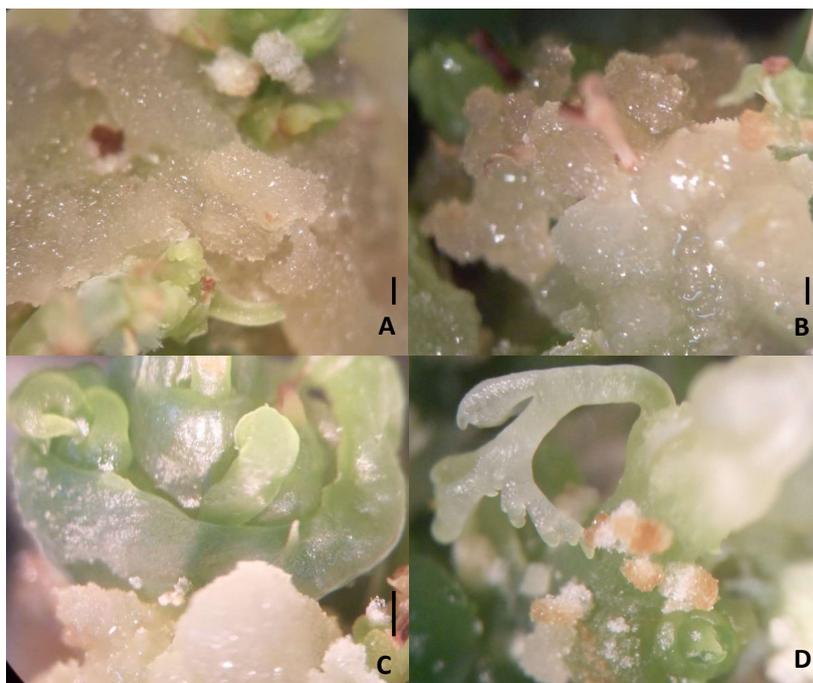


Figura 17. Aspectos morfológicos de calos friáveis e translúcidos em *P. foliolosa* obtidos no tratamento com 10 μM de BAP + 0,5 μM de ANA em segmentos nodais apicais (A) e cotiledonares (B) e no tratamento com 10 μM de BAP + 1 μM de ANA em segmentos nodais apicais (C) e cotiledonares (D), mostrando o desenvolvimento de gemas vegetativas. Barras: 1cm (C-D); 1 mm (A-B)

Quando utilizou-se a auxina ANA (1 e 2,5 μM) associada com 20 μM de giberelina (GA_3), verificou-se também a formação de calos verde/amarelados, friáveis e translúcidos na base dos explantes (Fig. 18A) e o desenvolvimento de gemas vegetativas (Figs. 18B-D), porém sem ocorrer o alongamento destas gemas em brotações.

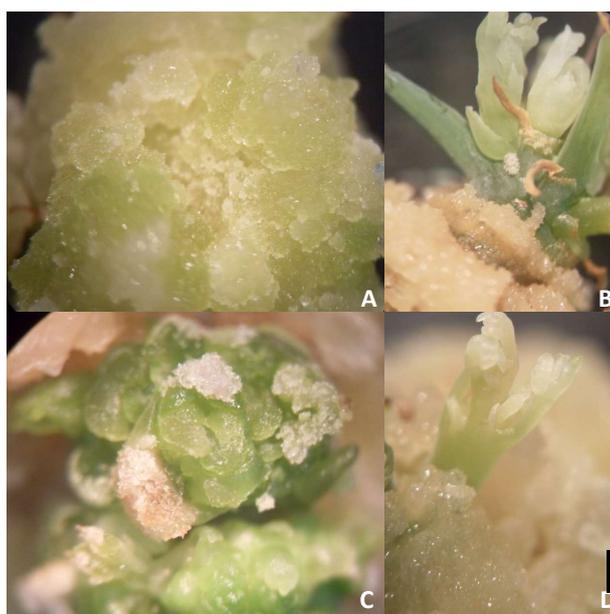


Figura 18. Aspectos morfológicos de calos friáveis e translúcidos em *P. foliolosa* obtidos no tratamento com 20 μM de GA_3 + 1 μM de ANA em segmentos nodais apicais (A) e cotiledonares (B) e no tratamento com 20 μM de GA_3 + 2,5 μM de ANA em segmentos nodais apicais (C) e cotiledonares (D), mostrando o desenvolvimento de gemas vegetativas. Barras: 1cm (A-D);

5.4.3 Enraizamento *ex vitro* e aclimatização em *M. brauna* e *P. foliolosa*

Para *M. brauna* e *P. foliolosa* os brotos adventícios obtidos *in vitro* foram enraizados em terra vegetal + vermiculita (2:1, v/v), se mantiveram num crescimento relativamente lento em fase de pré-aclimatização, onde os brotos para as duas espécies apresentaram todos muito vigorosos e com a evolução para os 30 dias em sala com temperatura e luz controlada, apenas 16 brotos mantiveram-se vigorosos e com desenvolvimento visível, uma boa taxa de sobrevivência de 53,3% para *M. brauna* e 65% para o *P. foliolosa* (Fig. 19).



Figura 19. Imagens mostrando o processo utilizado no enraizamento *ex vitro* de brotos micropropagados, observando-se os brotos de *M. brauna* transplantados em substrato florestal + vermiculita (A), e os brotos de *P. foliolosa* transplantados em substrato florestal + vermiculita (B).

Depois de pré-aclimatizados os brotos de *M. brauna* e *P. foliolosa* foram levados para casa de vegetação onde foram totalmente adaptados ao ambiente natural. Este resultado é primordial para a multiplicação *in vitro* em qualquer espécie vegetal, pois a necessidade de aclimatizar as plantas garante a sobrevivência das mesmas, quando adaptada ao ambiente natural (Figs. 20 e 21).



Figura 20. Aspectos da etapa de aclimatização de brotos micropropagados de *M. brauna* mostrando os brotos mantidos em sala com condições controladas de temperatura e fotoperíodo (A), seguido da transferência para a casa de vegetação para a aclimatização (B) e mudas aclimatizadas após 30 dias em casa de vegetação (C).



Figura 21. Aspectos da etapa de aclimatização de brotos micropropagados de *P. foliolosa* mostrando os brotos mantidos em sala com condições controladas de temperatura e fotoperíodo (A), seguido da transferência para a casa de vegetação para a aclimatização (B) e mudas aclimatizadas após 30 dias em casa de vegetação (C).

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, foi possível obter uma metodologia para a produção de brotos, via organogênese direta, cultivados em meio MS para as três espécies da família leguminosa, *M. brauna*, *D. nigra* e *P. foliolosa*.

5.5 Conclusões

Os explantes de segmento nodais apicais, cotiledonares e intermediários podem ser indicados para a multiplicação das três espécies estudadas na regeneração de brotos, pois apresentaram capacidade morfogênica na regeneração de brotos.

Para a espécie *M. brauna* sugere-se a utilização do explante nodal cotiledonar e apical, pois as maiores médias para a variável número de brotos foram observadas quando utilizou-se ANA (2 μM) + BAP (20 μM) e BAP (5, 10 e 20 μM) isoladamente para segmento nodal cotiledonar, e 5 e 10 μM de BAP isolados para segmentos nodais apicais.

Para a espécie *D. nigra* sugere-se a utilização do segmento nodal cotiledonar e intermediário, pois as maiores médias para a variável número de brotos foram observadas quando utilizado 4 μM de ANA associado a 20 μM de BAP, bem como 4 μM de ANA associado a 10 μM de BAP.

Para a espécie *P. foliolosa* indica-se a utilização do segmento nodal cotiledonar, pois as maiores médias para a variável número de brotos foram observadas quando utilizou-se ANA (2,5 μM) + GA₃ (20 μM) e ANA (0,5 e 1,0 μM) associados com GA₃ (20 μM) e ANA (0,5 e 1 μM) associados com BAP (20 μM).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se verificar padrões bioquímicos diferenciados na germinação de sementes das duas espécies, assim como respostas morfegênicas diferenciadas de acordo com o tipo de explante, tratamento e espécie utilizada.

A germinação é um processo complexo durante o qual a semente requer atividade metabólica para promover eventos celulares para que o embrião inicie o crescimento e desenvolvimento até a formação de uma plântula. Este trabalho sendo o primeiro a mostrar uma associação entre substâncias como açúcares solúveis, PAs e aminoácidos livres durante a germinação da semente e crescimento inicial das plântulas em *P. foliolosa* e *D. nigra*. Estes resultados colaboram para uma maior compreensão bioquímica no processo germinativo das sementes destas espécies ameaçadas de extinção, nativas da Mata Atlântica, uma das florestas mais ameaçadas no mundo.

No processo germinativo realizado para as espécies *P. foliolosa* e *D. nigra* pode ser verificado diferenças na germinação, onde sementes de *P. foliolosa* germinaram antes das sementes de *D. nigra*. Este resultado pode ter ocorrido provavelmente, em decorrência dos compostos presentes ou disponíveis no processo de germinação das suas sementes (como carboidratos e poliaminas) e pelo menor requerimento de água em *P. foliolosa* comparativamente com *D. nigra*. Verificou-se que sementes *D. nigra* necessitam de maior absorção de água comparado com as de *P. foliolosa*.

Em relação aos carboidratos, as sementes de *D. nigra* e *P. foliolosa* apresentaram sacarose, frutose e glicose. Porém, o carboidrato solúvel maltose só foi constatado nas sementes de *D. nigra* e pode estar associado ao alto conteúdo de glicose presente nesta espécie. No processo germinativo para as espécies *D. nigra* e *P. foliolosa* verificou-se a presença das PAs livres Put, Spd e Spm, com padrão diferenciado entre as espécies em especial para Spd e Spm. A partir dos resultados obtidos sugere-se que o alto conteúdo de sacarose em sementes maduras e aumento crescente no conteúdo de Spd e Spm durante a germinação (Fases I e II) em *P. foliolosa* podem estar relacionados com a germinação inicial nesta espécie. Por outro lado, o alto conteúdo de glicose e a presença de maltose em sementes maduras desidratadas e nas fases I e II da germinação sugerem que estes dados podem estar associadas com o maior tempo necessário para a germinação de sementes de *D. nigra*. Contudo, de forma similar para as duas espécies, pode-se verificar altos

conteúdos de Put livre e fructose em ambas, os quais podem ser necessários para o crescimento das plântulas (na fase III) em ambas as espécies.

Ademais, foram identificados 18 aminoácidos, onde sementes de *P. foliolosa* apresentaram conteúdos significativamente maiores para a maioria dos aminoácidos analisados em modo geral. Deste total 14 aminoácidos foram verificados em alto conteúdo nas sementes maduras de *P. foliolosa* (ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, histidina, glicina, arginina, treonina, alanina, GABA, tirosina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina e ornitina), enquanto em *D. nigra*, 7 destes (ácido aspártico, alanina, GABA, tirosina, valina, fenilalanina, isoleucina e leucina) apresentaram alto conteúdo na semente madura.

Este é o primeiro trabalho a mostrar uma associação entre estes compostos durante a germinação e crescimento inicial da plântula nestas espécies. Esta caracterização contribui para a o conhecimento bioquímico da germinação de sementes em espécies arbóreas e pode ser utilizada para programas de conservação de espécies arbóreas ameaçadas de extinção, bem como em abordagens biotecnológicas para melhorar os métodos alternativos de propagação *in vitro*, como embriogênese somática.

Na morfo gênese *in vitro* em *M. brauna*, *D. nigra* e *P. foliolosa* verificou-se a formação de brotos em todos os tratamentos testados em meio MS, quando se utilizou os três tipos de explantes nodais (apical, cotiledonar e intermediário) excisados da plântula com 30 dias de cultivo *in vitro*. Em geral para as três espécies contidas neste estudo, o explante segmento nodal cotiledonar apresentou respostas morfogênicas satisfatórias para a regeneração de brotos.

Entretanto, os explantes oriundos de segmentos de hipocótilo, epicótilo e folíolos testados em *M. brauna* e *D. nigra* não apresentaram capacidade morfogênica para formação de brotos em todos os tratamentos utilizados, não ocorrendo a indução e desenvolvimento de brotações *in vitro*.

A adição de BAP e ANA ao meio de cultura MS proporcionou um aumento do número de brotos formados nos diferentes explantes em *M. brauna*, *D. nigra* e *P. foliolosa*. Para *M. brauna* as concentrações 5 e 10 μM de BAP isoladas, indicam serem tratamentos que promoveram uma melhor capacidade morfogênica em relação a todas as variáveis e em todos os explantes testados na etapa de multiplicação *in vitro*. Para *D. nigra* os resultados obtidos com 5 μM de BAP isoladamente sugere ser este o melhor tratamento para promover uma resposta morfogênica que atende todas as variáveis testadas em todos os explantes oriundos de segmentos nodais utilizados na etapa de multiplicação *in vitro*. Para *P. foliolosa* os tratamentos com ausência (controle) e presença das concentrações de ANA isoladas atendem as variáveis avaliadas quando utilizado explante oriundos de

segmentos nodais apicais, enquanto para o cotiledonar a resposta morfogenética foi satisfatória no tratamento contendo ANA (2,5 μM) associada a BAP (20 μM). Estes resultados são inéditos para estas espécies e mostram que a resposta morfogenética para indução de brotação é dependente da espécie, tipo de explante e regulador de crescimento adicionado ao meio de cultura.

Para a espécie *D. nigra* observou-se enraizamento na fase de multiplicação nos tratamentos com ausência de reguladores (controle) e na presença de ANA (2 μM) utilizando os explantes oriundos de segmentos nodais cotiledonares. Esse resultado indica a facilidade em dar seguimento as etapas futuras de estudos com enraizamento das brotações e aclimatização das mudas nesta espécie, possivelmente, sem a necessidade de uso de auxina. Ademais, a aclimatização de mudas em *M. brauna* e *P. foliolosa* mostra que a micropropagação destas é uma alternativa viável para a produção mudas, que possam ser utilizadas em programas de conservação destas espécies ameaçadas de extinção.

Estes resultados são inéditos para estas espécies e importantes para aumentar o conhecimento relacionado com a germinação de espécies arbóreas nativas, assim como, para possibilitar formas alternativas de propagação destas espécies, via micropropagação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed MR, Anis M (2014b). In vitro regeneration and the antioxidant enzymatic system on acclimatization of micropropagated *Vitex trifolia* L. *Agroforest System*, 88:437–447.
- Ahmed R, Anis M (2014a). Rapid in vitro propagation system through shoot tip cultures of *Vitex trifolia* L. - an important multipurpose plant of the Pacific traditional Medicine. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20:385–392.
- Akdemir H, Süzerer V, Onay A, Tilkat E, Ersali Y, Çiftçi YO (2014). Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 117: 65-76.
- Allen E, Moing A, Ebbels TM, Maucourt M, Tomos AD, Rolin D, Hooks MA (2010). Correlation Network Analysis reveals a sequential reorganization of metabolic and transcriptional states during germination and gene-metabolite relationships in developing seedlings of *Arabidopsis*. *Bmc Systems Biology*, 4:62.
- Alves CSC, Xavier A, Otoni WC. (2004). Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: pp. 421-430.
- Andrade MW, Luz JMQ, Lacerda AS, Melo PRA (2000). Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All). *Ciência Agrotecnica*, 1:174-80.
- Aragão VPM, Navarro BV, Passamani LZ, Macedo AF, Floh EIS, Silveira V, Santa-Catarina C (2015). Free amino acids, polyamines, soluble sugars and proteins during seed germination and early seedling growth of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), an endangered hardwood species from the Atlantic Forest in Brazil. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27:157–169.
- Arellano EF, Pinto JEP (1993). Propagação in vitro de *Kielmeyera coriacea*. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenacético na multiplicação de brotos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 28:25-31.
- Arunyanart S, Chaitrayagun M (2005). Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). *Scientia Horticulturae*, 105:411-420.
- Assis KC, Pereira FD, Cabral JSR, Silva FG, Silva JW, Santos SC (2012). In vitro cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. *Acta Scientiarum*, 34:77-83.

- Astarita LV, Floh EIS, Handro W (2003a). Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 47:53-59.
- Astarita LV, Floh EIS, Handro W (2003c) Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidase associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). *Plant Growth Regulation*, 39:113–118.
- Astarita LV, Handro W, Floh EIS (2003b). Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Brazilian Journal of Botany*, 26:163-168.
- Attree SM, Fowke LC (1993). Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35:1-35.
- Balbuena TS, Silveira V, Junqueira M, Dias LLC, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh EIS (2009). Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *Journal of Proteomics*, 72:337-352.
- Barendse GW, Peeters TJM (1995). Multiple hormonal control in plants. *Acta Botanica*, 44:3–17.
- Baskaran P, Jayabalan N (2009). An improved protocol for adventitious shoot regeneration and plant formation in *Psoralea corylifolia* L. *Scientia Horticulturae*, 123: 283-286.
- Baud S, Boutin JP, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40:151-160.
- Bewley JD (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9:1055-1066.
- Bewley JD, Black M (1994). *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum Publishing, 445p.
- Bewley JD, Bradford K, Hilhorst H, Nonogaki H (2012). *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd Edition, Springer New York - New York.
- Borges EEL, Perez SCJGA, Borges RCG, Rezende ST, Garcia SR (2002). Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (Tamboril da Mata). *Revista Árvore*, 26:603-613.
- Borges EEL, Rezende ST, Borges RCG, Perez SCJGA. (2005). Caracterização de Alfagalactosidase e sua relação com a germinação das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpinoideae). *Revista Árvore*, 29: 525-533.

- Borisjuk L, Rolletschek H, Radchuk R, Weschke W, Wobus U, Weber H (2004). Seed development and differentiation: A role for metabolic regulation. *Plant Biology*, 6:375-386.
- Borisjuk L, Rolletschek H, Wobus U, Weber H (2003). Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *Journal of Experimental Botany*, 54:503-512.
- Borisjuk L, Walenta S, Weber H, Mueller-Klieser W, Wobus U (1998). High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. *Plant Journal*, 15:583-591.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140:103–125.
- Bove J, Jullien M, Grappin P (2001). Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology*, 3: reviews1002.1001 - reviews1002.1005.
- Brasil. (2000). Ministério da Agricultura. *Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos*. Brasília, 322p.
- Buckeridge MS, Aidar MPM, Santos HP, Tiné MAS (2004). *Acúmulo de Reservas*. In: Ferreira AG, Borghetti F. (Eds). *Germinação: do básico ao aplicado*. *Artmed*, 324 p.
- Câmara IG (2003). *Brief history of conservation in the Atlantic Forest*. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (Eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, Washington, D.C. pp. 31-42.
- Cangahuala-Inocente GC, Silveira V, Caprestano CA, Ducroquet JPHJ, Floh EIS, Guerra MP (2009). Dynamics of biochemical and morphophysiological changes. *Plant Growth Regulation*, 59:103-115.
- Carvalho NM, Nakagawa J (2000). *Sementes: ciências, tecnologia e produção*, Jaboticabal: Funep.
- Carvalho PER (2005). Ipê-felpudo: taxonomia e nomenclatura. *Revista Embrapa*, p. 1-9.
- Cary A, Uttamchandani SJ, Smets R, Van Onckelen HA, Howell SH (2001). *Arabidopsis* mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signal. *Planta*, 213:700-707.
- Catusse J, Strub JM, Job C, Van Dorsselaer A, Job D (2008). Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:10262-10267.

- Cerdas LV, Dufour M, Villalobos V (1998). *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). *Revista Biologia Tropical*, 46:225-228.
- Cerdas LV, Guzmán LA (2004). Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). *In vitro* organogenesis of *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). *Revista Biologia Tropical*, 52: 41-46.
- Chen Y, Cao F-L, Li S-X, Dao D-W, Xu C-P (2010). Establishment of highly efficient regeneration system with different explants of *Sapium sebiserum in vitro*. *Acta Botanica*, 30: 2542-2549.
- Christianson ML, Warnick DA (1988). Organogenesis *in vitro* as a developmental process. *HortScience*, 23:515-519.
- CID, L PB (2010). Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília, DF: *Embrapa Informação Tecnológica*, 303 p.
- 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.
- Corredoira E, Vieitez MA, Ballester A (2002). Somatic embryogenesis in Elm. *Annals of Botany*, 89:637-644.
- Corte VB, Borges EEL, Pontes CA, Leite ITde A, Ventrella MC, Mathias AA (2006). Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Revista Árvore*, 30:941-949.
- Coruzzi G, Last R (2000). Aminoacids. In Biochemistry and molecular biology of plants. (Eds: Buchanan B.B, Gruissem W, Jones RL), *American Society of Plant Physiologists*, p. 358-410.
- Costa GM, Nepomuceno CF, Santana JRF (2010). Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. *Ciência Rural*, 40:1090-1096.
- Curti AR (2011). Contribuições para a micropropagação de *Peltophorum dubium* (Spengel) Taubert. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 96p.
- Dantas BF, Soares FSJ, Lúcio AA, Aragão CA (2008). Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* engl.). *Revista Brasileira de Sementes*, 30:214-219.

- De Bondt A, Eggermont K, Penninckx I (1996). *Agrobacterium* – mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 15:549-554.
- Dean WA. (2002) Ferro e Fogo: A História e a Devastação da Mata Atlântica Brasileira. São Paulo, *Cia das Letras*, 484p.
- Devi PS, Satyanarayana B, Arundhati A, Rao TR (2014). Plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Sterculia urens* Roxb., an endangered gum-yielding tree. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 17(1):21-25.
- Dias LLC, Balbuena TS, Silveira V, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh EIS (2010). Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22:23-33.
- Dias LLC, Santa-Catarina C, Silveira V, Pieruzzi FP, Floh EIS (2009). Polyamines, amino acids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. *Seed Science and Technology*, 37:42-51.
- Durzan DJ, Chalupa V (1976) Growth and metabolism of cells and tissues of jack pine (*Pinus banksiana*). 4. Changes in amino acids in callus and in seedlings of similar genetic origin. – *Canadian Journal of Botany*, 54:468-482.
- Embrapa Florestas (2003). Comunicado Técnico 106. Rêgo GM, Possamai E. Jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* Vellozo) leguminosae-papilionoidae: produção de mudas. *Colombo: Embrapa Florestas*, 3 p.
- Erig AC, Rossi Ade, Fortes GRdeL (2002). 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*Rubus idaeus* l.), cv. Tupy. *Ciência Rural*, 32: 765-770.
- Eveland AL, Jackson DP (2012). Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 63:3367-3377.
- Ezura H, Nukui N, Yuhashi KI, Minamisawa K (2000). *In vitro* plant regeneration in *Macroptilium atropurpureum*, a legume with a broad symbiotic range for nodulation. *Plant Science*, 159:21–27.
- Fait A, Angelovici R, Less H, Ohad I, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR, Galili G (2006). *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*, 142:839-854.
- Fehér A, Pasternak TA, Dudits D (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74:201-228.
- Ferreira AG, Borghetti F (2004). *Germinação: do básico ao aplicado*. *Artmed*, 323p.

- Ferreira DF (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6):1039-1042.
- Fundação SOS Mata Atlântica (2010). *Relatório de Atividades 2009*. Disponível em: [http://www.sosma.org.br/link/relatorio SOSMA-2009-final.pdf](http://www.sosma.org.br/link/relatorio%20SOSMA-2009-final.pdf). Acesso em: 22 de abril de 2010.
- Galili G, Avin-Wittenberg T, Angelovici R, Fernie AR (2014). The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D (2002). Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth. *Physiologia Plantarum*, 116:238-247.
- George EF, Hall MA, De Klerk G-J 2008. Plant Propagation by Tissue Culture: the Background. V. 1. *Springer: Netherlands*. pp. 502.
- Gibson SI (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8:93-102.
- Golle DP, Reiniger LRS, Curti AR, León EAB. (2012). Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* Dc.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. *Ciência Florestal*, 22:207-214.
- Gomes GAC, Paiva R, Herrera RC, Paiva PDO (2010). Micropropagação De *Maclura tinctoria* L.: uma espécie lenhosa em extinção. *Revista Árvore*, 34:25-30.
- González-Rodríguez JÁ, Ramírez-Garduza F, Robert ML, O'Connor-Sánchez A, Peña-Ramírez YJ (2010). Adventitious shoot induction from adult tissues of the tropical timber tree yellow Ipé primavera (*Tabebuia donnell-smithii* rose [bignoniaceae]). *In vitro Cellular e Developmental Biology - Plant*, 46:411–421.
- Grattapaglia D, Machado MA (1998). Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JÁ (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, v. 1. p. 183-260.
- Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB (1999). Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JÁ (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CBAB, v.2. p.537-548.
- Gupta AK, Harish MK, Rai M K, Phulwaria M, Agarwal T, Shekhawat NS (2014). *In vitro* propagation, encapsulation, and genetic fidelity analysis of *Terminalia arjuna*: a cardioprotective medicinal tree. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 1-14.
- Gutiérrez IEM, Nepomuceno CF, Ledo CAS, Santana JRF (2011). Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. *Ciência Rural*, 41:260-265.

- Hartmann HT, Kofranek AM, Rubatzky VE, Flocker WJ (1988). Plant Science: growth, development and utilization of cultivated plants. 2.ed. New Jersey: Regents/Prentice Hall, 674p.
- Havelange A, Lejeune P, Bernier G, KaurSawhney R, Galston AW (1996). Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum*, 96:59-65.
- Hills MJ (2004). Control of storage-product synthesis in seeds. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:302-308.
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitinik J (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Science*, 6:431-438.
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJJ (2008). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179:33-54.
- Hu MY, Shi ZG, Zhang ZB, Zhang YJ, Li H (2012). Effects of exogenous glucose on seed germination and antioxidant capacity in wheat seedlings under salt stress. *Plant Growth Regulation*, 68:177-188.
- IBAMA (2012). http://www.arvoresbrasil.com.br/?pg=arvore_ameacadas.
- Ipekci Z, Gozukirmizi N (2005). Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79:341-345.
- IUCN (2010). The IUCN red list of threatened species, version 2010.4
- IUCN. (2015). The IUCN red list of threatened species: International Union for Conservation of Nature (IUCN).
- Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (1995a.) Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: *Kluwer Academic Publishers*, v. 2, 532 p.
- Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (1995b). Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: *Kluwer Academic Publishers*, v. 3, 392 p.
- Jain SM, Ishii K (1998). Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In: Recent advances in biotechnology for conservation and management. (Eds: Mantell SH, Bruns S, Tragardh C, Viana AM). *International Foundation for Science*, p. 214-231.
- Jardim LS, Sampaio PTB, Costa SdeS, Gonçalves C de QB, Brandão HLM (2010). Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), *Acta Amazônica* 40(2): 275 – 280.
- Johri MM, Mitra D (2001). Action of plant hormones. *Current Science*, 80:199 – 205.

- Joosen RVL, Arends D, Li Y, Willems LAJ, Keurentjes JJB, Ligterink W, Jansen RC, Hilhorst HWM (2013). Identifying genotype-by-environment interactions in the metabolism of germinating Arabidopsis seeds using generalized genetical genomics. *Plant Physiology*, 162:553-566.
- Junior PCPF, Scherwinski-Pereira J E (2012). Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith). *Ciência Florestal*, 22:1-9.
- Kamada H, Harada H (1984). Changes in endogenous amino-acid compositions during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. *Plant and Cell Physiology*, 25:27-38.
- Kandler O, Hopf H (1980). Metabolism and function of oligosaccharides. In: Biochemistry of plants. Carbohydrates. *Academic Press*, v.15, p.117-131.
- Kerbauy GB (2004). Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452p.
- Kielse P, Franco ETH, Paranhos JT, Lima II APS (2008). Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. *Ciência Rural*, 39:1098-1104.
- Koch K (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:235-246.
- Kuznetsov VV, Shevyakova NI (2006). Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 5:583-604.
- Lacerda DR, Lemos JP, Acedo MDP, Lovato MB (2002). Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymentia foliolosa* and *P. reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution*, 235:67-77.
- Lam HM, Coschigano K, Schultz C, Melooliveira R, Tjaden G, Oliveira I, Ngai N, Hsieh MH, Coruzzi G (1995). Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino-acid biosynthesis. *Plant Cell*, 7:887-898.
- Lea PJ (1993). Nitrogen metabolism. In: Lea PJ, Leegood R C (Eds). Plant biochemistry and molecular biology. Wiley & Sons, New York, pp 155–180
- Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, Shewry R, Halford NG (2007). Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150:1-26.
- Lewis GP, Schrire B, Mackinder B, Lock M (2005). Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew. 577p.
- Lewis GP, Warwick MC (2003). Revision of *Plathymentia* (Leguminosae-Mimosoideae). *Endinburgh Journal of Botany*, 60:111-119.
- Lima AR, Capobianco JPR (1997). *Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação*. Documentos do ISA - Instituto Sócio-Ambiental, 4:5-7.

- Lima H.C., Queiroz LP, Morim MP, Souza VC, Dutra VF, Bortoluzzi RLC, Iganci JRV Fortunato RH, Vaz AMSF, Souza ER, Filardi FLR, Valls JFM., Garcia FCP, Fernandes JM, Martins-da-Silva RCV, Perez APF, Mansano VF, Miotto STS, Tozzi AMGA, Meireles JE Lima LCP, Oliveira MLLA, Flores AS, Torke BM, Pinto RB, Lewis GP, Barros M.J.F., Schütz R, Pennington T, Klitgaard BB, Rando JG, Scalón VR, Cardoso DBOS, Costa LC, Silva M.J, Moura, TM, Barros LAV, Silva MCR, Queiroz RT, Sartori ALB, Camargo R (2012). Fabaceae In: Forzza RC et al. (Eds) Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000115>>. Acesso em 6 Jul 2012.
- Lima HC (2000). Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica. Tese de Doutorado. Universidade Federal do *Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro. 157p.
- Lima HC, Fortuna-Perez AP, Tozzi AMGA, Flores AS, Vaz AMSF, Klitgaard B, Cardoso DBOS, Filardi FL, Garcia FCP, Lewis GP, Iganci JRV, Meireles JE, Valls JFM, Lima LCP, Queiroz LP, Silva MJ, Morim MP, Barros MJF, Queiroz RT, Fortunato RH, Pennington RT, Miotto STS, Moura TN, Dutra VF, Mansano, V, Souza VC, Scalón VC (2009). Fabaceae (Leguminosae). In: Stehmann J R, Forzza R.C, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LHY (Orgs). Plantas da Floresta Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro - RJ. p. 259-283.
- Lorenzi H (1992). Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. *Plantarum*, v.1, 352p.
- Lorenzi H (2002). Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. *Plantarum*, v.1, 368p.
- Machado W, Carneiro AA, Coelho FT da CP (2010). Influência de BAP e ANA na formação de calos de *Jatropha curcas* L. In: Inclusão Social e Energia. Campina Grande. Anais. Campina Grande, Embrapa Algodão, p. 270-275.
- Macnicol PK (1983). Developmental changes in the free amino acid pool and total protein amino acids of pea cotyledons (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology*, 72:492-497.
- Mantovani NC, Franco ETH (1998). Cultura de tecidos de plantas lenhosas. UFSM, CEPEF, FATEC, pp.123 .
- Mantovani NC Elci TH Vestana S (2001). Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). *Ciência Florestal*, 11: 93-101.
- Marcos Filho J (2005). Fisiologia de sementes de plantas cultivadas, *Fealq*, 495p.
- Martinotto C (2004). *Cultivo in vitro e aspectos morfofisiológicos de cagaiteira*. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- Matilla AJ (1996) Polyamines and seed germination. *Seed Science Research*, 6:81–93
- Matos DMS, Bovi MLA (2002). Understanding the threats to biological diversity in southeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 11:1747-1758.
- Matos DMS, Bovi MLA (2002). Understanding the threats to biological diversity in southeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 11:1747-1758.
- Minocha R, Smith DR, Reeves C, Steele KD, Minocha SC (1999). Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 105:155-164.
- Mittermeier RA, Gil PR, Hoffmann M, Pilgrim J, Brooks J, Mittermeier CG, Lamourux J, Fonseca GAB (2004). Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. *Cemex*, Washington, DC.
- Moschou PN, Wu J, Cona A, Tavladoraki P, Angelini R, Roubelakis-Angelakis KA (2012). The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63:5003-5015.
- Muñoz-Concha D, Davey MR (2011). Micropropagation of the endangered Chilean tree, *Gomortega keule*. *In vitro Cellular e Developmental Biology - Plant*, 47:170–175.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403:853-858.
- Newman PO, Krishnaraj S, Saxena PK (1996). Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*), somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl segments induced with Benzylaminopurine. *International Journal Plant Science*, 157:554-560.
- Nicoli PM, Paiva R, Nogueira RC, Santana JRF, Silva LC, Silva DPC, Porto JMP (2008). Ajuste no processo de micropropagação de barbatimão. *Ciência Rural*, 3:685-689.
- Noletto LG, Silveira CE dos S (2004). Micropropagação de Copaíba. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 33:109-120.
- Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD (2010). Germination-Still a mystery. *Plant Science*, 179:574-581.
- Nunes EC (2000). Sistemas de cultura e conservação *in vitro* para *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.
- Obendorf RL, Gorecki RJ (2012). Soluble carbohydrates in legume seeds. *Seed Science Research*, 22:219-242.

- Oliveira L da S (2010). Enxertia, microenxertia e descrição do tropismo em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.
- Oliveira LM de (2006). Citocininas nos processos anatômicos, citológicos e fisiológicos durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de *Annona glabra* L. 104 p. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de Concentração em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras -MG.
- Ortiz-Lopez A, Chang H-C, Bush DR (2000). Amino acid transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465: 275-280.
- Park YS, Barret DJ, Bonga JM (1998). Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In vitro Cellular e Developmental Biology - Plant*, 34:231-239.
- Paulilo MTS, Felipe GM. (1994). Contribuição dos cotilédones e participação de matéria durante o crescimento inicial de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 17: 87-91.
- Peña-Ramírez YJ, Juárez-Gómez J, Gómez-López L, Jerónimo-Pérez JL, García-Sheseña I, González-Rodríguez JA, Robert ML (2010). Multiple adventitious shoot formation in spanish red cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly-valuable tropical tree species. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 46:149–160.
- Penfield S, Rylott EL, Gilday AD, Graham S, Larson TR, Graham IA (2004). Reserve mobilization in the Arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires phosphoenolpyruvate carboxykinase1. *Plant Cell*, 16:2705-2718.
- Peres CA, Baider C, Zuidema PA, Wadt LHO, Kainer KA, Gomes-Silva DAP, Salomão RP, Simões LL, Franciosi ERN, Valverde FC, Gribel R, Shepard Jr GH, Kanashiro K, Coventry P, Yu DW, Watkinson AR, Freckleton RP (2003). Demographic threats to the sustainability of Brazil nut exploitation. *Science*, 302:2112-2114.
- Peres LEP (2002). Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, 25: 44-48.
- Pérez JL, García-Sheseña I, González-Rodríguez JÁ, Robert ML (2010). Multiple adventitious shoot formation in spanish red cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly-

- valuable tropical tree species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 46:149–160.
- Pescador R, Kerbauy GB, Kraus JE, Ferreira WM, Guerra MP, Figueiredo-Ribeiro RCL (2008). Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 44:289-299.
- Pieruzzi FP, Dias LLC, Balbuena TS, Santa-Catarina C, dos Santos ALW, Floh EIS (2011). Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Annals of Botany*, 108:337-345.
- Pijut PM, Beasley RR, Lawson SS, Palla KJ, Stevens ME, Wang Y (2012) In vitro propagation of tropical hardwood tree species—a review (2001–2011). *Propagation Ornamental Plants*, 12:25–51
- Pontes AC, Borges EdeL, Borges Rde CG, Soares CPB (2002). Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. (Garpa) durante a embebição. *Revista Árvore*, 5:593-601.
- Price J, Li TC, Kang SG, Na JK, Jang JC (2003). Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132:1424-1438.
- Radwanski ER, Last RL (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism - biochemical and molecular-genetics. *Plant Cell*, 7:921-934.
- Rahman MM, Amin MN, Rahman MB, Sultana RS (2010). *In vitro* adventitious shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf-derived callus of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *Propagation of Ornamental Plants*, 10:149-155.
- Rizzini CT (1978). Árvores e Madeiras Úteis do Brasil Manual de Dendrologia Brasileira. *Plantas do Brasil*. Editora Edgard Blucher.
- Rocha SCda, Quorim M, Ribas LLF, Joehler HS (2007). Micropropagação de *Cabraela canjerana*. *Revista Árvore*, 31:43-50.
- Rock CD, Quatrano RS (1995). The role of hormones during seed development. In: *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology* (Eds: Davies PJ) *Kluwer Academic Publishers*, p. 671–697.
- Rodrigues M, Paiva R, Nogueira RC, Martinotto CE, Júnior JMS (2009). Morfogênese *in vitro* de nim a partir de explantes cotiledonares. *Revista Árvore*, 33:21-26.
- Rolston MP (1978). Water impermeable seed dormancy. *Botanical Review*, 44:365-396.
- Rosental L, Nonogaki H, Fait A (2014). Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*, 24:1-15.

- Roy J, Banerjee N (2003). Induction of callus and plant regeneration from shoot-tips explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. *Scientia Horticulturae*, 97: 333 – 340.
- Sahni R, Gupta SC (2002). *In vitro* plantlet regeneration from seedling nodal explants of *Acacia catechu*. *Indian Journal Experimental Biology*, 40(9):1050-5.
- Santa-Catarina C, Maciel SdaC, Pedrotti EL (2001). Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). *Revista Brasileira de Botânica*, 4:501-510.
- Santa-Catarina C, Silveira V, Balbuena TS, Viana AM, Maranhão MEE, Handro W, Floh EIS (2006). IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regulation*, 49:237-247.
- Santos BR, Paiva R, Nogueira RC, Oliveira LM, Silva DPC, Martinotto C, Soares FP, Paiva PDO (2006). Micropropagação de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28:293-296.
- Sartor FR, Zanotti RF, Pôssa K F, Pilon AM, Fukushima CH (2013). Diferentes meios de cultura e antioxidantes no Estabelecimento *in vitro* do jacarandá da bahia. *Biosciência Journal*, 29:408-411.
- Scalon SPQ, Mussury RM, Rigoni MR, Scalon-Filho H (2003). Crescimento inicial de mudas de *Bomeacopsis glabra* (Pasq.) A. Robins sob condição de sombreamento. *Revista Árvore*, 27:553-558.
- Segura J (1993). Morfogênese *in vitro*. In: Bieto JA, Talon M (Eds.). Fisiologia y bioquímica vegetal. *Madrid*: Ed. Interamericana. 625p.
- Shamsudeen-Varisai M, Jawahar M, Thiruvengadam M, Jeyakumar M, Jayabalan N (1999). Effect of cytokinins on the proliferation of multiple shoots in horse gram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) verdc.). *Journal of Plant Biotechnology*, 1: 79-83.
- Shewry PR, Napier JA, Tatham AS (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell and Tissue Culture*, 7:945–956.
- Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV (2001). Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Science*, 160:1229-1235.
- Shukla S, Shukla SK, Mishra SK (2012). *In vitro* regeneration of multipurpose medicinal tree *Stereospermum suaveolens*—factors controlling the *in vitro* regeneration. *Journal Biotechnol Biomaterial*, S13:001.

- Silva ED, Tozzi AMGA (2013). Leguminosae na Floresta Ombrófila Densa do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, Brasil. *Rodriguésia*, 64:285-309.
- Silva JMC, Casteleti CHM (2003). Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. pp. 43-59. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (Eds.). The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, Washington, D.C.
- Silva PP, Contim LAS, Freitas DV, Aride PHR, Santos ALW (2010). *In vitro* establishment of kapok tree (*Ceiba pentandra* L. Gaertn) apical shoots. *Scientia Agraria*, 11:437-443.
- Silveira AP, Araújo EL, Araújo FS, Willadino LG (2005). Predação de frutos e germinação de sementes em *Auxemma oncocalyx* (Allemão) Baill. E *Auxemma glazioviana* Taub. In: Nogueira RMC, Araújo EL, Willadino LG, Cavalcante UMT (Eds.). Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas, *M x M*, v. 1, p.416-432.
- Silveira V, Balbuena TS, Santa-Catarina C, Floh EIS, Guerra MP, Handro W (2004b). Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regulation*, 44:147-156.
- Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP (2004a). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76:53-60.
- Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Guerra MP, Floh EIS (2006). Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, *Plant Science and Biotechnology*, 171:91-98.
- Skoog F, Miller CO (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia Society for Experimental Biology*, 11:118-231.
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Opinion in Plant Biology*, 13:274-279.
- Smykal P, Vernoud V, Blair MW, Soukup A, Thompson RD (2014). The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science*, 5:351.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995). Biometry: the principles and practices of statistics in biological research, New York: W. H. Freeman and Co, 3. ed, 957 p.

- Sreenivasulu N, Usadel B, Winter A, Radchuk V, Scholz U, Stein N, Weschke W, Strickert M, Close TJ, Stitt M, Graner A, Wobus U (2008). Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiology*, 146:1738-1758.
- Steiner N, Santa-Catarina C, Andrade J BDaR, Balbuena TS, Guerra MP, Handro W, Floh EIS, Silveira V (2008). *Araucaria angustifolia* Biotechnology - Review. *Func. Plant Science e Biotechnology*, 2:20-28.
- Suda NKC, Giorgini JF (2000). Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12:226-245.
- Taiz L, Zeiger (2009). E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 819p.
- Tegeder M (2012). Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:315-321.
- Teixeira JB, Cruz ARR, Ferreira FR, Cabral JRS (2001). Biotecnologia aplicada à produção de mudas. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, 19:42-47.
- Thorpe TA (1994). Morphogenesis and regeneration. In: Vasil IK, Thorpe TA (Eds.) *Plant Cell and Tissue Culture*. p.17-36.
- Tiburcio AF, Altabella T, Bitrian M, Alcazar R (2014). The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta*, 240:1-18.
- Tonhasca Jr A (2005). Ecologia e História Natural da Mata Atlântica. Rio de Janeiro, Interciência. 197p.
- Urano K, Hobo T, Shinozaki K (2005). *Arabidopsis* ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *Febs Letters*, 579:1557-1564.
- Viana AM, Mazza MC, Mantell SH (1999). Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian Rain Forest. In: *Plant conservation biotechnology*, University of Abertay, Dundee, p.277-299.
- Villalobos AVM, Thorpe TA (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: Roca WM, Mroginski LA (Eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), pp.127-141.
- Von Wettstein D, Gough S, Kannangara CG (1995). Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell*, 7:1039-1057.

- Wattanakulpakin P, Photchanachai S, Miyagawa S, Ratanakhanokchai K (2012). Loss of maize seed vigor as affected by biochemical changes during hydropriming. *Crop Science*, 52:2783-2793.
- Weitbrecht K, Muller K, Leubner-Metzger G (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62:3289-3309.
- Xavier A, Otoni WC (2009). Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. *Agronomia Costarricense*, 33:303-307.
- Yang RQ, Chen H, Gu ZX (2011). Factors influencing diamine oxidase activity and gamma-aminobutyric acid content of fava bean (*Vicia faba* L.) during germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:11616-11620.
- Yang RQ, Guo QH, Gu ZX (2013). GABA shunt and polyamine degradation pathway on gamma-aminobutyric acid accumulation in germinating fava bean (*Vicia faba* L.) under hypoxia. *Food Chemistry*, 136:152-159.
- Yaya ML, Rodríguez OL, Usaquén W, Chapparro A (2005). Inducción de organogénesis indirecta em Abarco (*Cariniana pyriformis* Miers.). *Agronomia Colombiana*, 23:50-54.