

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

YREXAM RODRIGUES DE SOUZA RIBEIRO

**ENVOLVIMENTO DA AUXINA E POLIAMINAS NO ENRAIZAMENTO
EX VITRO DE BROTAÇÕES MICROPROPAGADAS DE *Cedrela
fissilis* Vell. (MELIACEAE)**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES- RJ
-FEVEREIRO/2018-**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA**

YREXAM RODRIGUES DE SOUZA RIBEIRO

ORIENTADORA: PROFa. DRa. CLAUDETE SANTA-CATARINA

CAMPOS DOS GOYTACAZES- RJ

**ENVOLVIMENTO DA AUXINA E POLIAMINAS NO ENRAIZAMENTO
EX VITRO DE BROTAÇÕES MICROPROPAGADAS DE *Cedrela
fissilis* Vell. (MELIACEAE)**

YREXAM RODRIGUES DE SOUZA RIBEIRO

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudete Santa-Catarina

**CAMPOS DOS GOYTACAZES- RJ
-FEVEREIRO/2018-**

**ENVOLVIMENTO DA AUXINA E POLIAMINAS DURANTE O
ENRAIZAMENTO *EX VITRO* DE BROTAÇÕES MICROPROPAGADAS
DE *Cedrela fissilis***

YREXAM RODRIGUES DE SOUZA RIBEIRO

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

Aprovada em 26 de fevereiro de 2018.

Comissão Examinadora:

Dra. Tatiana Santos Barroso (D.Sc. Biociências e Biotecnologia)- SEEDUC

Profa. Dra. Virgínia Silva Carvalho (D.Sc. Fitotecnia)- UENF

Profa. Dra. Deborah Guerra Barroso (D.Sc. Produção Vegetal)- UENF

Profa. Dra. Maura da Cunha (D.Sc. Ciências Biológicas)- UENF

Profa. Dra. Claudete Santa-Catarina (D.Sc. Biotecnologia)- UENF
(Orientadora)

Dedico este trabalho a minha
querida mãe pelo apoio e incentivo
em todos os momentos e a
orientadora Claudete pela
confiança, paciência e
ensinamentos.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridade, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridade e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir! Não tenhas medo dos tropeços da jornada. Não podemos esquecer que nós, ainda que incompleto, fomos o maior aventureiro da história.”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças em todos os momentos e por ter me sustentado ao longo de toda a jornada.

À minha orientadora profa. Dra. Claudete Santa-Catarina, pela oportunidade de trabalho, pelos ensinamentos, paciência e confiança, ingredientes que enriqueceram minha vida profissional.

À minha mãe Ilzenir, pelo seu amor incondicional, pela sua ajuda e apoio em todos os momentos.

À equipe do grupo de pesquisa em Biotecnologia Vegetal, em especial aos meus colegas Victor Aragão, Ricardo Reis, Poliana Rangel, Joviana Lerin, Tadeu Oliveira e Kariane Sousa, que me ajudaram na execução de algumas práticas laboratoriais.

À minha amiga Poliana Rangel, que além de colega de trabalho, participou e compartilhou muitos momentos bons e ruins da minha vida pessoal.

Aos colegas da pós-graduação da universidade pela troca de experiências e momentos de descontração.

À UENF pela formação, ao CNPq, FAPERJ pelo apoio financeiro e a Capes pela concessão de bolsa.

Sumário

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1- INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1- Micropropagação de espécies arbóreas nativas e espécie de estudo	3
2.2. Enraizamento <i>ex vitro</i>	4
2.3- Auxina e os inibidores de auxina no enraizamento <i>ex vitro</i>	6
2.4- Análises histológicas	8
2.5 – PAs no enraizamento <i>ex vitro</i>	9
3- OBJETIVOS	10
3.1- Objetivo geral	10
3.2- Objetivos específicos.....	11
4- MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1- Material Vegetal.....	11
4.2- Germinação das sementes e indução das brotações <i>in vitro</i>	11
4.3- Efeito do AIB no enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações micropropagadas	12
4.4- Efeito dos inibidores TIBA e PCIB no enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações micropropagadas.....	13
4.5- Coleta de amostras de brotações durante o enraizamento <i>ex vitro</i> para análise histológicas e de PAs	14
4.6- Determinação das fases do desenvolvimento da raiz verificadas a partir de análises histológicas	14
4.7- Determinação do conteúdo endógena de PAs	15
4.8- Análises estatísticas	16
5- RESULTADOS	16
5.1- Efeito do AIB no enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações micropropagadas	16
5.2- Efeito dos inibidores TIBA e PCIB no enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações micropropagadas.....	18
5.3- Determinação das fases do desenvolvimento raiz verificadas a partir de análises histológicas	23
5.4- Determinação do conteúdo endógeno de PAs	25
6- DISCUSSÃO	30
7- CONCLUSÕES	37
8-REFERÊNCIAS	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Percentagem de indução (A e B), número (C e D) e comprimento (E) de raízes em brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares após 30 dias de enraizamento *ex vitro*. Médias de brotações oriundas de segmentos nodais (A e C) e das concentrações de AIB independente do tipo de segmentos nodais (B e D) foram apresentadas separadamente por não terem interação entre si. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Médias de comprimento (E) apresentaram interação entre as brotações oriundas de segmentos nodais e as concentrações de AIB. Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dois tipos de brotações (oriundas de segmentos nodal apical e cotiledonar) em cada concentração de AIB. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se as diferentes concentrações de AIB em cada tipo de brotação. AIB = ácido indol butírico; CV = coeficiente de variação ($n = 8$; CV A e B = 17,5 %, CV C e D = 31,8 %, CV E = 33,5 %). **17**

Figura 1: Aspectos morfológicos de mudas micropropagadas de *C. fissilis* após 4 meses em casa de vegetação, prontas para o plantio no campo (A) e detalhe da muda (B)..... **18**

Figura 3: Percentagem de indução (A e B), número (C e D) e comprimento (E) de raízes em brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares após 13 dias de enraizamento *ex vitro*. Médias de brotações oriundas de segmentos nodais (A e C) e das concentrações de PCIB independente do tipo de segmentos nodais (B e D) foram apresentadas separadamente por não terem interação entre si. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Médias de comprimento (E) apresentaram interação entre as brotações oriundas de segmentos nodais e as concentrações de PCIB. Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dois tipos de brotações (oriundas de segmentos nodal apical e cotiledonar) em cada concentração de PCIB. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se as diferentes concentrações de PCIB em cada tipo de brotação. PCIB = ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico; CV = coeficiente de variação ($n = 6$, CV A e B = 40,16%, CV C e D = 48,99%; CV E = 50,36%). **20**

Figura 4: Percentagem de indução (A e B), número (C) e comprimento (D) de raízes em brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares após 13 dias de enraizamento *ex vitro*. Médias de brotações oriundas de segmentos nodais (A) e das concentrações de TIBA independente do tipo de segmentos nodais (B) foram apresentadas separadamente por não terem interação entre si. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Médias de comprimento (D) apresentaram interação entre as brotações oriundas de segmentos nodais e as concentrações de TIBA. Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dois tipos de brotações (oriundas de segmentos nodal apical e cotiledonar) em cada concentração de TIBA. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se as diferentes concentrações de TIBA em cada tipo de brotação. TIBA = ácido 2,3,5-trioodo benzoico; CV = coeficiente de variação ($n = 6$, CV A e B = 37,12%, CV C = 56,30 %, CV D = 62,54%). **22**

Figura 5: Aspectos morfohistológicos em cortes longitudinais durante o enraizamento *ex vitro* em brotações de *C. fissilis* antes (tempo 0) e após 3, 6 e 10 dias de enraizamento nos tratamentos controle, TIBA (200 µM) e PCIB (800 µM). Seta = indica divisões de células cambiais. pr = primórdio radicular, fv = feixe vascular, ra = raiz adventícia. Barras = 200 µm.....**24**

Figura 6: Conteúdo de PAs livres totais durante o enraizamento *ex vitro* de brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais cotiledonares (A) e apicais (B) mantidas nos tratamentos controle, 200 µM de TIBA e 800 µM de PCIB. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dias de enraizamento em cada tratamento. Letras minúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os diferentes tratamentos em cada dia de enraizamento. TIBA = ácido 2,3,5-trioodo benzoico, PCIB = ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico; CV = coeficiente de variação. (n = 3, CV A = 14,7%, CV B = 11,1%).....**26**

Figura 7: Conteúdo ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF) de putrescina (A e D), espermidina (B e E) e espermina (C e F) em brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais cotiledonares (A, B, C) e apicais (D, E, F) antes (tempo 0) e após 3, 6 e 10 dias de enraizamento nos tratamentos controle, 200 µM de TIBA e 800 µM de PCIB. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dias de enraizamento em cada tratamento. Letras minúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os tratamentos em cada dia de enraizamento. TIBA = ácido 2,3,5-trioodo benzoico, PCIB = ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico; put = putrescina; spd = espermidina; spm = espermina; CV = coeficiente de variação. (n = 3, CV A = 17,5%, CV B = 15,6%, CV C = 16,4%, CV D = 24,0 %, CV E = 13,6 %, CV F = 14,2%).....**28**

Figura 8: Razão de PAs [Put/(Spd+Spm)] durante o enraizamento *ex vitro* em brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais cotiledonares (A) e apicais (B) nos tratamentos controle, 200 µM de TIBA e 800 µM de PCIB. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dias de enraizamento em cada tratamento. Letras minúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os tratamentos em cada dia de enraizamento. TIBA = ácido 2,3,5-trioodo benzoico, PCIB = ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico; CV = coeficiente de variação. (n = 3, CV A = 14,8%, CV B = 23,0%).....**29**

RESUMO

Cedrela fissilis é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica ameaçada de extinção. Técnicas biotecnológicas, como a micropropagação, podem representar uma alternativa para propagação e conservação desta espécie. O enraizamento de brotações micropropagadas é uma etapa crucial no processo de micropropagação, sendo crítico para a produção de mudas, e estudos mostram a importância da auxina e poliaminas (PAs) durante o enraizamento. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o envolvimento de auxina e PAs durante o enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas de *C. fissilis*. Brotações obtidas do cultivo *in vitro* foram submetidas ao enraizamento *ex vitro*, utilizando-se diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB), bem como dos inibidores ácido 2,3,5-trioodo benzoico (TIBA) e o ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico (PCIB). Brotações nos tratamentos controle, PCIB e TIBA antes (tempo 0) e após 3, 6 e 10 dias da indução do enraizamento foram coletadas para análises histológicas e para análise de PAs endógenas. Verificou-se que é possível obter o enraizamento *ex vitro* de *C. fissilis* sem a necessidade do uso de AIB. O inibidor TIBA e PCIB inibiram significativamente o enraizamento, sugerindo que o conteúdo endógeno de auxina é suficiente para promover o enraizamento nesta espécie. Por meio de análises histológicas, verificou-se em brotações no tratamento controle a formação de centros meristemáticos, seguido da formação de primórdios radiculares e emergência da raiz durante o enraizamento. Esses eventos histológicos não foram observados nas brotações tratadas com os inibidores de auxina. O conteúdo de PAs livres totais e putrescina (Put) livre foi menor, enquanto o de espermina (Spm) foi maior, em brotações mantidas no tratamento controle, onde há a promoção do enraizamento. Este estudo forneceu resultados inéditos sobre o metabolismo de PAs durante o enraizamento *ex vitro* em brotações micropropagadas desta espécie arbórea. Futuros estudos analisando o conteúdo de auxinas nestas brotações, assim como perfil de proteínas diferencialmente abundantes permitirão estabelecer novas informações sobre o papel destes compostos com o enraizamento.

Palavras-Chave: ácido indol acético, ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico, ácido 2,3,5-trioodo benzoico, espermina.

ABSTRACT

Cedrela fissilis is an endangered native tree species from Atlantic Forest. Biotechnological tools, such as micropropagation, may represent an alternative for propagation and conservation of the species. The rooting of micropropagated shoots is a crucial step in the micropropagation process, being critical for the production of seedlings, and more studies related to a relief measure and polyamines (PAs) during rooting. Thus, the objective of this work was to study the involvement of auxins and PAs during the *ex vitro* rooting of micropropagated shoots of *C. fissilis*. Shoots obtained from *in vitro* culture were submitted to *ex vitro* rooting using different concentrations of indolebutyric acid (IBA), as well as of 2,3,5-triazole benzoic acid (TIBA) and 2-chlorophenoxy-2-methyl propionic acid (PCIB) inhibitors. Shoots from control, PCIB and TIBA treatments before (time 0) and after 3, 6 and 10 days of root induction were collected for histological and endogenous PAs contents analyzes. The *in vitro* rooting of *C. fissilis* can be obtained without use of IBA. The inhibitor TIBA and PCIB significantly inhibited the rooting, suggesting that the endogenous content of auxin is sufficient to promote rooting in this species. Through histological analysis, the formation of meristematic centers followed by the formation of root primordia and emergence of the root during rooting were observed in shoots from control treatment. These histological events were not observed in shoots treated with the auxin inhibitors. The content of total free PAs and putrescine (Put) was lower, while those of spermine (Spm) was higher in shoots from the control treatment, where there is a promotion of rooting. This study provided new results on the metabolism of PAs during *ex vitro* rooting in micropropagated shoots of this tree species. Future studies analyzing auxin content in these shoots, as well as the profile of differentially abundant proteins, will allow to establish new information on the role of these compounds with rooting.

Keywords: indole acetic acid, 2-chlorophenoxy-2-methyl propionic acid, 2,3,5-triiodo benzoic acid, spermine.

1- INTRODUÇÃO

A intensa degradação da Mata Atlântica tem resultado na redução de seus recursos vegetais, em especial as espécies arbóreas que sofrem principalmente com o contínuo processo de extração madeireira. *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), popularmente conhecida como cedro rosa, vem sendo explorada ao longo de décadas, sendo atualmente descrita como uma espécie ameaçada de extinção na categoria em perigo (IUCN, 2017).

Técnicas alternativas, como a micropropagação, apresentam potencial de aplicação para a propagação dessa espécie, visando futura aplicação em programas de conservação, reflorestamento e recuperação de áreas degradadas, pois possibilita a produção de mudas em escala e independente da época do ano (Giri et al., 2004; Shukla et al., 2009).

A micropropagação possui várias etapas, dentre as quais, o estabelecimento de um protocolo de enraizamento é essencial para a produção de mudas (Kasthuriengan et al., 2013). Em geral, para espécies arbóreas é necessário o uso de regulador de crescimento vegetal, em especial auxinas, como o ácido-indolbutírico (AIB), para promover o enraizamento (De Klerk et al., 1999; Phulwaria et al., 2013). Este enraizamento pode ser promovido *in vitro* com adição de auxinas ao meio de cultura, ou *ex vitro*, com a imersão da base da brotação em AIB, geralmente por um curto período de tempo, a uma solução com alta concentração de auxina (Pop et al., 2011), com posterior transferência para o substrato (De Klerk et al., 1997; Yan et al., 2010), como observado em *Tecomella undulata* (Varshney e Anis, 2012) e *Albizia lebbeck* (Perveen et al., 2013). Entretanto, para algumas espécies arbóreas, como a *Tectonia grandis*, a indução de raízes nas brotações ocorre tanto na presença, como na ausência de AIB (Fermino Júnior et al., 2011).

A produção de auxina ocorre naturalmente nas brotações, e cada espécie possui níveis endógenos diferentes, o que irá influenciar o enraizamento (Da Costa et al., 2013). Havendo conteúdo endógeno de auxina em um nível ótimo requerido na promoção do enraizamento, a aplicação deste regulador é desnecessário, podendo ser inibitório em algumas espécies, como em *Oryza sativa* (Yin et al., 2011). Além disso, mudanças nas concentrações de auxina durante a etapa de enraizamento está

envolvida com a capacidade de promover raízes, em que, altos níveis de auxina são necessários durante a fase de iniciação e inibitórias durante a fase de expressão (Li et al., 2009).

A utilização do inibidor de transporte de auxina, o ácido 2,3,5-triodo benzoico (TIBA) e do inibidor de sinalização de auxina, o ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico (PCIB) pode ser uma importante ferramenta para avaliar o papel do transporte e sinalização de auxina durante o enraizamento. O TIBA é um inibidor do transporte de efluxo de auxina e está envolvido com a inibição do tráfego de auxina na membrana (Kleine-Vehn et al., 2006), além de interferir na organização do citoesqueleto de actina para a endocitose de proteínas (Geldner et al., 2001). O PCIB é um inibidor de auxina que pode regular a estabilidade da proteína auxin/indole acetic acid (Aux/AIA) (Di et al., 2015) e no acúmulo de transcritos de Aux/AIA (Oono et al., 2003).

Em *Eucalyptus grandis* foi mostrado que o uso de inibidores de auxina resultou em mudanças no padrão vascular da raiz, como a perda da organização do córtex, o que reduziu no transporte e a ação da auxina (Nakhooda et al., 2013). Assim, sugere-se que a continuidade do sinal do ácido indol acético (AIA), durante a fase de indução e iniciação, parece ser necessário para a manutenção do padrão vascular e para a formação das raízes nas plantas (Berleth et al., 2000).

Adicionalmente, estudos com poliaminas (PAs) podem contribuir para entender o envolvimento destas moléculas na sinalização e indução do enraizamento. As PAs putrescina (put), espermidina (spd) e espermina (spm), geralmente estão associadas com a divisão celular (Kusano et al., 2007), podendo apresentar papel fundamental durante a formação das raízes adventícias. Estudos tem mostrado o envolvimento de PAs na formação de raízes em algumas espécies, como em *Quercus suber* e *Vitis vinifera*, demonstrando que a put pode ser considerada um marcador para o enraizamento (Neves et al., 2002). Da mesma forma, em *Berberis buxifolia* foi mostrado que as PAs podem ser consideradas agentes marcadores das fases de enraizamento (Arena et al., 2003). Entretanto, as PAs também podem ser consideradas mensageiras de sinais de estresse nas plantas (Liu et al., 2007). Estudos tem mostrado que o aumento de put pode regular alguns genes relacionados à biossíntese de AIA, fatores de transcrição relacionados à auxina e outros genes relacionados à transdução de sinal durante o estresse abiótico em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* (Marco et al., 2011). Neste sentido, estudos

visando elucidar o mecanismo de percepção e transdução de sinal de auxina, juntamente com a análise do conteúdo endógeno de PAs durante a indução do enraizamento, poderá elucidar o papel dessas biomoléculas neste processo morfogênético, ajudando a entender o processo de enraizamento em uma espécie arbórea de interesse econômico e ecológico.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Micropropagação de espécies arbóreas nativas e espécie de estudo

A micropropagação vem sendo empregada por possuir várias vantagens, dentre as quais destaca-se a obtenção de plantas livres de doença, a rápida propagação de genótipos, bem com a produção de mudas independente da época do ano e espaço físico reduzido para obtenção de novas plantas (Giri *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2009). Este processo pode ser realizado por meio da regeneração direta e indireta. A regeneração indireta envolve a fase de calo antes do desenvolvimento de brotações, podendo se tornar uma estratégia indesejável para a propagação em larga escala, pela possibilidade de induzir variação somaclonal. Por outro lado, a organogênese via regeneração direta é vantajosa para a propagação clonal, evitando a formação de calos (Giri *et al.*, 2004). Tradicionalmente, na micropropagação de espécies arbóreas utiliza-se a organogênese direta, usando-se como explantes segmentos nodais apicais e cotiledonares para a indução de brotações *in vitro* (Pijut *et al.*, 2012). Dessa forma, a micropropagação pode ser uma via alternativa para propagação de espécies florestais que encontram-se ameaçadas de extinção, apresentando um grande potencial de aplicação para a propagação de espécies arbóreas, pois possibilita a aplicação em programas de conservação, reflorestamento e recuperação de áreas degradadas (Giri *et al.* 2004; Shukla *et al.* 2009).

Dentre as espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, encontra-se a *C. fissilis*, de ocorrência predominante no Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, ocorrendo também, em menor intensidade, nas demais regiões do país. A sua madeira apresenta alto valor econômico, sendo usada para a fabricação de móveis e na construção civil em geral (Carvalho, 2003), e por esses motivos tem sido exploradas de modo não sustentável (Judd *et al.*, 1999). De acordo com a International Union for Conservation of Nature (IUCN), a espécie *C. fissilis* encontra-se atualmente ameaçada de extinção na

categoria em perigo, devido à sua importância econômica e consequente exploração (IUCN, 2017).

A *C. fissilis* é uma árvore caducifólia com altura que varia entre 10 a 40 m de altura e 40 a 200 cm de DAP (Carvalho, 2003). Possui frutos em forma de cápsula piriforme deiscente, lenhosa, espessa, marrom-escura, abrindo-se até mais da metade por cinco valvas longitudinais contendo em média 45 sementes distribuídas em cinco lóculos (Eibl et al., 1994; Carvalho, 2003). As sementes desta espécie são classificadas como ortodoxas (Carvalho et al., 2006), porém quando armazenadas em condições não controladas perdem rapidamente sua viabilidade, devido principalmente a condições de umidade, temperatura e ataque de patógenos (Cherobini et al., 2008; Martins e Lago, 2008). Estudos mostram que a mesma pode ser armazenada por 12 meses a 4°C sem redução na percentagem de emergência das plântulas (Sousa et al., 2016). Desta forma, a progressiva e rápida perda de viabilidade de suas sementes torna-se um obstáculo para produção contínua de mudas em viveiro, afetando ainda mais a disponibilidade de mudas para programas de reflorestamento comprometendo a regeneração da espécie em seu habitat.

Devido à importância econômica e ecológica da espécie, estudos iniciais realizados por Nunes et al. (2002) mostram o estabelecimento das condições para a micropropagação, usando como fonte de explantes segmentos nodais para indução de brotos. Adicionalmente, foi verificado pelo nosso grupo de pesquisa que a aplicação de citocinina ao meio de cultura induz o desenvolvimento de brotações e pode estar associado com alterações no metabolismo de carboidratos e PAs (Aragão et al., 2016). Ademais, foi demonstrado que a adição de citocinina afeta também o perfil proteômico na organogênese *in vitro* nesta espécie (Aragão et al., 2017). No enraizamento *in vitro* de *C. fissilis* foi verificado que a melhor taxa de indução das raízes ocorreu com aplicação de 5 µM de AIB (Nunes et al., 2002). Entretanto, até o momento não há descrito na literatura o envolvimento de auxinas (AIA e AIB) e inibidores de auxinas no enraizamento *ex vitro* dessa espécie e o metabolismo de PAs durante esse processo morfogênético.

2.2. Enraizamento *ex vitro*

O enraizamento é uma etapa crucial no processo de micropropagação, demonstrando-se crítico para a produção de mudas, pois vários fatores, tais como

espécie, genótipos, fatores ambientais, influenciam a taxa de enraizamento (Beruto et al., 2013; Caesar e Adelberg, 2015; Gabryszewska, 2015). As raízes originadas desta etapa são chamadas de adventícias pois não se originam da radícula do embrião ou da raiz principal por ela formada, e sim, por qualquer tecido que não seja radicular (Li et al. 2009).

O enraizamento das brotações micropropagadas pode ser realizado *in vitro*, ou *ex vitro*. No enraizamento *in vitro* as brotações são transferidas para meios de cultura suplementados ou não com auxinas, geralmente em concentrações baixas e em exposição por tempos prolongados (dias ou meses). Por outro lado, no enraizamento *ex vitro*, a base das brotações é imersa em solução de auxina mais concentrada e geralmente por um curto período de tempo (min ou h), sendo em seguida transferidas para o substrato (De Klerk et al., 1997; Yan et al., 2010).

Comparativamente, o enraizamento *ex vitro* proporciona várias vantagens em relação ao *in vitro*, destacando-se a redução de custos em até 71% (Ranaweera et al., 2013), redução de tempo durante o processo de micropropagação e de etapas, como a eliminação do enraizamento *in vitro*. Assim, o método de enraizamento *ex vitro* pode ser altamente eficiente e econômico (Yan et al., 2010; Ranaweera et al., 2013). Adicionalmente, mudas enraizadas *ex vitro* apresentam, comparativamente às enraizadas *in vitro*, melhor qualidade das raízes desenvolvidas (Yan et al. 2010), além de conferir maior tolerância das mudas ao estresse provocado pelo ambiente externo (Phulwaria et al., 2013).

O desenvolvimento do sistema radicular a partir do enraizamento adventício de plantas cultivadas *in vitro* ou *ex vitro* é um processo de grande complexidade envolvendo fatores endógenos e exógenos (Souza e Pereira, 2007), como da auxina. Dentre as auxinas sintéticas, o AIB é o mais utilizado para indução do enraizamento devido à sua característica fotoestável, que proporciona menor sensibilidade à degradação biológica quando comparado com outras auxinas, como o AIA (Nissen e Sutter, 1990). No entanto, a determinação da concentração ideal de AIB a ser aplicada na base das brotações é fundamental, pois há diferentes respostas entre as espécies, podendo altas concentrações promover um efeito inibitório (Carpenter e Cornell, 1992). Adicionalmente, a aplicação de auxina na base das brotações proporciona maiores efeitos na formação de raízes adventícias, pois fornece maior porcentagem, qualidade e uniformidade de enraizamento (Hartmann et al., 2002).

Aliada à fase de enraizamento das brotações micropropagadas é necessária a aclimatização, a qual é uma adaptação da planta às condições ambientais *ex vitro*. Uma das maiores dificuldades na micropropagação é a transferência com sucesso das brotações das condições *in vitro* para a *ex vitro*, pois diversos fatores como genótipo, estresse hídrico, alteração do metabolismo heterotrófico para autotrófico, infecção por patógenos, estresse pela luz, além das mudanças de temperatura interferem na sobrevivência das plantas (Barboza et al., 2006; Ribas et al., 2003). Uma das principais causas da baixa sobrevivência das plantas é a perda excessiva de água (Brainerd e Fuchigami, 1982). As brotações obtidas *in vitro* normalmente apresentam deficiência de cera epicuticular, cuja função é limitar a perda de água por meio da transpiração durante a aclimatização (Grout e Aston, 1978; Sutter e Langhans, 1979). Desta forma, a incapacidade de controlar a perda de água por transpiração a partir da superfície foliar, bem como o mau funcionamento dos estômatos de plantas cultivadas *in vitro* afetam a capacidade do ajuste das brotações ao ambiente externo, sendo necessária a aclimatização (Hazarika, 2006). Adicionalmente, o enraizamento *ex vitro* associado à aclimatização é uma etapa essencial para a sobrevivência das mudas, pois quando estas duas etapas ocorrem de forma simultânea, as brotações geralmente apresentam melhor enraizamento e com redução de custos (Yan et al., 2010).

2.3- Auxina e os inibidores de auxina no enraizamento *ex vitro*

A auxina é um composto orgânico de baixa massa molecular contendo um anel aromático e um grupo carboxílico (George et al., 2007), com atuação no crescimento e desenvolvimento da planta, envolvida em vários processos como estabelecimento e manutenção da polaridade do embrião e dominância apical, além do envolvimento em processos fisiológicos relacionados com a manutenção e regularização do meristema radicular (Luijten e Heidstra, 2009; Woodward e Bartel, 2005).

Dentre as auxinas, o AIA é a predominante, cumprindo a maioria das ações requeridas nas plantas, sendo um dos primeiros hormônios associados ao processo de enraizamento (Cooper, 1935; Sauer et al., 2013). Da mesma forma de outros hormônios vegetais, os sinais de auxina primeiramente precisam ser percebidos pela molécula receptora específica e esse sinal precisa ser transmitido para promover as respostas hormonais. Entretanto, a auxina é bastante singular entre os fitohormônios,

já que as plantas desenvolveram maquinarias complexas, como o transporte polar de auxinas (Ljung, 2013).

Seu mecanismo de transporte ocorre na direção basípeta por influxo, por meio da difusão, quando o AIA está na forma protonada ou por meio de um transportador secundário ativo, onde a forma dissociada de AIA é translocada. O efluxo de auxina ocorre mediante às proteínas de transporte de membrana, conhecidas como proteínas PIN-FORMED (PIN) (Kramer e Bennett, 2006; Křeček et al., 2009). Essas proteínas controlam a distribuição de auxina, importante para a formação de tecidos em desenvolvimento e para a manutenção da atividade do meristema apical da raiz (Adamowski e Friml, 2015; Friml e Palme, 2002; Vanneste e Friml, 2009).

Além disso, o mecanismo de sinalização da auxina também é um fator importante no desenvolvimento da planta. Estudos mostram que após a exposição à auxina há a indução e acúmulo de três famílias de genes: Small Auxin-up RNAs (SAURS), Gretchen Hagen3 (GH3) e a Auxin/Indole-3-Acetic Acid (AUX/AIA) (Hagen e Guilfoyle, 2002; Tromas e Perrot-Rechenmann, 2010; Woodward e Bartel, 2005). Um dos eventos chaves na ação da auxina envolve a mudança do padrão de expressão de alguns genes específicos, sendo as proteínas Aux/AIA reguladores-chave na modulação de expressão do gene da auxina (Liscum e Reed, 2002).

O controle da sinalização depende das condições do balanço endógeno da concentração de auxina. Em altas concentrações, a auxina é percebida por um complexo proteico, um co-receptor denominado “Transport inhibitor response 1/auxin signaling F-box proteins family” (TIR1/AFBs) que se liga às proteínas Aux/AIA, as quais são recrutadas para degradação via proteossoma (Calderon Villalobos et al., 2012). Dessa forma, os fatores de resposta a auxina (“Auxin response factors” - ARFs), são livres para se ligar a genes que contêm elementos de resposta de auxina (“Auxin Response Elements” – AuxRE) com a sequência (TGTCTC) em seus promotores para ativar ou reprimir a transcrição (Ljung, 2013). Em baixas concentrações de auxina, um co-repressor Topless (TPL) se liga a proteína Aux/AIA e então interage com os ARFs. Essa interação pode reprimir os ARFs, bloqueando assim a transcrição de genes responsivos à auxina (Calderon Villalobos et al. 2012).

Os mecanismos de transporte e ação de auxina associados ao processo de enraizamento podem ser explorados por meio da utilização de inibidores de auxinas,

como o TIBA e o PCIB. O TIBA é um inibidor do transporte de efluxo de auxina e está envolvido com a inibição do tráfego de auxina na membrana, pela inibição da ação das proteínas PIN, além de interferir no tráfego subcelular de proteínas PIN e com outros processos não relacionados ao transporte de auxina polar, como na mobilidade de organelas e vesículas, provavelmente por meio da inibição da dinâmica do citoesqueleto de actina (Geldner et al., 2001; Kleine-Vehn et al., 2006). O PCIB é um inibidor de auxina que atua na regulação da estabilidade da proteína Aux/AIA, bem como no acúmulo de transcritos de Aux/AIA, sendo importante na elucidação do mecanismo de percepção e transdução de sinal da auxina (Di et al., 2015; Oono et al., 2003).

2.4- Análises histológicas

O enraizamento das brotações micropropagadas é uma etapa fundamental para a produção de mudas. A formação de raízes adventícias em segmentos caulinares vegetativos pode ser originada a partir de células com capacidade meristemática (Bellini et al., 2014; Li et al., 2009). O desenvolvimento das raízes adventícias geralmente é dividido em três fases diferentes: indução, iniciação e expressão. A fase de indução é compreendida por eventos bioquímicos e moleculares em nível celular, porém sem mudanças morfológicas visíveis. A fase de iniciação é caracterizada pelas divisões celulares iniciais, onde pequenas células com núcleo grande e citoplasma denso estão presentes. A última fase é caracterizada por crescimento interno a partir das células formadas na indução, culminando na emergência do primórdio radicular (Li et al., 2009; Pacurar et al., 2014).

A formação e o desenvolvimento das raízes são reguladas principalmente pelo estímulo da auxina e pela modificação da homeostase da auxina (Fukaki e Tasaka, 2009; Pacurar et al., 2014). Além disso, a redução no transporte e na ação da auxina pode resultar em mudanças no padrão vascular da raiz, como a perda da organização do córtex, sugerindo que a continuidade do sinal induzido pelo AIA é necessário para a manutenção do padrão vascular durante a formação das raízes (Berleth et al., 2000; Nakhooda et al., 2013).

O desenvolvimento das raízes adventícias é espécie dependente, uma vez que algumas apresentam, comparativamente, maior facilidade para a indução de raízes, e em alguns casos, concentrações endógenas de auxinas suficientes para induzir a

resposta (Kevers et al., 1997). Por outro lado, algumas espécies são consideradas recalitrantes ao enraizamento, sendo necessário a aplicação de auxina exógena para obter respostas satisfatórias (Fett-Neto et al., 2001).

Estudos utilizando análises histológicas demonstraram que as raízes adventícias podem originar-se a partir de diferentes células, de xilema recém formado como visto em *Eucalyptus globulus* (Baltierra et al., 2004) ou a partir de células do parênquima próximas ao feixe vascular como verificado em *Malus domestica* e *Ebenus cretica* (Naija et al., 2008; Syros et al., 2004). Em *E. grandis* o uso de TIBA induziu modificações no padrão vascular, resultando em alterações na percepção da gravidade pela raiz (Nakhooda et al., 2013). Neste sentido, análises histológicas durante a formação de raízes adventícias em brotações obtidas na micropropagação em espécies arbóreas é fundamental para a caracterização das etapas de indução de raízes. Estes estudos podem ser utilizados para otimizar futuras técnicas de enraizamento em espécies arbóreas que exibem dificuldade de enraizamento. Além disso, esta análise pode auxiliar na verificação de mudanças anatômicas em brotações micropropagadas na presença e na ausência de inibidores de auxina (TIBA e PCIB).

2.5 – PAs no enraizamento *ex vitro*

As PAs são moléculas catiônicas de baixa massa molecular que estão presentes em todos os organismos vivos, incluindo os vegetais (Martin-Tanguy, 2001). Essas moléculas atuam em processos celulares como divisão celular e síntese de proteínas (Kakkar e Sawhney, 2002), e estão associadas à vários processos de crescimento e desenvolvimento, como germinação, organogênese e embriogênese (Aragão et al., 2016; Minocha et al., 2004; Pieruzzi et al., 2011; Silveira et al., 2006). Adicionalmente, foi postulado que a via metabólica das PAs interagem com outros metabólitos, incluindo hormônios, moléculas de sinalização e compostos protetores de estresse (Kusano et al., 2008) e que mudanças nos níveis de PAs podem afetar a metilação do DNA (Fraga et al., 2004).

As principais PAs presentes em plantas são a put, spd e spm, que podem ocorrer na forma livre, conjugada solúvel ou conjugada ligada. Na síntese das PAs, a put pode ser produzida a partir de duas vias: a partir da ornitina pela ação da ornitina descarboxilase (ODC) e a partir da arginina, pela ação da arginina descarboxilase

(ADC). A conversão de put à spd e spm ocorre pela adição sucessiva de grupos aminopropil originados do aminoácido metionina, a partir da S-adenosilmetionina (SAM), pela ação da SAM descarboxilase (SAMDC) (Bouchereau et al., 1999; Kusano et al., 2008).

Além das auxinas, estudos mostram que as PAs estão envolvidas no controle do enraizamento e podem ser usadas como moléculas marcadoras desse processo (Naija et al., 2009; Neves et al., 2002). As PAs estão relacionadas com a formação de raízes em algumas espécies, promovendo o alongamento das raízes adventícias em *Pinus virginiana* (Tang e Newton, 2005). Adicionalmente, em *Pinus strobus* foi mostrado que as PAs put e spd estão relacionadas a indução da raiz, enquanto a spm está envolvida com o crescimento das raízes (Fei et al., 2016). Entretanto, em uma cultivar de *Pyrus communis*, o aumento do conteúdo de put foi associado com a redução da taxa de enraizamento (Baraldi et al., 1995). Adicionalmente, em *Populus sp* foi verificado a conversão de put em ácido γ -aminobutírico (GABA), sendo essencial durante o enraizamento (Hausman et al., 1997).

Além disso, vários estudos têm mostrado que as PAs estão associadas com o ciclo celular, atuando na transição da fase do G1 para a S, especialmente as PAs spd e spm, cujos conteúdos destas PAs geralmente aumentam durante essa fase (Fuller et al., 1977). Neste sentido, tem sido sugerido a participação das PAs spd e spm na regulação do desenvolvimento da raiz por meio da expressão de genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de spd e spm em *Arabidopsis* (Hanzawa et al., 2002).

Embora estudos mostrem o envolvimento das PAs no enraizamento, pouco é conhecido sobre como as PAs modulam este processo morfológico, e se as mesmas interagem com o metabolismo de auxina. Neste sentido, a elucidação do envolvimento de PAs durante o enraizamento é fundamental para entender a regulação das PAs neste processo em brotações micropropagadas de espécies arbóreas nativas.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi analisar o envolvimento da auxina e PAs no enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas de *C. fissilis*.

3.2- Objetivos específicos

- 1) Avaliar o efeito de diferentes concentrações de AIB no enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas;
- 2) Analisar a eficiência dos inibidores de transporte (TIBA) e de sinalização (PCIB) de AIA no enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas;
- 3) Estabelecer as fases de indução e desenvolvimento de raízes adventícias durante o enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas;
- 5) Identificar e comparar o conteúdo de PAs na presença e na ausência dos inibidores de auxina e seu papel durante o enraizamento *ex vitro* em brotações micropropagadas nesta espécie.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Material Vegetal

O material vegetal utilizado para os experimentos de enraizamento foram brotações micropropagadas com 45 dias de cultura *in vitro*. Para a obtenção das brotações, sementes de *C. fissilis*, obtidas do viveiro Caiçara localizado na cidade de Brejo Alegre-SP, foram germinadas *in vitro* e plântulas com 60 dias foram utilizadas como fonte de explantes (segmentos nodais apicais e cotiledonares).

4.2- Germinação das sementes e indução das brotações *in vitro*

Antes da inoculação *in vitro*, as sementes foram submetidas a um processo de desinfestação de acordo com (Aragão et al., 2016), com modificações. A assepsia para 250 sementes foi realizada com 250 mL de água, contendo 60 µL de detergente comercial neutro, e enxaguadas em 100 mL de água, por 5 vezes. Em seguida as sementes foram imersas em 250 mL de álcool 70 % durante 1 min. Posteriormente, as sementes foram imersas em água sanitária 100% (QBoa[®]), contendo 1,8 a 2,5 % de cloro ativo, suplementada com fungicida Cercobin 700 wp (7 g.L⁻¹), durante 90 min. Posteriormente, as sementes foram submetidas a cinco lavagens com água destilada autoclavada (200 mL cada), em câmara de fluxo laminar. As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) (PhytoTechnology

Laboratories®), suplementado com sacarose (20 g.L⁻¹) (Proquimios) e fitagel (2,0 g.L⁻¹) (SigmaAldrich®), com pH ajustado para 5,8 e previamente autoclavado a 121°C, a 1,5 atm, por 15 min. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 16 h de luz, 22 μmol.m⁻².s⁻¹, a 25±2 °C.

Plântulas com 60 dias de idade de incubação foram utilizadas como fonte de explantes para a indução de brotações, obtendo-se segmentos nodais apicais e cotiledonares. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g.L⁻¹) (Proquimios), fitagel (2 g.L⁻¹) (SigmaAldrich®) e 2,5 μM de benziladenina (BA) (SigmaAldrich®), com pH ajustado para 5,7, previamente autoclavado a 121 °C, a 1,5 atm, por 15 min. Após a transferência, os explantes foram incubados por 45 dias em sala de cultura, com fotoperíodo de 16 h de luz, a 22 μmol.m⁻².s⁻¹, a 25±2 °C. Após 45 dias, as brotações oriundas de segmentos nodais apicais e nodais cotiledonares foram utilizadas para o enraizamento.

4.3- Efeito do AIB no enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas

Brotações obtidas no cultivo *in vitro* a partir de segmentos nodais apicais e cotiledonares foram separadas em microestacas com aproximadamente 1,5 cm, sendo mantido o meristema apical. A base das brotações foi imersa nas diferentes concentrações (0, 50, 100, 250 e 500 μM) de AIB (SigmaAldrich®) por 30 s e em seguida, as brotações foram transferidas para copos plásticos (50 mL) contendo substrato florestal (Basaplant®), e vermiculita (1:1; v/v). Após a transferência, os copos contendo as brotações foram acondicionados em bandejas plásticas (50 x 60 x 10 cm), e mantidas em sala de enraizamento com condições controladas, com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de 22 μmol.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 25±2 °C.

As bandejas foram cobertas com plástico parafilme tipo PVC para manter alta umidade relativa. Após vinte e cinco dias, foi iniciado o processo de redução da umidade dentro das bandejas, realizando perfuração no plástico parafilme tipo PVC para dar início ao processo de aclimatização simultaneamente ao enraizamento. Este procedimento foi realizado até a completa retirada do plástico parafilme tipo PVC, realizado no 24º dia após a incubação para o enraizamento.

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 X 5, sendo brotações oriundas de tipos de explantes (segmentos nodais

cotiledonares e apicais) e cinco concentrações de AIB. Cada tratamento foi composto por oito repetições, cada repetição contendo quatro brotações, totalizando trinta e duas brotações por tratamento.

Após 30 dias foram avaliados a percentagem de enraizamento, número e comprimento (cm) das raízes.

4.4- Efeito dos inibidores TIBA e PCIB no enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas

O efeito de diferentes concentrações dos inibidores de TIBA (0, 100 e 200 μM) (SigmaAldrich®) e PCIB (0, 200, 400 e 800 μM) (SigmaAldrich®) foi testado no enraizamento das brotações micropropagadas. Para tanto, foram utilizadas brotações (1 a 1,5 cm) obtidas a partir de segmentos nodais apicais e cotiledonares obtidas com 45 dias de cultura *in vitro*. A base das brotações foi imersa nos diferentes tratamentos por 90 min. No tratamento controle, ou seja, sem PCIB e/ou TIBA, a base das brotações foi imersa em água destilada. Os compostos TIBA e PCIB foram dissolvidos em NaOH 1N e diluídos em água destilada, e o pH foi ajustado em 7,0.

Após a incubação, as brotações foram transferidas para copos plásticos (50 mL) contendo substrato florestal e vermiculita (1:1; v/v), acondicionados em bandejas plásticas (50 x 60 x 10 cm), e mantidas em sala de enraizamento com condições controladas, com fotoperíodo de 16 h de luz, intensidade luminosa de 22 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 \pm 2 °C. As bandejas foram cobertas com plástico parafilme tipo PVC para manter alta umidade relativa. Após sete dias, foi iniciado o processo de redução da umidade dentro das bandejas, realizando perfuração no plástico parafilme tipo PVC para dar início ao processo de aclimatização simultaneamente ao enraizamento. Este procedimento foi realizado até a completa retirada do plástico parafilme tipo PVC, realizado no décimo dia após a incubação para o enraizamento.

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 X 3, sendo brotações oriundas de tipos de explantes (segmentos nodais cotiledonares e apicais) e três concentrações de TIBA. Cada tratamento foi composto por seis repetições, cada repetição contendo cinco brotações, totalizando trinta brotações por tratamento. O mesmo delineamento foi realizado para as brotações tratadas com PCIB. Após 13 dias foram avaliados a indução (%) de enraizamento, o número e comprimento (cm) das raízes.

4.5- Coleta de amostras de brotações durante o enraizamento *ex vitro* para análise histológicas e de PAs

Foram determinadas as fases de indução e desenvolvimento de raízes adventícias nas brotações micropropagadas. Para tanto, a base de brotações (1 a 1,5 cm) oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares obtidas no cultivo *in vitro* foram dispostas em placas de Petri na ausência (controle) e na presença de 800µM de PCBI e 200 µM de TIBA, por 90 min. Em seguida as brotações foram transferidas para copos plásticos (volume de 50 mL) contendo substrato florestal e vermiculita (1:1; v/v). Após a transferência, as brotações foram acondicionadas em bandejas plásticas cobertas com parafilme tipo PVC e mantidas em sala de pré-aclimatização em condições controladas, com fotoperíodo de 16 h de luz, a 22 µmol.m².s⁻¹ e 25±2°C. O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 X 4, sendo em três concentrações (controle e a melhor dosagem de TIBA e de PCIB) e quatro tempos de indução de raízes (tempo 0, terceiro, sexto e décimo dias). Cada tratamento foi composto por três repetições, cada repetição contendo vinte brotações, totalizando sessenta brotações por tratamento. O mesmo delineamento foi realizado para as brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares.

4.6- Determinação das fases do desenvolvimento da raiz verificadas a partir de análises histológicas

Para as análises histológicas, as amostras foram fixadas em solução de fixação contendo gluteraldeído (2,5 %) e formaldeído (4 %) em tampão fosfato (0,1 M) pH ~ 7,2, em temperatura ambiente, durante 24 h. Em seguida, foram submetidas à desidratação com série etanólica crescente (30, 50, 70, 90 e 100%) por duas vezes de 1 h cada. Posteriormente, as amostras foram infiltradas em historesina (Leica®) e etanol 100% (1:1; v/v) por 12 h, seguido de historesina 100% por 24 h, e emblocadas em historesina. Secções (5 µm) foram obtidas em micrótomo Leica®, montadas em lâminas e em seguida, coradas com solução aquosa de azul de toluidina (1%). As secções foram observadas em microscópio Axio Imager M2 (Zeiss®), com o programa Axio Vision 4.8 (Zeiss®), e fotografado com o auxílio de uma câmera Axio Cam MR3 (Zeiss®) acoplada ao equipamento.

A parte basal ($\pm 0,5$ cm) das brotações foram coletadas antes (tempo 0), e após 3, 6, e 10 dias de incubação nos diferentes tratamentos controle (sem TIBA e PCIB) e nos tratamentos da melhor dosagem de TIBA e PCIB para as análises histológicas. Cada tratamento foi composto por três repetições, cada repetição contendo cinco brotações, totalizando quinze brotações por tratamento.

4.7- Determinação do conteúdo endógena de PAs

A determinação de PAs livres foi realizada de acordo com Aragão et al. (2016). As amostras (100 mg de matéria fresca – MF - cada, em triplicada) foram maceradas inicialmente com nitrogênio líquido, e em seguida, com 0,6 mL de ácido perclórico a 5 % (v/v) (Merck®), incubadas no gelo por 1 h e centrifugadas a 16.000 x g por 20 min, a 4 °C. Em seguida as PAs livres foram dansiladas. Para tanto, 40 μ L da amostra de PAs foram misturados com 20 μ L de 1,7- diaminoheptano (DAH) 0,05 mM (utilizado como padrão interno), 50 μ L de solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 100 μ L de cloreto de dansil (5 mg.mL⁻¹ em acetona; 1,8 mM) (Merck),. Após a mistura, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min a 70°C. O excesso de cloreto de dansil foi removido pela adição de 25 μ L de solução de prolina (100 mg.mL⁻¹) com posterior incubação por 30 min no escuro, em temperatura ambiente. As PAs dansiladas foram particionadas com 200 μ L de tolueno, e 175 μ L da fase apolar (orgânica), que contém as PAs, foi coletada, seca sob jato de nitrogênio, e ressuspendida em 175 μ L de acetonitrila absoluta.

A identificação e quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS) de 5 μ m. Como solvente foram utilizados acetonitrila 10 % em água, pH 3,5 ajustado com HCl 1N (solvente A) e acetonitrila absoluta (solvente B). O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65 % durante os primeiros 10 min, de 65 a 100 % entre 10 e 13 min e 100 % até 21 min com fluxo de 1 mL min⁻¹, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação a 340 nm e emissão em 510 nm. As áreas dos picos e os tempos de retenção de cada PAs foram avaliados por comparação com PAs padrão em concentrações conhecidas put, spd e spm (SigmaAldrich®).

4.8- Análises estatísticas

Todos os dados foram apresentados na forma de média submetidos à análise de variância (ANOVA), e submetidos ao teste de separação de médias Student-Newman-Keuls (SNK) em 5% de probabilidade (Sokal e Rohlf, 1995), com o auxílio do Programa estatístico Assistat versão 7.7 beta.

5- RESULTADOS

5.1- Efeito do AIB no enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas

Brotações obtidas no cultivo *in vitro* a partir de segmentos nodais apicais e cotiledonares foram submetidas as concentrações (0, 50, 100, 250 e 500 μM) de AIB. Neste experimento, não foi verificada interação entre os fatores, brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares e as concentrações de AIB, para os parâmetros indução e número de raízes. Entretanto, analisando os fatores independentemente, verificamos que houve diferença estatística significativa entre as concentrações de AIB (Figuras 1 A - D). A indução de raízes ocorre tanto na presença quanto na ausência de AIB (Figura 1 B), enquanto o maior número de raízes foi observado em 50 μM de AIB, independente do tipo de brotação utilizada (Figura 1 D).

O maior comprimento de raízes foi observado nas concentrações de 50 e 250 μM de AIB em brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares, respectivamente (Figura 1 E). Em adição, a maior concentração de AIB (500 μM) reduziu significativamente o comprimento de raízes em brotações provenientes dos dois tipos de explantes (Figura 1 E). Ademais, comparando-se os dois tipos de explantes na mesma concentração verificou-se que o comprimento de raízes foi significativamente maior na concentração de 250 μM em segmentos nodais cotiledonares comparativamente aos apicais, não havendo diferenças entre estes nas demais concentrações (Figura 1 E).

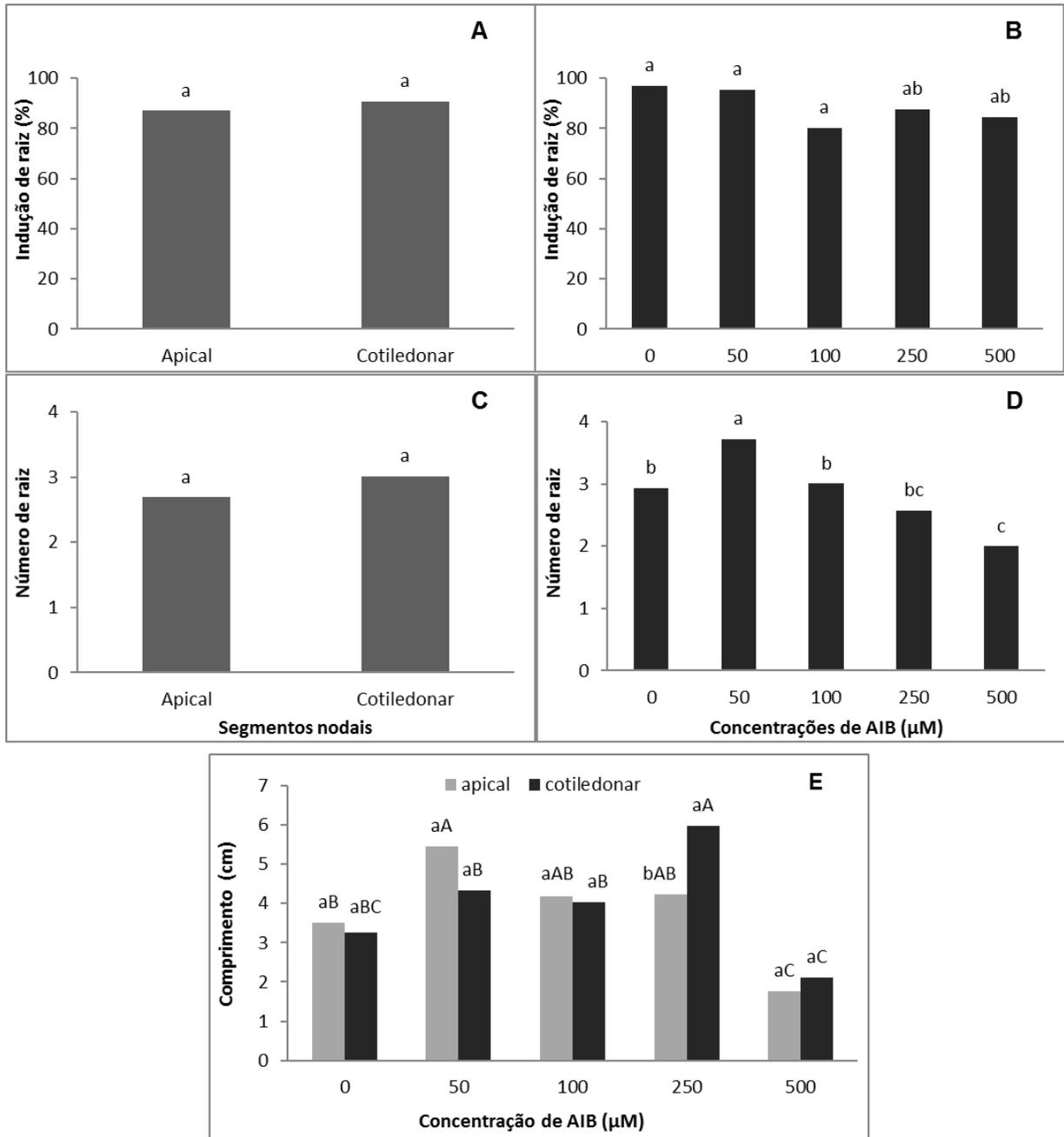


Figura 1: Percentagem de indução (A e B), número (C e D) e comprimento (E) de raízes em brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares após 30 dias de enraizamento *ex vitro*. Médias de brotações oriundas de segmentos nodais (A e C) e das concentrações de AIB independente do tipo de segmentos nodais (B e D) foram apresentadas separadamente por não terem interação entre si. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Médias de comprimento (E) apresentaram interação entre as brotações oriundas de segmentos nodais e as concentrações de AIB. Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dois tipos de brotações (oriundas de segmentos nodal apical e cotiledonar) em cada concentração de AIB. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se as diferentes concentrações de AIB em cada tipo de brotação. AIB = ácido indol butírico; CV = coeficiente de variação ($n = 8$; CV A e B = 17,5 %, CV C e D = 31,8 %, CV E = 33,5 %).

Após o enraizamento e aclimatização, as mudas foram mantidas em casa de vegetação por 3 meses (Figura 2). As mudas micropropagadas foram enviadas para o Corredor Florestal Fazenda Dourada, localizada em Rio das Ostras- RJ.



Figura 2: Aspectos morfológicos de mudas micropropagadas de *C. fissilis* após 4 meses em casa de vegetação, prontas para o plantio no campo (A) e detalhe da muda (B).

5.2- Efeito dos inibidores TIBA e PCIB no enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas

Não havendo a necessidade do AIB para promover a indução de raízes, foi testado o efeito do inibidor de transporte de auxina, TIBA a 100 e 200 μM e do inibidor de sinalização de auxina, PCIB a 400 e 800 μM . Neste experimento, não foi verificada interação entre os fatores, brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares e as concentrações de PCIB para os parâmetros indução e número de raízes. Entretanto, analisando os fatores independentemente, verificamos que houve diferença estatística significativa entre os segmentos nodais e entre as concentrações do inibidor PCIB (Figuras 3 A - D). Brotações oriundas de segmentos nodais apicais apresentaram uma redução significativa na indução e número de raízes em comparação as brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares (Figura 3 A e C). Analisando as concentrações independente ao tipo de segmento nodal utilizado, foi verificada uma redução significativa da indução e número de raízes na presença de 400 e 800 μM de PCIB (Figura 3 B e D). Entretanto, para o comprimento de raízes

foi verificada interação entre os fatores, brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares e as concentrações de PCIB. O comprimento de raízes foi reduzido significativamente em 400 e 800 μM de PCIB em brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares (Figura 3 E).

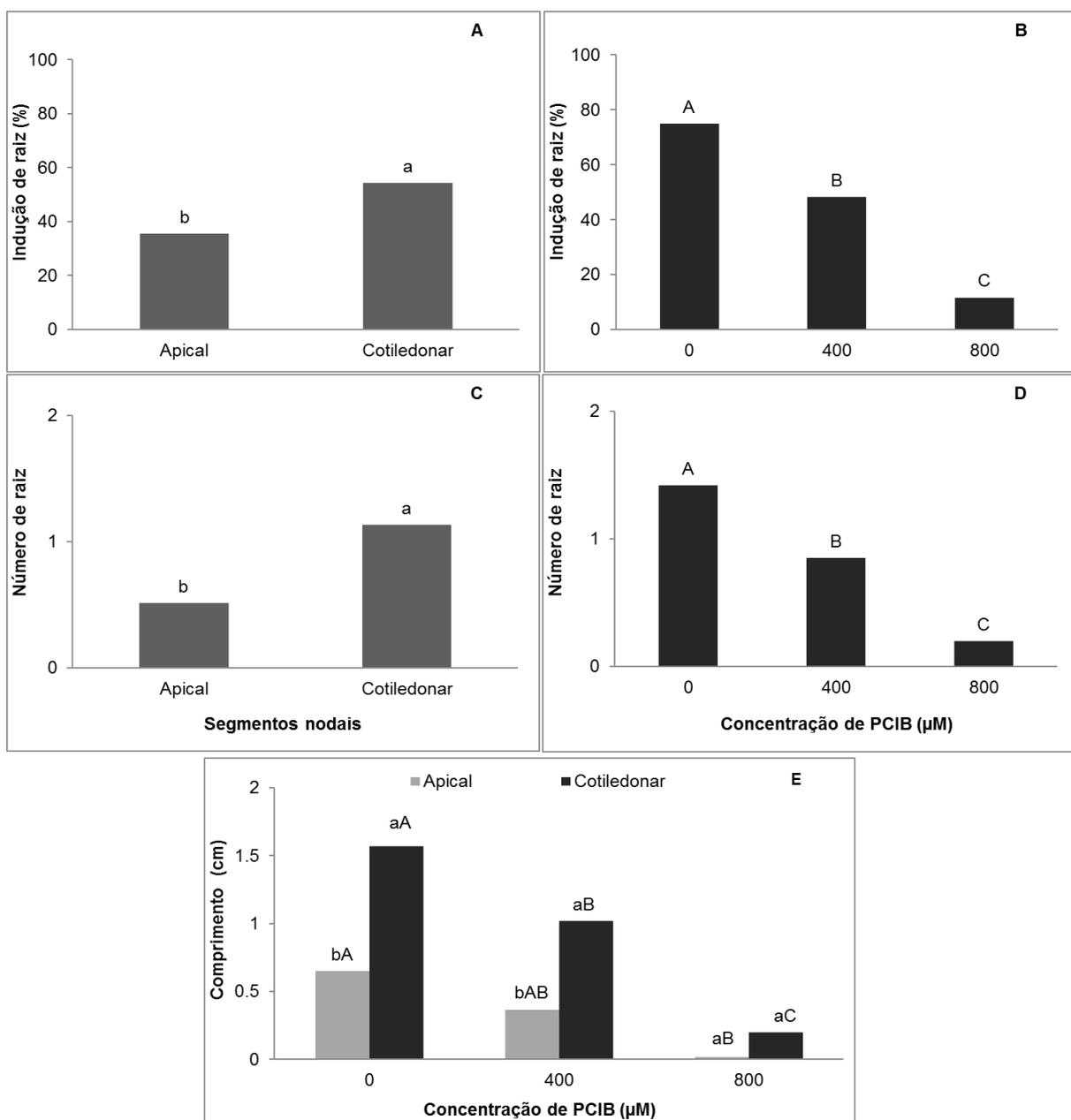


Figura 3: Percentagem de indução (A e B), número (C e D) e comprimento (E) de raízes em brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares após 13 dias de enraizamento *ex vitro*. Médias de brotações oriundas de segmentos nodais (A e C) e das concentrações de PCIB independente do tipo de segmentos nodais (B e D) foram apresentadas separadamente por não terem interação entre si. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Médias de comprimento (E) apresentaram interação entre as brotações oriundas de segmentos nodais e as concentrações de PCIB. Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dois tipos de brotações (oriundas de segmentos nodal apical e cotiledonar) em cada concentração de PCIB. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se as diferentes concentrações de PCIB em cada tipo de brotação. PCIB= ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico; CV = coeficiente de variação ($n = 6$, CV A e B = 40,16%, CV C e D = 48,99%; CV E = 50,36%).

Analisando-se o efeito do TIBA no enraizamento não foi verificada interação entre os fatores, brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares e as concentrações de TIBA, para o parâmetro indução de raízes. Entretanto, analisando os fatores independentemente, verificamos que houve redução significativa na indução de raízes entre as concentrações do inibidor TIBA independente do tipo de brotação utilizada (Figura 4 A e B). Entretanto, para o número e comprimento de raízes foi verificada interação entre os fatores, brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares e as concentrações de TIBA. O número e comprimento de raízes foi reduzido significativamente em 100 e 200 μM de TIBA em brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares (Figura 4 C e D).

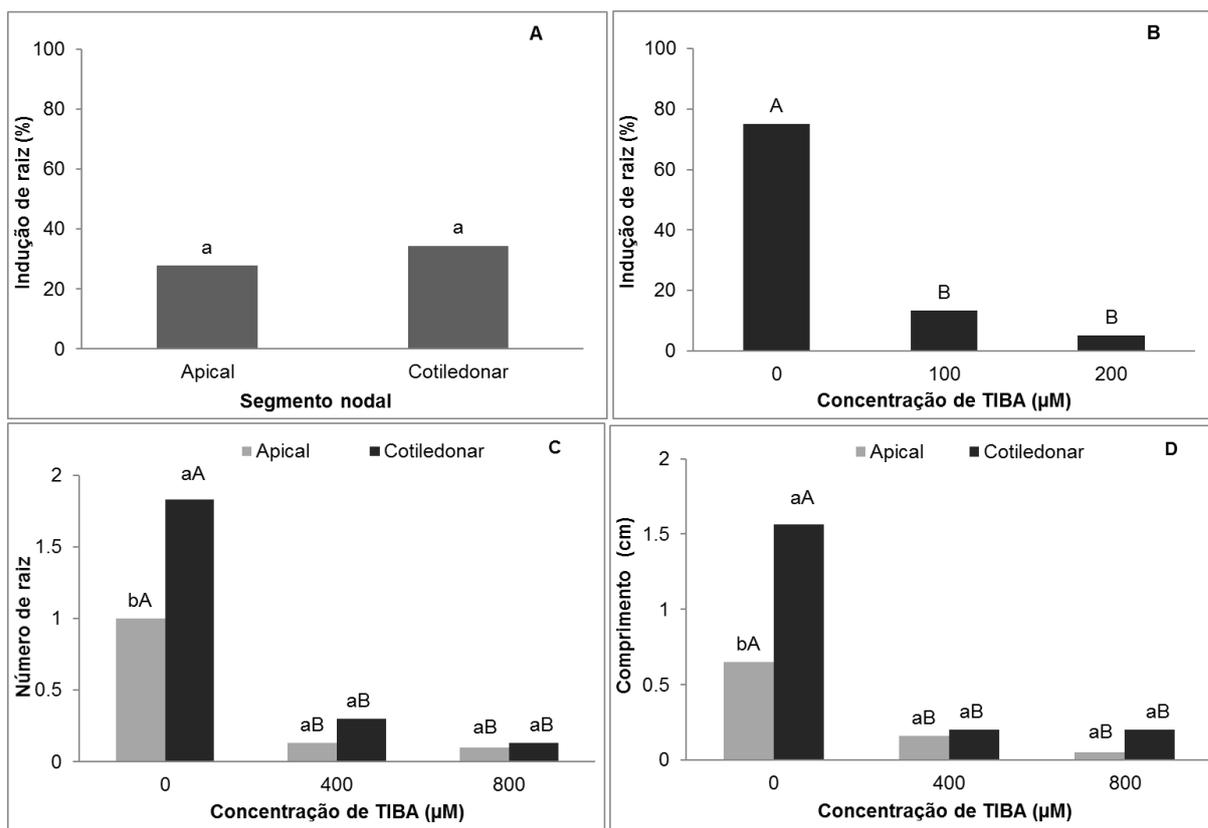


Figura 4: Percentagem de indução (A e B), número (C) e comprimento (D) de raízes em brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares após 13 dias de enraizamento *ex vitro*. Médias de brotações oriundas de segmentos nodais (A) e das concentrações de TIBA independente do tipo de segmentos nodais (B) foram apresentadas separadamente por não terem interação entre si. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Médias de comprimento (D) apresentaram interação entre as brotações oriundas de segmentos nodais e as concentrações de TIBA. Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dois tipos de brotações (oriundas de segmentos nodal apical e cotiledonar) em cada concentração de TIBA. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se as diferentes concentrações de TIBA em cada tipo de brotação. TIBA= ácido 2,3,5-trioodo benzoico; CV = coeficiente de variação ($n = 6$, CV A e B = 37,12%, CV C = 56,30 %; CV D = 62,54%).

Em brotações micropropagadas de *C. fissilis* é possível obter o enraizamento *ex vitro* sem a necessidade de utilização de reguladores de crescimento vegetal como o AIB (Figura 1). Diante dos resultados obtidos, percebemos que o PCIB, que reduz a sinalização de auxina, e o TIBA, que bloqueia o transporte de auxina pelas proteínas PIN-FORMED, inibiram significativamente o enraizamento nesta espécie. Dessa forma, podemos inferir que as brotações desta espécie apresentam níveis endógenos de auxinas suficientes para promover o enraizamento, conforme verificado no tratamento controle, sem adição de auxina.

5.3- Determinação das fases do desenvolvimento raiz verificadas a partir de análises histológicas

Brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares no tratamento controle, TIBA e PCIB durante o enraizamento *ex vitro* foram utilizadas identificar as alterações morfohistológicas que ocorrem nos tecidos durante a formação das raízes adventícias (Figura 5).

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que a indução de raízes adventícias em brotações de *C. fissilis* origina-se a partir de células localizadas próximas ao feixe vascular, provavelmente na periferia do floema e de tecidos adjacentes (Figura 5 D). Foi possível observar que várias células em divisão no 3º dia de enraizamento, formando regiões com divisões celulares, denominada de centro meristemático (Figura 5 D). Posteriormente, o desenvolvimento de primórdios radiculares foi observado no 6º dia de enraizamento (Figura 5 G). No 10º dia de indução do enraizamento foi observado o alongamento da raiz, a qual é projetada para o exterior do caule da brotação (Figura 5 J). Por outro lado, brotações tratadas com os inibidores TIBA e PCIB não apresentaram os eventos histológicos comparativamente com os observados nas brotações mantidas no tratamento controle (sem auxinas e sem inibidores) durante o tempo analisado (Figura 5 B, C, E, F, H, I, L e M).

Neste sentido, as brotações micropropagadas de *C. fissilis* foram induzidas ao enraizamento *ex vitro* sem a necessidade de auxina exógena, sendo suficiente a auxina endógena existente nestas brotações, o que corrobora com os resultados obtidos com o uso dos inibidores, os quais inibiram o enraizamento, não sendo verificado os eventos histológicos relacionados com a formação das raízes adventícias.

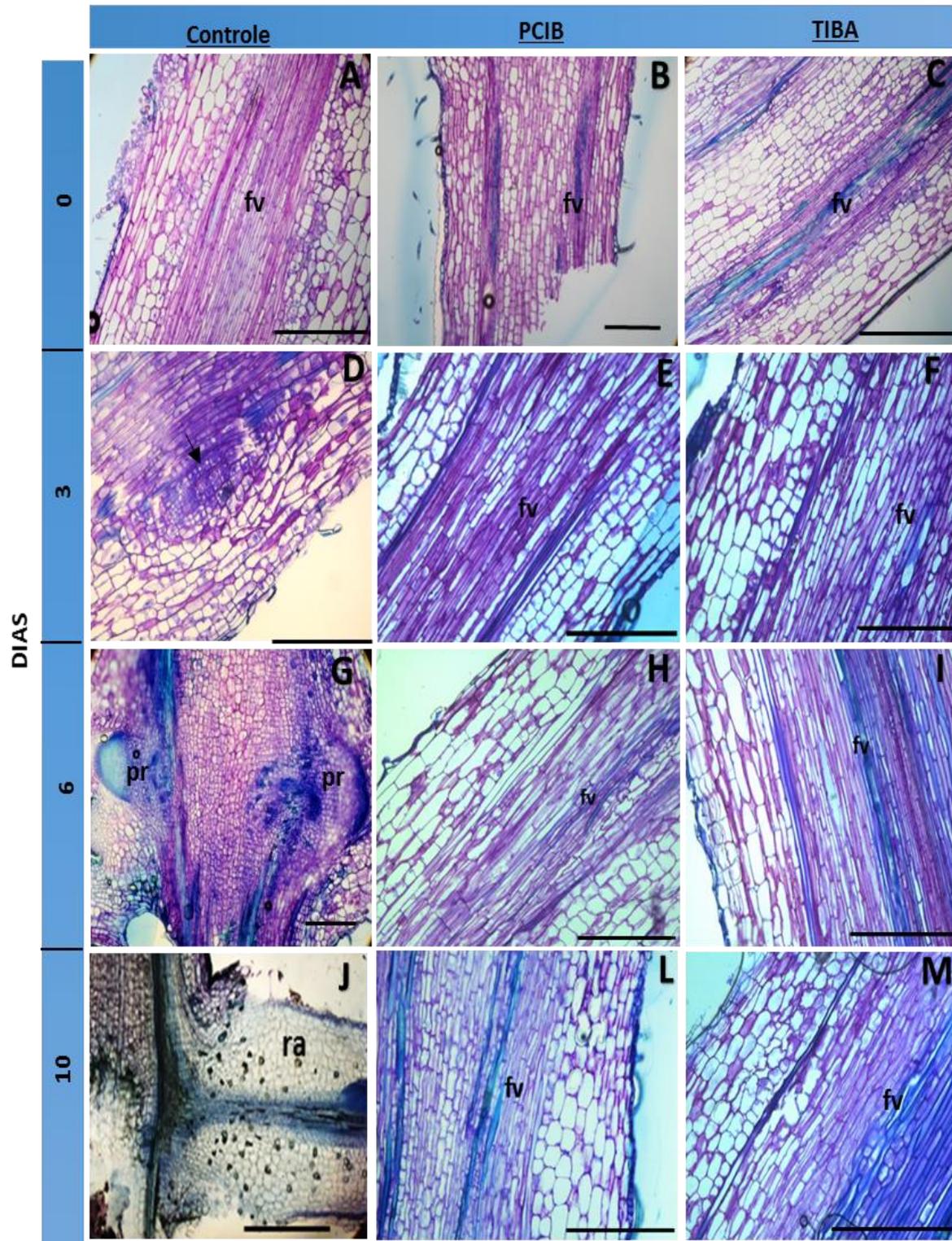


Figura 5: Aspectos morfohistológicos em cortes longitudinais durante o enraizamento *ex vitro* em brotações de *C. fissilis* antes (tempo 0) e após 3, 6 e 10 dias de enraizamento nos tratamentos controle, TIBA (200 μ M) e PCIB (800 μ M). Seta = indica divisões de células cambiais. pr = primórdio radicular, fv = feixe vascular, ra = raiz adventícia. Barras = 200 μ m.

5.4- Determinação do conteúdo endógeno de PAs

O conteúdo endógeno de PAs livres totais foi analisado em brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares antes (tempos 0) e após 3, 6 e 10 dias de enraizamento nos tratamentos controle, 200 μ M de TIBA e 800 μ M de PCIB (Figura 6). Verificou-se um aumento das PAs em brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares no 10^o dia quando tratados com TIBA e PCIB (Figura 6 A) enquanto em brotações oriundas de segmentos nodais apicais, conteúdo maiores de PAs foram observados a partir do 3^o dia no tratamento PCIB (Figura 6 B). Comparando o mesmo tratamento ao longo dos dias analisados, verificou-se maiores conteúdo de PAs livres totais em brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares tratados com PCIB a partir do 3^o dia e no 6^o, assim como no 10^o dia no tratamento com TIBA (Figura 6 A). Em brotações oriundas de segmentos nodais apicais, conteúdo menores de PAs foram observados quando mantidas no controle no 3^o e 10^o dia (Figura 6 B).

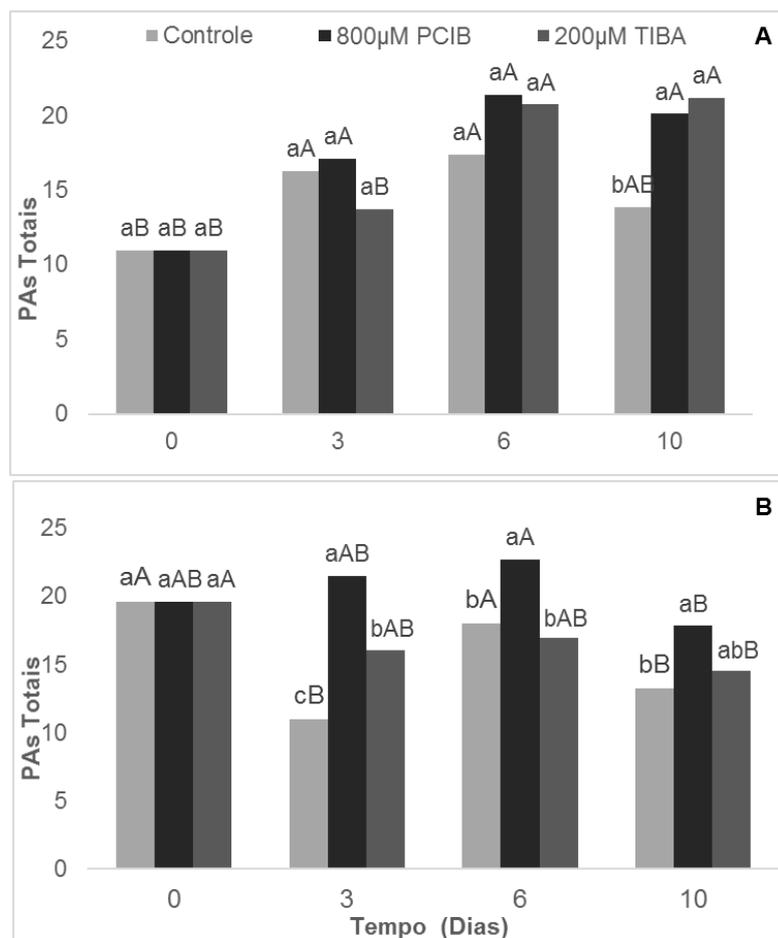


Figura 6: Conteúdo de PAs livres totais durante o enraizamento *ex vitro* de brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais cotiledonares (A) e apicais (B) mantidas nos tratamentos controle, 200 μ M de TIBA e 800 μ M de PCIB. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dias de enraizamento em cada tratamento. Letras minúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os diferentes tratamentos em cada dia de enraizamento. TIBA = ácido 2,3,5-trioodo benzoico, PCIB = ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico; CV = coeficiente de variação. ($n = 3$, CV A = 14,7%, CV B = 11,1%).

O conteúdo endógeno das PAs livres put, spd e spm foi afetado pelos tratamentos (Figura 7). O conteúdo de put livre foi significativamente menor em brotações mantidas no tratamento controle, onde houve maior enraizamento, comparativamente com as brotações mantidas nos inibidores, quando ocorreu redução significativa do enraizamento (Figura 7 A). O conteúdo de put aumentou significativamente a partir do 3º dia em brotações tratadas com os inibidores (Figura 7 A). Em contrapartida, o conteúdo de spd livre não foi afetado pelos tratamentos e tempo de enraizamento, não apresentando diferenças estatísticas significativas nas brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares mantidas nos diferentes

tratamentos (Figura 7 B). O conteúdo de spm livre diminuiu significativamente nas brotações antes de induzir o enraizamento (tempo 0) até o 10º dia de enraizamento para todos os tratamentos (Figura 7 C). Após o início do enraizamento, o maior conteúdo desta PA foi observada no 3º e 6º dia em brotações mantidas no tratamento controle, quando ocorre o desenvolvimento das raízes, comparativamente com as brotações mantidas em TIBA e PCIB (Figura 7 C).

Analisando a conteúdo de PAs livres em brotações oriundas de segmentos nodais apicais (Figura 7 D-F) verificou-se uma redução significativa no conteúdo de put para todos os tratamentos no 3º dia de enraizamento, sendo verificado valores significativamente menores para as brotações mantidas no tratamento controle (no período em que ocorre a formação dos centros meristemáticos) comparativamente com os tratamentos com inibidores. Um acúmulo no conteúdo de put livre foi observado no 3º dia em brotações mantidas nos dois inibidores no 6º e, no 10º dia apenas para aquelas mantidas em PCIB (Figura 7 D). Contrariamente ao observado em brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares, as oriundas de segmentos nodais apicais apresentaram conteúdo significativamente maior de spd no 3º dia no tratamento com o inibidor PCIB (Figura 7 E). O conteúdo de spm livre diminuiu significativamente do tempo 0 (ou seja, brotações antes do enraizamento) para todos os tratamentos. Após iniciar o enraizamento, as brotações mantidas no tratamento controle, apresentaram conteúdo significativamente maior no 3º e 6º dia comparativamente aos tratamentos com inibidores, enquanto no 10º dia de enraizamento, o menor conteúdo desta PA foi observado em brotações mantidas no tratamento controle (Figura 7 F).

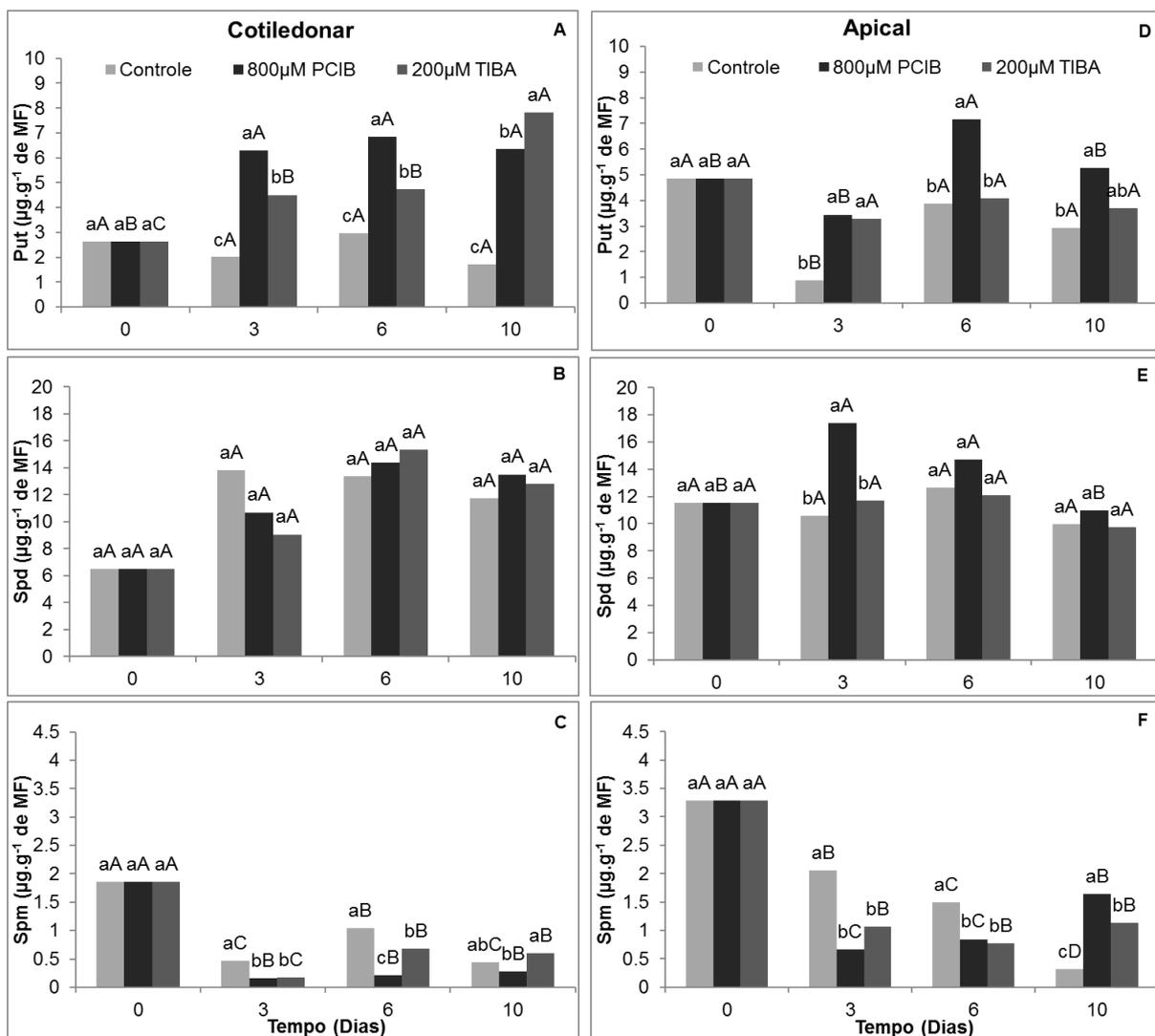


Figura 7: Conteúdo ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF) de putrescina (A e D), espermidina (B e E) e espermina (C e F) em brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais cotiledonares (A, B, C) e apicais (D, E, F) antes (tempo 0) e após 3, 6 e 10 dias de enraizamento nos tratamentos controle, 200 μM de TIBA e 800 μM de PCIB. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dias de enraizamento em cada tratamento. Letras minúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os tratamentos em cada dia de enraizamento. TIBA = ácido 2,3,5-trioído benzoico, PCIB = ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico; put = putrescina; spd = espermidina; spm = espermina; CV = coeficiente de variação. ($n = 3$, CV A = 17,5%, CV B = 15,6%, CV C = 16,4%, CV D = 24,0 %, CV E = 13,6 %, CV F = 14,2%).

Analisando a razão das PAs Put/(Spd+Spm) verificou-se que as brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares mantidas no tratamento controle, o qual permitiu o enraizamento, apresentou valores significativamente menores comparativamente às brotações mantidas nos tratamentos com os inibidores.

Brotações no 3º e 10º dia de enraizamento nos tratamentos com os dois inibidores, os quais reduziram significativamente a formação de raízes, e também no 6º dia no tratamento com PCIB, apresentaram valores significativamente maiores para a razão das PAs (Figura 8 A).

Entretanto, para as brotações oriundas de segmentos nodais apicais não verificou-se diferenças estatísticas significativas para a razão de PAs entre os tratamentos testados (Figura 8 B).

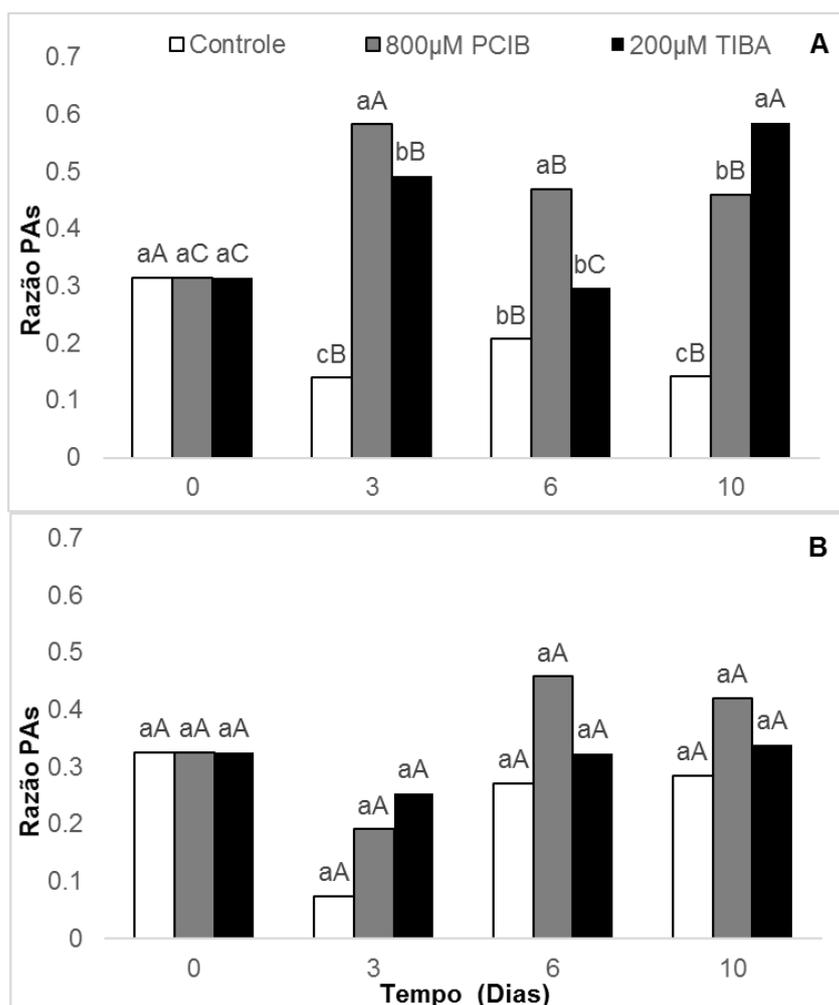


Figura 8: Razão de PAs [Put/(Spd+Spm)] durante o enraizamento *ex vitro* em brotações de *C. fissilis* oriundas de segmentos nodais cotiledonares (A) e apicais (B) nos tratamentos controle, 200 µM de TIBA e 800 µM de PCIB. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os dias de enraizamento em cada tratamento. Letras minúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas comparando-se os tratamentos em cada dia de enraizamento. TIBA = ácido 2,3,5-trioodo benzoico, PCIB = ácido 2-clorofenoxi-2-metil propiônico; CV = coeficiente de variação. (n = 3, CV A = 14,8%, CV B = 23,0%).

Portanto, de acordo com os dados apresentados, podemos inferir que o acúmulo de put pode ser um marcador na inibição do enraizamento induzida pelos inibidores TIBA e PCIB. Por outro lado, a spm pode estar envolvida na fase de indução e durante a formação do primórdio radicular, pois ela está presente em níveis maiores no tratamento controle tanto para os segmentos nodais cotiledonares quanto para apicais no 3º e 6º dia após iniciar o enraizamento.

6- DISCUSSÃO

As espécies arbóreas geralmente necessitam do uso de reguladores de crescimento vegetal, em especial auxinas, como o AIB, para promover o enraizamento adventício (De Klerk et al., 1999; Phulwaria et al., 2013). No entanto, para brotações micropropagadas de *C. fissilis* não há necessidade do uso deste regulador para a indução do enraizamento, uma vez que as concentrações de AIB utilizadas não apresentaram efeito significativo em relação ao controle para a indução de raízes (Figura 1 A e B). Em outras espécies arbóreas foi observado que a utilização de AIB em baixas concentrações foi suficiente para obter altas taxas de indução de raízes. Naik et al. (2003) observaram que brotações oriundas de segmentos nodais apicais de *Gmelina arborea* foram enraizadas *in vitro* utilizando-se 100 µM de AIB. A necessidade de 147,6 µM de AIB para promover o enraizamento *in vitro* de *Garcinia mangostana* também foi mostrado (Noor, 2000). Da mesma forma, em três linhagens de *Sorbus domestica* foi verificado que concentrações entre 4,9 e 14,76 µM promoveram o enraizamento *in vitro* (Piagnani et al., 2012). No enraizamento *in vitro* de *C. fissilis*, Nunes et al. (2002) verificaram que a melhor taxa de indução das raízes ocorreu com aplicação de 5 µM de AIB. Embora baixas concentrações de AIB sejam eficientes para induzir o enraizamento *in vitro*, poucos são os estudos que mostram a relação da ausência do AIB, para a indução de enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas em outras espécies arbóreas (Fermino Júnior et al., 2011) como foi observado para *C. fissilis* no presente estudo.

A auxina tem sido um dos principais responsáveis pela fase de desenvolvimento da raiz (Da Costa et al., 2013; Pacurar et al., 2014) e sua taxa endógena pode determinar a capacidade de enraizamento podendo ser dependente de cada espécie. Essa capacidade pode ser explicada pela existência de

um metabolismo mais lento de AIA e/ou uma maior taxa basípeta de AIA (Wilson, 1994), que pode estar presente nas brotações de *C. fissilis*. Assim a auxina endógena produzida no ápice é transportada de forma basípeta para a superfície basal cortada do caule, atuando como um estímulo para o enraizamento (da Costa et al., 2013). A ação de auxina pode estar relacionada com o ciclo celular durante a formação de raízes adventícias regulando o ponto de controle da fase G1 para S (Magyar et al., 2005). Qualquer interferência no movimento endógeno de auxina pode alterar a progressão do ciclo celular e influenciar a formação de raízes adventícias (Overvoorde et al., 2010; Wang e Ruan, 2013).

Embora não seja necessário o uso de AIB para a indução de enraizamento, verificou-se que houve diferenças significativas no comprimento das raízes comparativamente ao tratamento controle em brotações micropropagadas de *C. fissilis* (Figura 1 E). Resultados semelhantes foram verificados por Perveen et al. (2013) para o enraizamento *ex vitro* de *Albizia lebbek*. Estes autores, utilizando segmentos nodais cotiledonares, verificaram que 250 µM de AIB foi o tratamento que proporcionou o maior comprimento de raiz.

O uso de inibidores de auxina, como o TIBA e PCIB, pode ser útil para elucidar o papel da auxina no enraizamento em brotações micropropagadas de *C. fissilis*, especialmente para mostrar que os níveis endógenos desta auxina podem ser suficientes para promover a formação de raízes adventícias. Verificou-se que o enraizamento das brotações de *C. fissilis* foi reduzido significativamente pelo PCIB (Figura 3), conhecido por inibir a sinalização, e pelo TIBA (Figura 4), conhecido por inibir o transporte de auxina. Assim, foi constatado a partir destes resultados, que o transporte endógeno de auxina, bem como a continuidade do sinal de AIA, é necessário para a formação de raízes adventícias em *C. fissilis*. Similarmente, em *Petunia hybrida*, o uso de ácido-1-N-naftilftalâmico (NPA), um inibidor de transporte de auxina, contribuiu significativamente para a redução do enraizamento *ex vitro* (Ahkami et al., 2013). Dados reportados por Tyburski e Tretyn (2004) mostraram que o TIBA inibe a fase inicial do desenvolvimento da raiz durante a formação de centros meristemáticos. Resultados semelhantes foram verificados por Nakhoda et al. (2013), que observaram a redução do comprimento de raiz quando utilizou-se o TIBA em *E. grandis*. O TIBA é um inibidor do transporte de efluxo de auxina e está envolvido com a inibição do tráfego de auxina na membrana plasmática, pela inibição

da ação das proteínas PIN (Geldner et al., 2001). Em adição, o TIBA modifica a expressão de um gene, MiPIN1, que codifica os transportadores de auxina, dentre elas as proteínas PIN (Li et al., 2012) e a polarização das proteínas PIN é modulada pela fosforilação e desfosforilação mediada pela proteínas de fosfatases de serina e treonina de tipo 2A (PP2A) (Michniewicz et al., 2007). Além disso, tem sido proposto que a PP2A pode apresentar um papel na regulação do transporte de auxina (Ludwig-Müller et al., 2005), além da sua atividade ser reduzida na presença do inibidor de transporte de auxina NPA em *Arabidopsis* (Deruere et al., 1999). Neste sentido, os resultados obtidos sugerem que a inibição do transporte de auxina em *C. fissilis* promovido pelo TIBA pode estar relacionada a uma alta regulação de expressão gênica das proteínas PIN juntamente com a fosforilação de proteínas envolvidas durante o enraizamento. Análises futuras com proteínas diferencialmente expressas, via proteômica comparativa, pode mostrar proteínas específicas que podem estar sendo moduladas nestes tratamentos.

Além da inibição do enraizamento promovido pelo TIBA, o PCIB também inibiu esse processo morfogênético em brotações micropropagadas de *C. fissilis*. Resultados semelhantes reportados por Nakhooda et al. (2013) mostram que o PCIB reduz significativamente a taxa de enraizamento em *E. grandis*. Em adição, o uso de PCIB inibiu o crescimento seminal de raízes em *Oryza sativa* (Yin et al., 2011). O enraizamento adventício é um processo complexo necessitando de uma regulação bioquímica e gênica. O conteúdo de auxina e a sensibilidade das células em responder ao hormônio são fatores importantes para desencadear respostas necessárias à formação de raízes adventícias. Uma vez que a auxina é percebida, a expressão gênica é modificada. Os repressores transcricionais Aux/AIA são degradados pela ubiquitina ligase SCF^{TIR1}/AFB, promovida pela auxina deixando livres os ARFs, permitindo assim a transcrição dos genes responsivos a auxina (Calderon Villalobos et al., 2012; Tromas e Perrot-Rechenmann, 2010). Segundo Di et al. (2015), o PCIB tem sido reportado por modular a via de sinalização de auxina e acumular os transcritos de Aux/AIA, inibindo a formação de raízes em *Arabidopsis* (Oono et al., 2003). Dessa forma, sugere-se que brotações de *C. fissilis* quando submetidas a aplicação de PCIB, deixam de responder a auxina pelo acúmulo de Aux/AIA, uma vez que o mesmo pode acumular esses transcritos, e assim inibir o enraizamento. O processo de desenvolvimento de raízes adventícias pode ser dividido em três fases

sucessivas: a) indução, período anterior a qualquer evento histológico; (b) iniciação, onde ocorrem divisões celulares que levam à formação de meristemas radiculares, os quais são caracterizados pela ocorrência de pequenas células com núcleos grandes e citoplasma denso; e c) expressão, observada pelo crescimento interno a partir das células formadas na indução, culminando na emergência do primórdio radicular (Li et al., 2009; Pacurar et al., 2014). De acordo com Pijut et al. (2011), uma etapa suplementar ocorre antes da fase de indução, denominada desdiferenciação, essa etapa é necessária no enraizamento adventício, onde as células existentes no caule se desdiferenciam, adquirindo competência para proliferação celular para então diferenciar e formar as raízes pelas três etapas descritas. Essa aquisição da competência está envolvida com um acúmulo de auxina que desencadeia uma resposta dose-dependente e lenta, ativando os genes PLETHORA necessários para manter a atividade das células-tronco e desencadear a proliferação de células meristemáticas (Aida et al., 2004). Assim, a auxina tem sido vista por ser um hormônio chave durante a fase de indução e desdiferenciação, entretanto inibitória na fase de expressão (De Klerk, 2002).

As fases de indução do enraizamento podem ser determinadas a partir de análises histológicas. Em Brotações mantidas no tratamento controle, durante o enraizamento, as fases deste evento foram caracterizadas (Figura 5), verificando-se no 3º dia regiões com divisões celulares, caracterizando-se em centro meristemático (Figura 5 D), formação de primórdios radiculares no 6º dia (Figura 5 G), e no 10º dia o alongamento radicular (Figura 5 J). Resultados semelhantes foram relatados por Millan-Orozco et al. (2011), que trabalharam com brotações enraizadas *in vitro* de *Cedrela odorata* e por Naija et al. (2008), que trabalharam com enraizamento *in vitro* de *Malus domestica*, na qual verificaram que os primeiros grupos de células meristemáticas e as primeiras divisões mitóticas, respectivamente, surgiram a partir do 3º e 4º dia de indução do enraizamento. Millán-Orozco et al. (2011) também observaram em *C. odorata*, a formação dos primórdios radiculares no 6º dia e, entre o 8º e 12º dia ocorreu a emergência da raiz adventícia formada. Durante a fase de indução, nas primeiras 72 h, ocorre divisão na maioria das células cambiais resultando na formação de células organizadas e em torno de 96 h, ocorre uma ampla divisão dessas células na região do câmbio interfascicular levando a formação de meristemóides para formação de raízes em brotações de *Malus* (De Klerk, 1995). No

presente trabalho, em brotações de *C. fissilis*, observou-se que as divisões celulares ocorreram a partir de células localizadas próximo ao feixe vascular (Figura 5). Resultados similares, verificando as divisões mitóticas em áreas próximas ao feixe vascular também foram observados para algumas espécies arbóreas, tais como *C. odorata*, *M. domestica* e *Populus trichocarpa* (Millan-Orozco et al., 2011; Naija et al., 2008; Rigal et al., 2012). Contrariamente, esses eventos histológicos não foram observados em brotações tratadas com os inibidores (Figura 5 B, C, E, F, H, I, L e M). Em *Persea americana*, o uso de TIBA inibiu a formação do primórdio radicular, entretanto, não inibiu a ativação e desenvolvimento de células cambiais (García-Gómez et al., 1994). Porém, em brotações de *C. fissilis* submetidas ao TIBA não foi observada alteração mitótica nas células localizadas próximas ao feixe vascular para que o desenvolvimento das raízes ocorresse. Por outro lado, Nakhoda et al. (2013) aplicaram TIBA após três dias depois da emergência da raiz em *E. grandis* e a partir de seções histológicas analisadas depois de três semanas da aplicação do TIBA foi verificado modificações no padrão vascular, como o aumento do feixe vascular e perda na organização do córtex da raiz induzida por este inibidor. Adicionalmente, o inibidor PCIB possui efeito inibitório durante a fase de iniciação e também na fase de expressão das raízes em *Populus* (Bellamine et al., 1998), corroborando com os dados obtidos para *C. fissilis*, mostrando que a auxina é um dos fatores essenciais durante as fases do enraizamento.

Durante o enraizamento, além das auxinas, estudos mostram que as PAs também estão envolvidas e podem ser usadas como moléculas marcadoras desse processo (Naija et al., 2009; Neves et al., 2002). Foi mostrado que estas moléculas desempenham papel fundamental na formação de raízes adventícias (Biondi et al., 1990; Heloir et al., 1996) e possivelmente pode existir uma inter-relação entre a auxina e as PAs no controle do enraizamento (Hausman et al., 1995). Analisando-se as PAs individualmente verificou-se um acúmulo de put a partir do 3º dia em brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares submetidas aos inibidores (Figura 7 A) e em brotações oriundas de segmentos nodais apicais no 3º dia de após o tratamento com os inibidores, bem como no 6º e 10º dia tratadas com PCIB (Figura 7 D), quando houve a inibição/redução do enraizamento. Em *Pyrus communis* cultivar Doyenne d'Hiver foi observado que o aumento do nível de put pode estar associada a inibição do enraizamento (Baraldi et al., 1995). Os resultados obtidos por estes autores

corroboram com os resultados obtidos em *C. fissilis* com o uso dos inibidores, ocorrendo maiores conteúdo de put quando ocorre a redução e inibição do enraizamento. Por outro lado, brotações de *C. fissilis* mantidas no tratamento controle, onde observa-se maior enraizamento, verificou-se menor conteúdo desta PA. Contrariamente, estudos mostram que o acúmulo de put está associada a promoção do enraizamento em algumas espécies, tais como *Pinus strobus* (Fei et al., 2016), *Quercus suber*, *Vitis vinifera* (Neves et al., 2002) e *Fraxinus angustifolia* (Tonon et al., 2001). Embora estudos sugerem que o acúmulo de PAs pode estar associado com a promoção do enraizamento e a put com divisão celular durante esse processo (Couée et al., 2004), em *C. fissilis* não foi observada a relação desta PA com o enraizamento, uma vez que houve maior conteúdo de Put em brotações tratadas com os inibidores TIBA e PCB, nas quais observou-se redução significativa no enraizamento, comparativamente ao controle.

O conteúdo de spm diminuiu em brotações mantidas nos tratamentos com inibidores no 3º e 6º dia em relação ao tempo 0 (ou seja, antes do enraizamento) em brotações oriundas de ambos os tipos de explantes (segmentos nodais cotiledonares e apicais). Porém esta PA foi observada em maior conteúdo no 3º e 6º dia em brotações mantidas no tratamento controle, onde ocorre a formação dos centros meristemáticos que evoluem para a formação de raízes nos dias subsequentes (Figura 7). A spm pode estar envolvida com a diferenciação celular durante o enraizamento, e seus altos níveis foram detectados em brotos de *Juglans regia* na fase de indução do enraizamento (Rugini et al., 1993). O aumento da spm geralmente tem sido encontrada durante a progressão do ciclo celular da fase G1 para S em plantas (Fuller et al., 1977). Além disso, ela também está envolvida com o crescimento de tecidos e organogênese (Pérez-Amador et al., 1995). Mas também o aumento endógeno de spm pode induzir a iniciação da raiz. Adicionalmente tem sido relatado que genes que codificam a espermina sintase são fortemente expressos em raízes de *Arabidopsis* (Hanzawa et al., 2002), podendo assim ser a spm uma boa candidata para a regulação do desenvolvimento de raiz. Assim, postula-se que genes codificadores de enzimas relacionados com a biossíntese de spm estejam envolvidos no desenvolvimento da raiz em *C. fissilis*, pois a spm foi encontrada em maior conteúdo em brotações mantidas no tratamento controle, onde há a promoção do enraizamento. Entretanto, sugere-se que análises de atividade enzimática referentes

a biossíntese de PAs durante o enraizamento possa ser realizada futuramente para elucidar melhor o papel das PAs no enraizamento e com a auxina.

Analisando a razão de PAs [$\text{Put}/(\text{Spd}+\text{Spm})$] entre os tratamentos verificou-se que as brotações oriundas de segmentos nodais cotiledonares mantidas no tratamento controle, o qual permitiu o enraizamento, apresentou valores significativamente menores comparativamente às brotações mantidas nos tratamentos com os inibidores, sugerindo que uma redução nesta razão pode estar associada ao enraizamento em *C. fissilis* utilizando este tipo de explante. Por outro lado, em brotações oriundas de segmentos nodais apicais não foi verificada diferenças estatísticas para a razão de PAs entre os tratamentos (Figura 8). Segundo Kuznetsov et al. (2006) o conteúdo de PAs total e os valores da razão entre as PAs variam dependendo da espécie, órgão e tecido vegetal e, também, do estágio de desenvolvimento, conforme verificado em brotações de *C. fissilis*.

No presente estudo foi possível observar que o enraizamento das brotações nesta espécie ocorre sem a necessidade de aplicação de AIB, sendo suficiente a auxina endógena existente em suas brotações. O maior conteúdo de spm em brotações no tratamento controle nos dias de indução e iniciação da raiz (3º dia) em *C. fissilis* pode estar envolvido com a promoção do enraizamento comparativamente com as brotações mantidas nos inibidores. Estes estudos forneceram resultados inéditos e importantes para entender o papel da auxina e das PAs durante o enraizamento em brotações micropropagadas de uma espécie arbórea nativa, de interesse econômico e ecológico. Novos estudos necessitam ser realizados visando entender melhor a relação entre PAs e auxinas no enraizamento adventício para esta espécie.

7- CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- Não há necessidade do AIB para promover a indução de raízes adventícias em brotações oriundas de segmentos nodais apicais e cotiledonares micropropagadas de *C. fissilis*;
- O enraizamento nesta espécie é dependente da auxina endógena existente nas brotações, pois houve inibição do enraizamento na utilização dos inibidores de transporte e sinalização de auxina, e ausência de eventos histológicos relacionados com a formação das raízes adventícias em brotações nestes tratamentos;
- As raízes adventícias em brotações da espécie *C. fissilis* originam-se a partir de células localizadas em torno do feixe vascular;
- Maior conteúdo de spm foi observada no 3º e 6º dia de indução do enraizamento em brotações no tratamento controle, sugerindo o envolvimento desta PA com o processo de desenvolvimento da raiz;
- Maior conteúdo de put foi observado em brotações tratadas com os inibidores TIBA e PCIB, onde houve redução significativa na formação de raízes.

8-REFERÊNCIAS

- Adamowski, M. e Friml, J. (2015). PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *The Plant Cell*, 27(1), 20-32.
- Ahkami, A. H., Melzer, M. e Ghaffari, M. R. (2013). Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta*, 238(3), 499-517.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y. S., Amasino, R. e Scheres, B. (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*, 119(1), 109-120.
- Aragão, V. P. M., Reis, R. S., Silveira, V. e Santa-Catarina, C. (2017). Putrescine promotes changes in the endogenous polyamine levels and proteomic profiles to regulate organogenesis in *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 130(3), 495-505.
- Aragão, V. P. M., Ribeiro, Y. R. d. S., Reis, R. S., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., Silveira, V. e Santa-Catarina, C. (2016). *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124(3), 611-620.
- Arena, M. E., Pastur, G. M., Benavides, M. P., Zappacosta, D., Eliasco, E. e Curvetto, N. (2003). Peroxidase and polyamine activity variation during the *in vitro* rooting of *Berberis buxifolia*. *New Zealand Journal of Botany*, 41(3), 475-485.
- Baltierra, X. C., Montenegro, G., De García, E. (2004). Ontogeny of *in vitro* rooting processes in *Eucalyptus globulus*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40, 499-503.
- Baraldi, P., Bertazza, G., Bregoli, A. M., Fasolo, F., Rotondi, A., Predieri, S., Serafini-Fracassini, D., Slovin, J. P. e Cohen, J. D. (1995). Auxins and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction on microcuttings of two pear cultivars. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14(1), 49-59.
- Barboza, S. B. S. C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J. B., Portes, T. A. e Souza, L. A. C. (2006). Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(2), 185-194.
- Bellamine, J., Penel, C., Greppin, H. e Gaspar, T. (1998). Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation. *Plant Growth Regulation*, 26(3), 191-194.
- Bellini, C., Pacurar, D. I. e Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual review of plant biology*, 65(March), 639-666.
- Berleth, T., Mattsson, J. e Hardtke, C. S. (2000). Vascular continuity and auxin signals. *Trends in Plant Science*, 5(9), 387-393.
- Beruto, M., Viglione, S. e Bisignano, A. (2013). Micropropagation of *Helleborus* through axillary budding. *Methods in Molecular Biology*, 11013, 259-267.

- Biondi, S., Diaz, T., Iglesias, I., Gamberini, G. e Bagni, N. (1990). Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in *Prunus avium* shoot cultures. *Physiologia Plantarum*, 78(3), 474-483.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. e Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140(2), 103-125.
- Brainerd, K. E. e Fuchigami, L. H. (1982). Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, and CO₂. *Journal of Experimental Botany*, 33(3), 388-392.
- Caesar, L. e Adelberg, J. (2015). Using a multifactor approach for improving stage II responses of *Helleborus* hybrids in micropropagation. *Propagation of Ornamental Plants*, 15, 125-135.
- Calderon Villalobos, L. I. A., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L. B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S. e Estelle, M. (2012). A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology*, 8(5), 477-485.
- Carpenter, W. J. e Cornell, J. A. (1992). Auxin application duration and concentration govern rooting of *Hibiscus* stem cuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(1), 68-74.
- Carvalho, P.E.R. (2003). Espécies arbóreas brasileiras: Empresa Brasileira de Pesquisa 41 Agropecuárias. Brasília: Embrapa/SPI, 1040p.
- Carvalho, L.R., Silva, E.A.A. e Davide, A.C. (2006). Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 28(2), pp.15–25.
- Cherobini, E. A. I., Muniz, M. F. B. e Blume, E. (2008). Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. *Ciência Florestal*, 18(1), 65-73.
- Cooper, W. C. (1935). Hormones in relation to root formation on stem cuttings. *Plant Physiology*, 10(4), 789-794.
- Couée, I., Hummel, I., Sulmon, C., Gouesbet, G. e El Amrani, A. (2004). Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(1), 1-10.
- Da Costa, C., De Almeida, M., Ruedell, C., Schwambach, J., Maraschin, F. e Fett-Neto, A. (2013). When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 4, 133-133.
- De Klerk, G.-J. (1995). Hormone requirements during the successive phases of rooting of *Malus* microcuttings. In M. Terzi, R. Cella, & A. Falavigna (Eds.), *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology: Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 22, 111-116.
- De Klerk, G.-J. (2002). Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(5), 415-422.

- De Klerk, G.-J., Brugge, J. T. e Marinova, S. (1997). Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus 'Jork 9'*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49(1), 39-44.
- De Klerk, G.-J., Van der Krieken, W. e De Jong, J. C. (1999). Review the formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35(3), 189-199.
- Deruere, J., Jackson, K., Garbers, C., Soll, D. e Delong, A. (1999). The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity *in vivo*. *The Plant Journal*, 20(4), 389-399.
- Di, D. W., Zhang, C. e Guo, G. Q. (2015). Involvement of secondary messengers and small organic molecules in auxin perception and signaling. *Plant Cell Reports*, 34(6), 895-904.
- Eilb, B., Silva, F., Carvallho, A. (1994) Ensayos de germinacion y analisis cuantitativo en semillas de especies forestales nativas de Misiones. *Yvyrareta*, 5(5), 33-48.
- Fei, Y., Xiao, B., Yang, M., Ding, Q. e Tang, W. (2016). MicroRNAs, polyamines, and the activities antioxidant enzymes are associated with *in vitro* rooting in white pine (*Pinus strobus* L.). *SpringerPlus*, 5(1), 416-416.
- Fermino Júnior, P. C. P., Raposo, A. e Scherwinski-Pereira, J. E. (2011). Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. *Floresta*, 41(1), 79-86.
- Fett-Neto, A. G., Fett, J. P., Veira Goulart, L. W., Pasquali, G., Termignoni, R. R. e Ferreira, A. G. (2001). Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*, 21(7), 457-464.
- Fraga, M. F., Berdasco, M., Diego, L. B., Rodríguez, R. e Cañal, M. J. (2004). Changes in polyamine concentration associated with aging in *Pinus radiata* and *Prunus persica*. *Tree Physiology*, 24(11), 1221-1226.
- Friml, J. v. e Palme, K. (2002). Polar auxin transport -- old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology*, 49(3), 273-284.
- Fukaki, H. e Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 437-449.
- Fuller, D. J., Gerner, E. W. e Russell, D. H. (1977). Polyamine biosynthesis and accumulation during the G1 to S phase transition. *Journal of Cellular Physiology*, 93(1), 81-88.
- Gabryszewska, E. (2015). Effect of different sucrose and nitrogen salt levels in the medium and temperature on *in vitro* propagation of *Helleborus niger* L. . *Acta Agrobotanica*, 68(2), 161-171.
- García-Gómez, M. L., Sánchez-Romero, C., Barceló-Munoz, A., Heredia, A. e Pliego-Alfaro, F. (1994). Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetyl-aspartic acid during adventitious rooting in avocado microcuttings. *Journal of Experimental Botany*, 45(6), 865-870.

- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., Jurgens, G. e Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413(6854), 425-428.
- George, E. F., Hall, M. A. e De Klerk, G.-J. (2007). Plant propagation by tissue culture: volume 1. the background (Vol. 1). Springer Science & Business Media, 477.
- Giri, C. C., Shyamkumar, B. e Anjaneyulu, C. (2004). Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18(2), 115-135.
- Grout, B. W. W. e Aston, M. J. (1978). Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. *Annals of Botany*, 42(4), 993-995.
- Hagen, G. e Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology*, 49(3-4), 373-385.
- Hanzawa, Y., Imai, A., Michael, A. J., Komeda, Y. e Takahashi, T. (2002). Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 527(1), 176-180.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. e Geneve, R. L. (2002). Plant propagation: principles and practices. Prentice Hall, 880.
- Hausman, J.-F., Evers, D., Kevers, C. e Gaspar, T. (1997). Conversion of putrescine to γ -aminobutyric acid, an essential pathway for root formation by poplar shoots *in vitro*. In A. Altman & Y. Waisel (Eds.), *Biology of Root Formation and Development*, 133-139.
- Hausman, J. F., Kevers, C. e Gaspar, T. (1995). Auxin-polyamine interaction in the control of the rooting inductive phase of poplar shoots *in vitro*. *Plant Science*, 110(1), 63-71.
- Hazarika, B. N. (2006). Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108(2), 105-120.
- Heloir, M. C., Kevers, C., Hausman, J. F. e Gaspar, T. (1996). Changes in the concentrations of auxins and polyamines during rooting of *in-vitro*-propagated walnut shoots. *Tree Physiol*, 16(5), 515-519.
- IUCN. (2017). The IUCN Red List of Threatened species. International Union for Conservation of Nature. Disponível em <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em 06 de setembro de 2017.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. e Donoghue, M. J. (1999). Plant systematics: a phylogenetic approach. *Ecologia Mediterranea*, 25(2), 215-215.
- Kakkar, R. K. e Sawhney, V. K. (2002). Polyamine research in plants: a changing perspective. *Physiologia Plantarum*, 116, 281-292.
- Kasthurirengan, S., Xie, L., Li, C. H., Fong, Y. K. e Hong, Y. (2013). *In vitro* propagation and assessment of genetic stability of micropropagated *Samanea saman* (rain tree) using microsatellite markers. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(8), 2467-2474.

- Kevers, C., Hausman, J. F., Faivre-Rampant, O., Evers, D. e Gaspar, T. (1997). Hormonal control of adventitious rooting: progress and questions. *Angewandte Botanik*, 71, 71-79.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Swarup, R., Bennett, M. e Friml, J. (2006). Subcellular Trafficking of the *Arabidopsis* Auxin Influx Carrier AUX1 Uses a Novel Pathway Distinct from PIN1. *The Plant Cell*, 18, 3171-3181.
- Kramer, E. M. e Bennett, M. J. (2006). Auxin transport: a field in flux. *Trends in Plant Science*, 11(8), 382-386.
- Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J. e Zažímalová, E. (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology*, 10(12), 249-249.
- Kusano, Berberich, T., Tateda, C. e Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367-381.
- Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T. e Takahashi, Y. (2007). Advances in polyamine research in 2007. *Journal of Plant Research*, 120(3), 345-350.
- Kuznetsov, V. V., Radyukina, N. L. e Shevyakova, N. I. (2006). Polyamines and stress: Biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(5), 583.
- Li, S.-W., Xue, L., Xu, S., Feng, H. e An, L. (2009). Mediators, Genes and Signaling in Adventitious Rooting. *Botanical Review*, 75(2), 230-247.
- Li, Y.-H., Zou, M.-H., Feng, B.-H., Huang, X., Zhang, Z. e Sun, G.-M. (2012). Molecular cloning and characterization of the genes encoding an auxin efflux carrier and the auxin influx carriers associated with the adventitious root formation in mango (*Mangifera indica* L.) cotyledon segments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 55(Supplement C), 33-42.
- Liscum, E. e Reed, J. W. (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology*, 49(3-4), 387-400.
- Liu, J.-H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y. e Moriguchi, T. (2007). Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology*, 24(1), 117-126.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140(5), 943-950.
- Ludwig-Müller, J., Vertocnik, A. e Town, C. D. (2005). Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 2095-2105.
- Luijten, M. e Heidstra, R. (2009). *Arabidopsis* Root Development. *Annual Plant Reviews*, 37, 1-38.
- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bakó, L., Inzé, D. e Bögre, L. (2005). The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *The Plant Cell*, 17(9), 2527.
- Marco, F., Altabella, T., Alcázar, R., Cuevas, J., Bortolotti, C., González, M. E., Ruiz, O. A., Tiburcio, A. F. e Carrasco, P. (2011). Transcriptome analysis of polyamine overproducers reveals activation of plant stress responses and

- related signalling pathways tolerance in plants. *Bentham Science Publisher*(July 2017), 82-90.
- Martin-Tanguy, J. (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation*, 34(1), 135-148.
- Martins, L. e Lago, A. A. d. (2008). Conservação de semente de *Cedrela fissilis*: teor de água da semente e temperatura do ambiente. *Revista Brasileira de Sementes*, 30(1), 161-167.
- Michniewicz, M., Zago, M. K., Abas, L., Weijers, D., Schweighofer, A., Meskiene, I., Heisler, M. G., Ohno, C., Zhang, J., Huang, F., Schwab, R., Weigel, D., Meyerowitz, E. M., Luschnig, C., Offringa, R. e Friml, J. (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell*, 130(6), 1044-1056.
- Millan-Orozco, L., Corredoira, E. e San Jose Mdel, C. (2011). *In vitro* rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. *Revista Biologia Tropical*, 59(1), 447-453.
- Minocha, R., Minocha, S. C. e Long, S. (2004). Polyamines and Their Biosynthetic Enzymes during Somatic Embryo Development in Red Spruce (*Picea rubens* Sarg.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40(6), 572-580.
- Murashige, T. e Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Naija, Elloumi, N., Ammar, S., Kevers, C. e Dommès, J. (2009). Involvement of polyamines in the adventitious rooting of micropropagated shoots of the apple rootstock MM106. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45(1), 83-91.
- Naija, S., Elloumi, N., Jbir, N., Ammar, S. e Kevers, C. (2008). Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(7), 518-525.
- Naik, D., Vartak, V. e Bhargava, S. (2003). Provenance and subculture dependent variation during micropropagation of *Gmelina arborea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(2), 189-195.
- Nakhooda, M., Watt, M. P. e Mycock, D. (2013). The choice of auxin analogue for *in vitro* root induction influences post-induction root development in *Eucalyptus grandis*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(2), 258-266.
- Neves, C., Santos, H., Vilas-Boas, L. e Amancio, S. (2002). Involvement of free and conjugated polyamines and free amino acids in the adventitious rooting of micropropagated cork oak and grapevine shoots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(12), 1071-1080.
- Nissen, S. e Sutter, E. (1990). Stability of IAA and IBA in Nutrient Medium to Several Tissue Culture Procedures Stability of IAA and IBA in Nutrient Medium to Several Tissue Culture Procedures. *HortScience*, 25(7), 800-802.
- Noor, N. (2000). *In vitro* techniques for multiplication and conservation of *Garcinia mangostana*, *Lansium domesticum* and *Baccaurea polyneura* - Woody tropical fruit species. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 11, 2-4.

- Nunes, C., Castilho, C. V. D., Moreno, N. e Maria, A. (2002). *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70(3), 259-268.
- Oono, Y., Ooura, C., Rahman, A., Aspuria, E. T., Hayashi, K. I., Tanaka, A. e Uchimiya, H. (2003). p- Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* Root. *Plant Physiology*, 133, 1135-1147.
- Overvoorde, P., Fukaki, H. e Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), 1-16.
- Pacurar, D. I., Perrone, I. e Bellini, C. (2014). Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia Plantarum*, 151(1), 83-96.
- Pérez-Amador, M. A., Carbonell, J. e Granell, A. (1995). Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.). *Plant Molecular Biology*, 28(6), 997-1009.
- Perveen, S., Anis, M. e Aref, I. M. (2013). Resource communication. *In vitro* plant regeneration of *Albizia lebbek* (L.) Benth. from seed explants. *Forest Systems*, 22(2), 241-248.
- Phulwaria, M., Rai, M. K., Patel, A. K., Kataria, V. e Shekhawat, N. S. (2013). A genetically stable rooting protocol for propagating a threatened medicinal plant—*Celastrus paniculatus*. *AoB PLANTS*, 5, pls054.
- Phulwaria, M., Shekhawat, N. S., Rathore, J. S. e Singh, R. P. (2013). An efficient *in vitro* regeneration and *ex vitro* rooting of *Ceropegia bulbosa* Roxb.-A threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 25-29.
- Piagnani, C., Zaccheo, P. e Crippa, L. (2012). Micropropagation of service tree (*Sorbus domestica* L.): Role of some factors on *in vitro* proliferation and rooting, and *extra vitro* acclimatization. *Agrochimica*, LVI, 219-233.
- Pieruzzi, F. P., Dias, L. L. C., Balbuena, T. S., Santa-Catarina, C., dos Santos, A. L. W. e Floh, E. I. S. (2011). Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Annals of Botany*, 108(2), 337-345.
- Pijut, P. M., Beasley, R. R., Lawson, S. S., Palla, K. J., Stevens, M. E. e Wang, Y. (2012). *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species - A review (2001-2011). *Propagation of Ornamental Plants*, 12(1), 25-51.
- Pijut, P. M., Woeste, K. E., Michler, C. H., Street, W. S. e Lafayette, W. (2011). Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. *Horticultural Reviews*, 38, 213-251.
- Pop, T. I., Pamfil, D. e Bellini, C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1), 307-316.
- Ranaweera, K. K., Gunasekara, M. T. K. e Eeswara, J. P. (2013). *Ex vitro* rooting: A low cost micropropagation technique for Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz) hybrids. *Scientia Horticulturae*, 155, 8-14.

- Ribas, L. L. F., Zanette, F., Kulchetscki, L. e Guerra, M. P. (2003). Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. *Ciencia Florestal*, 13, 115-122.
- Rigal, A., Yordanov, Y. S., Perrone, I., Karlberg, A., Tisserant, E., Bellini, C., Busov, V. B., Martin, F., Kohler, A., Bhalerao, R. e Legué, V. (2012). The AINTEGUMENTA LIKE1 Homeotic Transcription Factor PtAIL1 Controls the Formation of Adventitious Root Primordia in Poplar. *Plant Physiology*, 160(4), 1996-2006.
- Rugini, E., Jacoboni, A. e Luppino, M. (1993). Role of basal shoot darkening and exogenous putrescine treatments on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species. *Scientia Horticulturae*, 53(1), 63-72.
- Sauer, M., Robert, S. e Kleine-Vehn, J. (2013). Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2565-2577.
- Shukla, S., Shukla, S. K. e Mishra, S. K. (2009). *In vitro* plant regeneration from seedling explants of *Stereospermum personatum* D.C.: a medicinal tree. *Trees*, 23(2), 409-409.
- Silveira, V., Santa-Catarina, C., Tun, N. N., Scherer, G. F. E., Handro, W., Guerra, M. P. e Floh, E. I. S. (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*, 171(1), 91-98.
- Sokal, R. R. e Rohlf, F. J. (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. Freeman and Company, 887.
- Sousa, K. R., Aragão, V. P. M., Reis, R. S., Macedo, A. F., Vieira, H. D., de Souza, C. L. M., Floh, E. I. S., Silveira, V. e Santa-Catarina, C. (2016). Polyamine, amino acid, and carbohydrate profiles during seed storage of threatened woody species of the Brazilian Atlantic Forest may be associated with seed viability maintenance. *Brazilian Journal of Botany*, 39(4), 985-995.
- Souza, A. V. e Pereira A. M. S. (2007). Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 9(4), 103-117.
- Sutter, E. e Langhans, R. W. (1979). Epicuticular wax formation on carnation [*Dianthus caryophyllus*] plantlets regenerated from shoot tip culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104, 493-496.
- Syros, T., Yupsanis, T., Zafiriadis, H. e Economou, A. (2004). Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *Journal of Plant Physiology*, 161(1), 69-77.
- Tang, W. e Newton, R. J. (2005). Polyamines promote root elongation and growth by increasing root cell division in regenerated *Virginia pine* (*Pinus virginiana* Mill.) plantlets. *Plant Cell Reports*, 24(10), 581-589.
- Tonon, G., Kevers, C. e Gaspar, T. (2001). Changes in polyamines, auxins and peroxidase activity during *in vitro* rooting of *Fraxinus angustifolia* shoots: an auxin-independent rooting model. *Tree Physiology*, 21(10), 655-663.

- Tromas, A. e Perrot-Rechenmann, C. (2010). Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus Biologies*, 333(4), 297-306.
- Tyburski, J. e Tretyn, A. (2004). The role of light and polar auxin transport in root regeneration from hypocotyls of tomato seedling cuttings. *Plant Growth Regulation*, 42(1), 39-48.
- Vanneste, S. e Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136(6), 1005-1016.
- Varshney, A. e Anis, M. (2012). Improvement of shoot morphogenesis *in vitro* and assessment of changes of the activity of antioxidant enzymes during acclimation of micropropagated plants of Desert Teak. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(3), 859-867.
- Wang, L. e Ruan, Y. L. (2013). Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Frontiers in Plant Science*, 4(May), 163-163.
- Wilson, P. (1994). The concept of a limiting rooting morphogen in woody stem cuttings. *Journal of Horticultural Science*, 69(4), 591-600.
- Woodward, A. W. e Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707-735.
- Yan, H., Liang, C., Yang, L. e Li, Y. (2010). *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(1), 115-120.
- Yin, C., Wu, Q., Zeng, H., Xia, K., Xu, J. e Li, R. (2011). Endogenous auxin is required but supraoptimal for rapid growth of rice (*Oryza sativa* L.) seminal roots, and auxin inhibition of rice seminal root growth is not caused by ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30(1), 20-29.