

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DURANTE A GERMINAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES *IN VITRO* EM
Cedrela fissilis Vell. (MELIACEAE)

VICTOR PAULO MESQUITA ARAGÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL - 2013

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 037/2013

Aragão, Victor Paulo Mesquita

Alterações bioquímicas durante a germinação e desenvolvimento de brotações *in vitro* em *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) / Victor Paulo Mesquita Aragão. – 2013.

106 f. : il.

Orientador: Claudete Santa Catarina.

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Bibliografia: f. 93 – 106.

1. Biotecnologia 2. Organogênese 3. Aminoácidos 4. Carboidratos 5. Poliaminas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 634.9756

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DURANTE A GERMINAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES *IN VITRO* EM
Cedrela fissilis Vell. (MELIACEAE)

VICTOR PAULO MESQUITA ARAGÃO

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

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL - 2013

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DURANTE A GERMINAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES *IN VITRO* EM
Cedrela fissilis Vell. (MELIACEAE)

VICTOR PAULO MESQUITA ARAGÃO

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

Aprovada em 02 de Abril de 2013.

Comissão Examinadora:

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

Prof^a. Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) - UENF

Prof^o. Leonardo Lucas Carnevalli Dias (D.Sc., Biotecnologia) - UFSJ

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

Ao Senhor meu Deus que está sempre comigo e nunca me desampara;
A minha mãe avó Rita “Dona Ritinha” a quem tanto amo;
A minha tia Antônia de Maria minha inspiração de vida;
A minha querida mãe Rita Luzie minha guerreira.

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Claudete Santa Catarina, pela orientação, confiança, ensinamentos e por acreditar em mim como ser humano e profissional. Agradeço também por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho e por confiar no meu trabalho;

Ao professor Vanildo Silveira pelos ensinamentos e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

À professora Eny lochevet Segal Floh do Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BioCel-USP) por abrir as portas de seu laboratório para que parte deste trabalho pudesse ser realizada;

À técnica Amanda Macedo (BioCel-USP) por toda ajuda e paciência durante as análises bioquímicas;

A todos os amigos do grupo de pesquisa em Biotecnologia Vegetal do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – LBCT e Laboratório de Biotecnologia – LBT sem os quais este trabalho não poderia ter sido concluído. Meu respeito e admiração a todos vocês;

À amiga Ellen de Moura Vale pela grande ajuda nas análises estatísticas;

À amiga Kariane Rodrigues de Sousa pela amizade e coragem em seguir comigo nesta caminhada;

À minha querida e amada avó Rita, cujo amor que sinto não sei descrever, pois é

imensidão. Obrigado pelo amor, ensinamentos, paciência e dedicação de uma vida inteira;

À minha amada tia Antônia de Maria, cujo exemplo de vida eu sigo. É minha inspiração para os momentos difíceis e meu refúgio;

À minha mãe Rita Luzie por todos os cuidados, por me amparar e me amar sempre;

Ao meu padrasto Sergio Cunha, que foi fundamental para que eu pudesse seguir com os meus sonhos;

À minha pequena Rosyane, por ser motivo de eu nunca pensar em desistir, de ser um dos amores mais verdadeiros que já senti. Titio te ama;

A UENF, pela oportunidade de acesso a pós-graduação;

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Senhor meu Deus que em tudo me sustenta e me fortalece. É meu senhor a quem sempre peço e agradeço. É o Deus que sempre me escuta e vê minhas lágrimas, me consola e mostra um novo dia, um amanhecer de vida sempre ao meu despertar. Muito obrigado meu Deus!

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Mata Atlântica.....	5
2.2. Espécie de estudo.....	8
2.3. Germinação de sementes	10
2.4. Micropropagação.....	11
2.5. Alterações bioquímicas durante a germinação e desenvolvimento de brotações <i>in vitro</i>	13
2.5.1. Aminoácidos	13
2.5.2. Carboidratos	14
2.5.3. Poliaminas	17
3. TRABALHOS.....	20
3.1. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS, CARBOIDRATOS E POLIAMINAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (MELIACEAE).....	20
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25

2.1. Material vegetal	25
2.2. Assepsia das sementes.....	25
2.3. Curva de embebição	25
2.4. Germinação de sementes	25
2.5. Análises bioquímicas.....	26
2.5.1. Aminoácidos livres e proteínas solúveis em etanol	26
2.5.2. Carboidratos	27
2.5.3. Poliaminas	28
2.6. Análise estatística	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. Curva de embebição	29
3.2. Perfil bioquímico.....	31
3.2.1. Aminoácidos livres e proteínas.....	31
3.2.2. Carboidratos	40
3.2.3. Poliaminas	43
4. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
3.2. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS E POLIAMINAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES <i>IN VITRO</i> DE <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (MELIACEAE).....	55
RESUMO	55
ABSTRACT	56
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAIS E MÉTODOS	60
2.1. Material vegetal	60
2.2. Indução de brotações.....	61
2.3. Análises bioquímicas.....	63
2.3.1. Carboidratos	63
2.3.2. Poliaminas	63
2.4. Análise estatística	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1. Indução de brotações.....	63
3.2. Perfil bioquímico.....	68
3.2.1. Carboidratos	68
3.2.2. Poliaminas	75

4. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
4. RESUMOS E CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

RESUMO

ARAGÃO, Victor Paulo Mesquita. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2013. Alterações bioquímicas durante a germinação e desenvolvimento de brotações *in vitro* em *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). Orientadora: Dr^a. Claudete Santa Catarina.

O objetivo deste trabalho foi estudar os níveis e mobilização de aminoácidos, carboidratos e poliaminas (PAs) durante a germinação de sementes e desenvolvimento de brotações *in vitro* em *Cedrela fissilis*. Sementes foram germinadas em placas de Petri sob condições controladas. Amostras para determinação da curva de embebição e análises bioquímicas foram coletadas antes da incubação (tempo 0) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de embebição. Para a organogênese, explantes nodais apicais e nodais cotiledonares obtidos de plântulas germinadas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) na ausência (0 μM - controle) e presença (2,5 μM) de 6-benziladenina (BA). Amostras para as análises bioquímicas foram coletadas antes da inoculação (tempo 0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de incubação. Aos 30 dias foram analisados o crescimento por meio da taxa de indução (%), número e comprimento das brotações. Os conteúdos de aminoácidos, carboidratos e PAs foram determinados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Durante a germinação, verificou-se que sementes de *C. fissilis* apresentaram um

modelo trifásico de absorção de água. Verificaram-se alterações no conteúdo e tipo de aminoácidos, carboidratos, PAs e no conteúdo de proteínas durante as diferentes fases da germinação, demonstrando o envolvimento destas biomoléculas neste processo. O conteúdo de aminoácidos aumentou enquanto proteínas diminuíram durante o evento germinativo, sendo a treonina observada em maior quantidade. As concentrações de carboidratos diminuíram durante o processo germinativo, sendo a sacarose predominante durante todo o evento. Não foi observado monossacarídeos no processo germinativo, enquanto na plântula, no 17º dia, verificou-se frutose, glicose e sacarose, sendo estes em maior concentração na parte aérea comparativamente à radicular. As concentrações de PAs totais decresceram durante todo o evento germinativo, sendo a espermidina (Spd) encontrada em maior concentração. Nas plântulas, no 17º dia, foi observado um aumento significativo de putrescina (Put) e Spd e um decréscimo acentuado de espermina (Spm) na parte aérea. Na organogênese, explantes nodais apical e cotiledonar mostraram uma alta taxa de indução de brotações *in vitro*, com valores superiores a 94%. Maior número de brotos por explantes foi obtido nos tratamentos com BA para ambos os explantes, enquanto segmentos nodais cotiledonares incubados com BA apresentaram maior comprimento das brotações. Foram detectados frutose, glicose e sacarose durante toda a condução do experimento para todos os tratamentos. Durante o desenvolvimento de brotações frutose e glicose exibiram um perfil similar. Observou-se redução na concentração de sacarose ao final do cultivo parecendo ser um carboidrato essencialmente fornecedor de frutose e glicose necessárias a indução e crescimento das brotações. Verificou-se uma variação no conteúdo de Put, Spd e Spm nos diferentes tempos e tratamentos, sendo a Put observada em maior concentração. A razão e o conteúdo de PAs totais aumentaram no final do cultivo, indicando uma maior participação de PAs neste estágio de desenvolvimento.

Palavras-chave: biotecnologia, organogênese, aminoácidos, carboidratos, poliaminas.

ABSTRACT

ARAGÃO, Victor Paulo Mesquita. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2013. Biochemical changes during germination and development of shoots *in vitro* in *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) Advisor: Dr^a. Claudete Santa Catarina.

The objective of this work was to study the levels and the mobilization of amino acids, carbohydrates and polyamines (PAs) during seed germination and *in vitro* shoot development in *Cedrela fissilis*. Seeds were germinated in Petri dishes under controlled conditions. Samples to determine the imbibition curve and biochemical analyses were collected before incubation (time 0) and after 2, 5, 7, 10 and 17 days of imbibition. For the organogenesis, apical nodal explants and cotyledonary nodal ones, obtained from *in vitro* germinated seedlings were inoculated in MS culture medium in the absence (0 μM - control) and presence (2.5 μM) of 6-benzyladenine (BA). Samples for biochemical analysis were collected before inoculation (time 0) and after 3, 6, 10, 20 and 30 days of incubation. At 30 days, the growth rate (%), number and length of shoots were analyzed. The content of amino acids, carbohydrates and PAs were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). During the germination period, seeds of *C. fissilis* presented a triphasic pattern of water absorption. There were changes in the content and type of amino acids, of carbohydrates, of PAs and in the protein content during the different stages of germination, which suggests the

involvement of these biomolecules in this process. The amino acid content increased while the amount of proteins decreased during the germination event, being threonine observed in a higher quantity. The carbohydrate concentrations decreased during the germination process, being sucrose predominant during the event. Monosaccharides were not observed during the germination process; in the seedlings, at the 17th day, fructose, glucose and sucrose were found, which were more concentrated in the plant stem than in the roots. Concentrations of total PAs decreased during the germination event, being spermidine (Spd) found in higher concentrations. In seedlings, at the 17th day, there was a significant increase of putrescine (Put) and Spd and a marked decrease of spermine (Spm) in the plant stem. In organogenesis, apical and cotyledonary nodal explants showed a high rate of *in vitro* shooting induction, with amounts greater than 94%. A higher number of shoots/explant was obtained in treatments with BA in both explants, while cotyledonary nodal segments incubated with BA showed greater length in shoots. Fructose, glucose and sucrose were detected during all the days of cultivation for all treatments. Fructose and glucose showed a similar profile during development of shoot. Sucrose decreased its concentration at the end of cultivation, appearing to be essentially a carbohydrate supplier of fructose and glucose needed for induction and growth of shoot. There was a variation of contents of Put, Spd and Spm at different times and treatments, being Put the one observed in higher concentration. The ratio and content of total PAs increased at the end of cultivation, indicating greater participation of these PAs in this stage of development.

Keyword: biotechnology, organogenesis, amino acids, carbohydrates, polyamines.

1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica, localizada na Costa Atlântica desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (Peixoto et al., 2004) apresenta grandes variações no relevo, regime de chuvas e unidades fitogeográficas, as quais contribuem para sua grande biodiversidade (Pinto et al., 1997; Oliveira-Filho e Fontes, 2000). Vários fatores como processos de devastação causados pela ocupação territorial e exploração desordenada dos recursos naturais contribuíram para que a Mata Atlântica se tornasse um dos ecossistemas com maiores riscos de extinção do mundo (Dean, 1996; Myers et al., 2000; Pinto et al., 2006). O pouco conhecimento acerca da biodiversidade biológica deste bioma representa um dos obstáculos para sua preservação, sendo fundamental seu estudo, em especial das espécies vegetais que encontram-se em risco de extinção.

Várias são as espécies vegetais ameaçadas de extinção, destacando-se as espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica como *Cedrela fissilis*. Esta espécie, conhecida popularmente como cedro rosa, pertence à família Meliaceae, possui uma altura de 10 a 25 metros quando adulta, madeira variando de leve a moderadamente densa, sendo uma planta decídua, heliófita no estágio adulto e esciófita no estágio juvenil de ocorrência principalmente em solos úmidos e profundos (Carvalho, 2003). *C. fissilis* apresenta fruto com cápsula piriforme deiscente, e as sementes são classificadas como ortodoxas, porém estas perdem

gradativamente a viabilidade em condições ambientais de baixa umidade (Carvalho, 2003). Devido à ação antrópica, principalmente por causa da exploração da madeira, a espécie encontra-se ameaçada de extinção na categoria em perigo (IUCN, 2010).

A germinação da semente é um passo crucial para a vida da planta, pois este processo de propagação possibilita a manutenção da diversidade genética das populações (Rojas-Aréchiga e Vásquez-Yanes, 2000), permitindo a seleção de genótipos superiores que possam ser usados em programas de melhoramento para fins comerciais e também para a produção de mudas para reflorestamento de áreas degradadas. Por *C. fissilis* encontra-se ameaçada de extinção, é importante a compreensão dos requisitos básicos necessários para sua germinação. Assim, o estudo da germinação no sentido de identificar fatores que afetam o desenvolvimento inicial do embrião e que identifiquem fatores bioquímicos ligados à promoção da germinação pode ser uma via alternativa eficaz na propagação de *C. fissilis*, pois poucos são os estudos no sentido de identificar compostos diretamente relacionados à promoção da germinação, principalmente em arbóreas.

Outra forma de propagação para a espécie pode ser por micropropagação, uma técnica da cultura de tecidos que vem sendo amplamente empregada na produção comercial de plantas. Esta técnica torna-se importante para a conservação de espécies ameaçadas, pois permite a propagação em larga escala, em especial as de interesse econômico. Portanto, pode ser uma via alternativa para produção de mudas de espécies arbóreas ameaçadas ou que naturalmente tenham dificuldades de estabelecimento por via seminífera ou propagação vegetativa convencional. É sabido que os processos de regulação dos estágios iniciais da organogênese são comandados por eventos que envolvem a sinalização celular (Duclerq et al., 2011). Estes eventos são influenciados pelo tipo de explante, fatores bioquímicos, como os hormônios, dentre outros (Sangwan et al., 1997; Kalani et al., 2009). Entretanto, os mecanismos envolvidos na capacidade que as células vegetais têm de regeneração *in vitro* e que levam a formação de uma nova planta ainda não são totalmente conhecidos, sendo necessários estudos para identificação de

compostos, como carboidratos e poliaminas (PAs), diretamente relacionados à promoção do desenvolvimento das brotações. Neste sentido, estes estudos podem ser importantes no estabelecimento ou otimização de protocolos de regeneração *in vitro*.

O envolvimento de biomoléculas como aminoácidos, carboidratos e PAs durante a germinação de sementes e desenvolvimento de brotações *in vitro*, durante a micropropagação, ainda é pouco investigado em arbóreas. Os níveis e mobilização destas biomoléculas são variados durante estes processos (Santa-Catarina et al., 2006; Corte et al., 2006; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011).

Os aminoácidos são fontes de nitrogênio para a planta em formação, e apresentam níveis variados ao longo do desenvolvimento embrionário (Santa-Catarina et al., 2006). Os carboidratos são uma das principais substâncias de reserva nas sementes, sendo mobilizados durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas (Corte et al., 2006). Durante o processo de micropropagação eles também são mobilizados para a formação de novos brotos, pois são fonte de energia para os processos metabólicos. Durante o desenvolvimento embrionário e a germinação de sementes os níveis de PAs têm sido relatados como importantes nestes processos morfogenéticos (Silveira et al., 2004; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011). Estas moléculas parecem ser reguladas por processos análogos aos dos reguladores de crescimento vegetal (Handa e Mattoo, 2010), sendo seu metabolismo ainda pouco estudado em arbóreas. Na morfogênese *in vitro*, o balanço entre os níveis de PAs parece ser importante no sentido de promover o desenvolvimento de brotações (Francisco et al., 2008).

Desta forma, o estudo destes compostos é importante, podendo fornecer informações relevantes a cerca de suas funções tanto no evento germinativo quanto nos eventos morfogenéticos que levam a formação de novos brotos.

O conhecimento acerca dos processos fisiológicos e bioquímicos durante o evento germinativo é indispensável no sentido de identificar fatores que afetam diretamente o desenvolvimento inicial do embrião. Também, a utilização de técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, pelo método de micropropagação como ferramenta para identificar fatores bioquímicos ligados à

promoção da regeneração *in vitro*, pode ser uma via alternativa eficaz na propagação de *C. fissilis*. Estes estudos são importantes para a conservação de plantas com potencial econômico, podendo também, ser aplicados na produção de mudas para programas de reflorestamento e restauração de áreas degradadas, bem como em programas de conservação de germoplasma de espécies arbóreas.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar os níveis de aminoácidos, carboidratos, PAs e proteínas durante a germinação e de carboidratos e PAs durante o desenvolvimento de brotações *in vitro* em *C. fissilis*, visando o entendimento da composição e mobilização destas biomoléculas envolvidas nestes processos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mata Atlântica

Os ecossistemas terrestres, principalmente as florestas tropicais, possuem uma alta biodiversidade, que tem sido ameaçada principalmente pelo desmatamento, levando a perda de habitats e fragmentação de seus territórios (Mittermeier et al., 2005). Dentre os biomas mais ameaçados de extinção encontra-se a Mata Atlântica, na qual a maioria de seus ecossistemas encontra-se em remanescentes pequenos com fortes alterações na sua vegetação (Fonseca et al., 2005; Mittermeier et al., 2005). Devido a sua riqueza biológica, endemismo, intensa degradação ambiental e níveis de ameaça, a Mata Atlântica foi apontada como um dos *hotspots* mundiais (Fig.1), ou seja, uma das prioridades para a conservação da biodiversidade em todo o mundo (Myers et al., 2000).

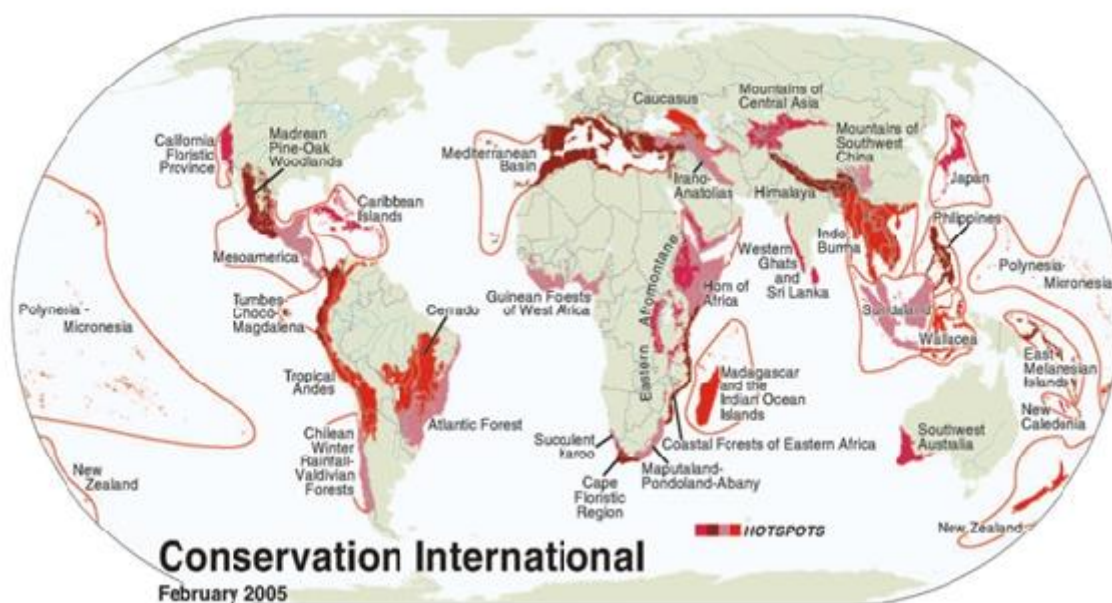


Figura 1: Mapa da localização dos 34 hotspots ambientais. Fonte: International Union for Conservation of Nature. Acesso em 16 de março de 2012.

As estimativas indicam que este bioma possui, aproximadamente 20.000 espécies de plantas vasculares, e destas, estima-se que aproximadamente 6.000 sejam endêmicas (SOS Mata Atlântica, 2009), sendo apontada como uma das florestas com os maiores índices de riqueza de plantas arbóreas do mundo (Thomas et al., 1998). Sua área de cobertura inclui em seu domínio a Floresta Ombrófila Densa (FOD), Floresta Ombrófila Mista (FOM), Floresta Ombrófila Aberta (FOA), Floresta Estacional Semidecidual (FES), Floresta Estacional Decidual (FED) dentre outras feições (Fundação SOS Mata Atlântica, 2010). Atualmente, restam apenas 7,9 % de remanescentes florestais acima de 100 hectares. Somados, todos os 232.939 fragmentos de floresta nativa acima de três hectares totalizam 11,4 % do bioma original, ou 147.018 km² (Fig. 2) (Fundação SOS Mata Atlântica, 2010).

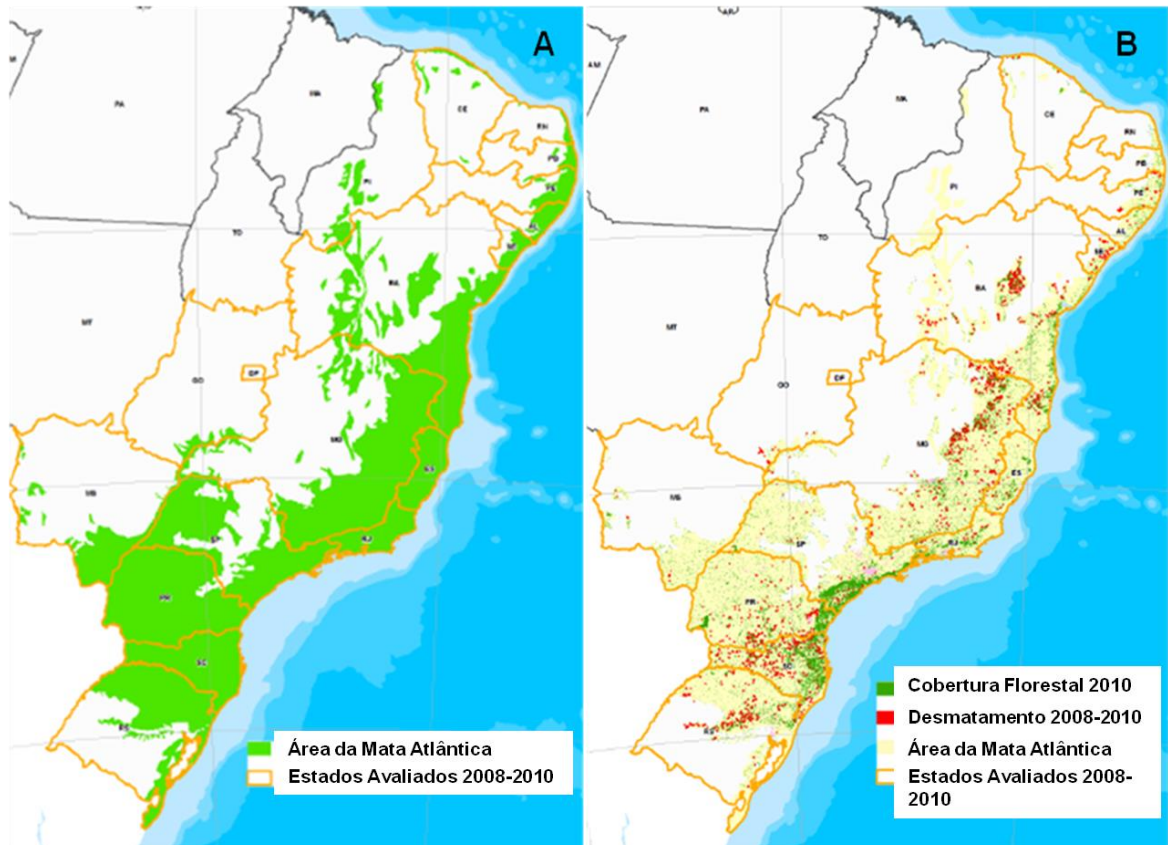


Figura 2: Mapas do domínio da Mata Atlântica mostrando a cobertura florestal original (A) e a cobertura florestal em 2010 (B). Adaptado de Atlas dos remanescentes da Mata Atlântica período 2008-2010. Fonte: SOS Mata Atlântica (2010).

No Estado do Rio de Janeiro, a Mata Atlântica exhibe as fisionomias vegetais originais de FOD, FES, formações pioneiras e áreas de contato (SOS Mata Atlântica, 2012). No passado, a Mata Atlântica cobria 100 % da área do Estado do Rio de Janeiro, atualmente encontra-se restrita a menos de 20 % (SOS Mata Atlântica, 2011). Na região Centro-Norte Fluminense durante séculos a Mata Atlântica sofreu perturbações em seu domínio natural, sendo estas, intensificadas nas últimas décadas, através da extração madeireira ou da substituição de suas florestas por áreas agrícolas (Dean, 1996; Vilela et al., 2006).

Aliados aos fatores antrópicos, a falta de conhecimento sobre a biologia reprodutiva e fisiologia do desenvolvimento, a floração esporádica e a baixa viabilidade das sementes de algumas espécies, representam obstáculos para a regeneração natural e produção de mudas para programas de reflorestamento

neste bioma. O crescimento lento de várias espécies nativas brasileiras é outro fator limitante à propagação comercial em viveiros (Carvalho, 1998). Assim, programas de conservação têm sido estabelecidos para um número reduzido de espécies nativas.

2.2. Espécie de estudo

A espécie *C. fissilis*, conhecida popularmente pelo nome de cedro rosa, é uma arbórea nativa da Mata Atlântica pertencente à família Meliaceae. Segundo Carvalho (2003), a espécie ocorre do Rio Grande do Sul até Minas Gerais, estando presente com mais frequência na FOD Submontana (Floresta Atlântica), nas formações Montana e Submontana e FOD (Floresta Amazônica), porém ocorre em menor intensidade em todas as regiões do país (Fig. 3).

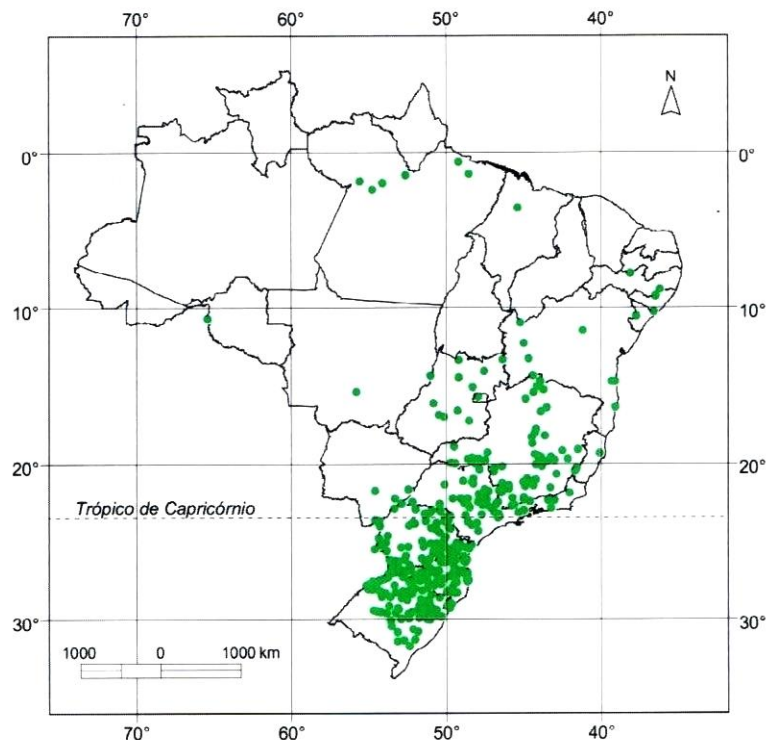


Figura 3: Mapa da distribuição de *C. fissilis* no Brasil. Os pontos verdes indicam os locais de ocorrência natural de *C. fissilis*. Fonte: Carvalho (2003).

C. fissilis inicia seu processo reprodutivo entre dez e quinze anos de idade, e o florescimento acontece normalmente entre os meses de agosto e setembro. O amadurecimento dos frutos ocorre entre abril e agosto na maioria dos estados de ocorrência, e a dispersão de suas sementes se dá pela queda no solo, dentro do fruto ou pela ação dispersante do vento (Carvalho, 2003). As sementes exibem poder germinativo de 35 % a 95 % com média de 60 %, sendo estas ortodoxas, porém perdem gradativamente a viabilidade em condições ambientais de baixa umidade (Carvalho, 2003). Este fato contribui para a diminuição da taxa de regeneração natural e perda na viabilidade de sementes usadas em programas de reflorestamento. Estudos com sementes de cedro rosa demonstram que, quando armazenadas em condições não controladas, perdem gradativamente a viabilidade e sugerem que a perda de sua viabilidade pode estar diretamente associada a condições de umidade, temperatura e ataque de patógenos (Amaral e Nakagawa, 1989; Martins e Lago, 2008; Cherobini et al., 2008). Tais condições podem interferir em processos bioquímicos diretamente envolvidos na germinação (Martins e Lago, 2008).

Dentre as espécies florestais, *C. fissilis* é uma espécie fornecedora de madeira nobre, estando entre as mais exportadas no Brasil na década de 70 (Bruce, 1976). Entre outras utilidades, a espécie é usada para a fabricação de móveis e na construção civil em geral (Carvalho, 2003). Além disso, é produtora de óleo essencial com propriedades inseticidas e bactericidas (Carvalho, 1998; Lago et al., 2004), sendo sua casca usada na medicina popular. A árvore é bastante recomendada para programas de reflorestamento ambiental em sua área de ocorrência natural (Martins e Lago, 2005).

Um dos problemas na cultura de cedro rosa é o ataque de *Hypsipyla grandella*, conhecida como broca do cedro. Este inseto ataca suas gemas apicais por meio de perfurações feitas por suas larvas, quebrando a dominância apical, implicando no desenvolvimento de plantas jovens com muitos ramos laterais deformados, o que prejudica o estabelecimento da planta no campo, podendo levar o indivíduo a morte (Carvalho, 1998). Como estratégia natural de defesa, a espécie não ocorre em formações homogêneas na mata (Fligliolia et al., 1988), ficando geralmente restrita a uma média de um a sete indivíduos por ha nas

florestas do Sul do Brasil (Carvalho, 2003). Deste modo, *C. fissilis* ocorre em formações heterogêneas com uma baixa densidade populacional nos remanescentes naturais, o que contribui para o desaparecimento rápido de indivíduos adultos devido à ação antrópica.

Devido à sua importância econômica, a espécie encontra-se em risco de extinção na categoria em perigo, caracterizada por espécies que sofreram redução de 50 % de indivíduos adultos nos últimos dez anos ou que esta redução está projetada para os próximos dez anos (IUCN, 2010).

2.3. Germinação de sementes

A germinação da semente é uma etapa fundamental no ciclo de vida da planta, que se inicia com a absorção de água pela semente quiescente e termina com a protrusão da radícula e o alongamento do eixo embrionário (Bewley, 1997).

Durante o processo germinativo ocorrem vários eventos importantes, como embebição, reativação do metabolismo, aumento na atividade respiratória, enzimática, reparo de organelas, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, hidratação das proteínas, mudanças estruturais e alongamento celular, que de modo integrado transformam a semente com baixo teor de água e metabolismo reduzido em uma semente com metabolismo vigoroso, culminando no crescimento do embrião (Bewley e Black, 1994). Desta forma, uma série de eventos físicos, fisiológicos, bioquímicos e morfológicos ocorre no sentido de desenvolver o embrião em uma plântula (Borghetti, 2004; Ferreira e Borghetti, 2004; Marcos-filho, 2005).

Estudos destes eventos fisiológicos e bioquímicos durante a germinação podem ser efetivamente um ponto de partida para a utilização e exploração de forma racional das espécies nativas, especialmente aquelas ameaçadas de extinção, pois a bioquímica e fisiologia da reprodução ainda são processos pouco conhecidos para a maioria destas espécies.

Vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de identificar os componentes bioquímicos e moleculares durante a germinação de sementes de espécies arbóreas nativas, especialmente associados com os níveis de PAs, aminoácidos, ácido abscísico e auxinas (Astarita et al., 2003a,b; Silveira et al.,

2004a,b; Santa-Catarina et al., 2006; Balbuena et al., 2009; Cangahuala-Inocente et al., 2009; Dias et al., 2009, 2010; Pieruzzi et al., 2011). Estes estudos mostram a participação destes compostos em várias etapas durante o desenvolvimento e germinação de sementes. Entretanto, não há relatos até o momento de estudos dos aspectos bioquímicos destes compostos durante a germinação de sementes em *C. fissilis*.

2.4. Micropropagação

A cultura de tecidos consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais em meio nutritivo apropriado e em condições assépticas e ambientais controladas, permitindo a obtenção de um grande número de plantas em pouco tempo e área reduzida, além de proporcionar plantas livres de doenças (Paiva e Gomes, 1995; Sá, 2001). Na cultura de tecidos são cultivadas pequenas partes de tecidos vegetais, chamados explantes. Estes são isolados, desinfestados e colocados em condições assépticas e controladas para a promoção do desenvolvimento de calos, brotações dentre outros, que levarão a formação de plantas completas, geneticamente idênticas à planta doadora (Torres et al., 2000). Neste contexto, a cultura de tecidos é uma técnica com grande aplicação prática para a produção de mudas de espécies florestais, tanto de interesse econômico como ecológico.

Dentre as técnicas utilizadas na cultura de tecidos destaca-se a micropropagação como a mais popular e com aplicações práticas comprovadas (Leon, 2010). Esta técnica vem sendo amplamente empregada na produção comercial de plantas, permitindo a propagação em larga escala de espécies, em especial aquelas de interesse econômico. Ela também possibilita a rápida propagação clonal de árvores selecionadas que podem ser utilizadas para a conservação de germoplasma e produção massal de mudas para fins ambientais. A micropropagação é uma importante ferramenta por oferecer vantagens sobre os métodos tradicionais de propagação vegetativa, tais como estaquia, proporcionando redução de custos e produção de plantas livres de doenças e ao longo de todo o ano (Santana e Crepaldi, 1998; George, 2008).

A organogênese é uma via de regeneração muito utilizada na micropropagação. É o processo pelo qual as células somáticas ou gemas axilares pré-formadas são induzidas a sofrerem mudanças que levarão à formação de novas brotações e raízes que culminará no estabelecimento de uma nova planta (Thorpe, 1994). Esta via de regeneração explora a competência celular das células vegetais, que é o potencial que uma determinada célula tem de se desenvolver em um tecido ou órgão particular. Este processo requer meio e condições de cultivo ideais, bem como exposição a sinais endógenos ou exógenos (Xavier et al., 2009). Porém, os mecanismos envolvidos na capacidade que as células vegetais têm de regeneração *in vitro* ainda não são totalmente conhecidos.

O processo de organogênese *in vitro* é complexo, pois envolve múltiplas interações entre vários fatores, como a fonte de explante, meio de cultura e condições de cultivo (George, 2008). Segundo Duclercq et al. (2011), os processos de regulação dos estádios iniciais da organogênese são comandados por eventos que envolvem a sinalização celular, ocorrendo mudanças nas substâncias associadas à sinalização e atividades de genes reguladores durante a formação de brotos. Tradicionalmente, o desenvolvimento de brotações é induzido utilizando-se meio de cultura enriquecido com citocininas, combinadas ou não com outros compostos, como auxinas e giberelinas (Nicioli et al., 2008).

Estudos iniciais mostraram o desenvolvimento de eficientes protocolos de micropropagação *in vitro* para *C. fissilis* usando explantes de origem caulinar (Nunes et al., 2002; Amaral., 2006), bem como por meio da embriogênese somática (Vila et al., 2009). Entretanto, estudos bioquímicos que identifiquem os níveis endógenos de biomoléculas, como carboidratos e PAs, envolvidas no desenvolvimento de brotações para esta espécie ainda não estão descritos na literatura. Tais estudos podem levar a compreensão dos mecanismos de formação das novas brotações, melhorando a taxa de indução de brotações e aumentando a eficiência dos protocolos de regeneração para a espécie.

2.5. Alterações bioquímicas durante a germinação e desenvolvimento de brotações *in vitro*

Durante a germinação de sementes e desenvolvimento de brotações *in vitro*, vários são os compostos que apresentam funções importantes, como aminoácidos, carboidratos e PAs. Entretanto, o papel destes compostos durante estes eventos morfogênicos ainda não está completamente elucidado, e foi realizado para um número reduzido de espécies.

2.5.1. Aminoácidos

Os aminoácidos são moléculas essenciais para o desenvolvimento das plantas, sendo as biomoléculas base para a síntese de proteínas, além de servir como fonte de nitrogênio orgânico para a síntese de uma grande variedade de compostos, como, nucleotídeos, clorofila, hormônios e metabólitos secundários (Tegeder, 2012).

A grande maioria das plantas consegue sintetizar todos os 20 aminoácidos proteicos, sendo eles derivados de intermediários da glicólise (serina, glicina, cisteína, alanina, valina, leucina e isoleucina), do ciclo do ácido cítrico (aspartato, metionina, treonina, lisina, glutamina, prolina e arginina) e da via das pentoses fosfato (histidina, triptofano, fenilalanina e tirosina) (Lehninger e Cox, 2011) (Fig. 4).

Logo após a síntese, os aminoácidos podem ser rapidamente usados no metabolismo da planta, momentaneamente armazenados, ou ainda transportados via floema para pontos onde serão utilizados para o crescimento e desenvolvimento dos tecidos vegetativos ou reprodutivos (Tegeder, 2012). Assim, os aminoácidos armazenados durante o desenvolvimento da semente são utilizados no processo de germinação, servindo como nutrientes e substrato para o desenvolvimento inicial da plântula até o autotrofismo (Santa-Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009). Alguns estudos com espécies arbóreas mostram que os níveis endógenos de aminoácidos sofrem variações ao longo do processo de desenvolvimento embrionário e germinativo (Santa-Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011), sugerindo que estas biomoléculas estão associadas aos eventos germinativos.

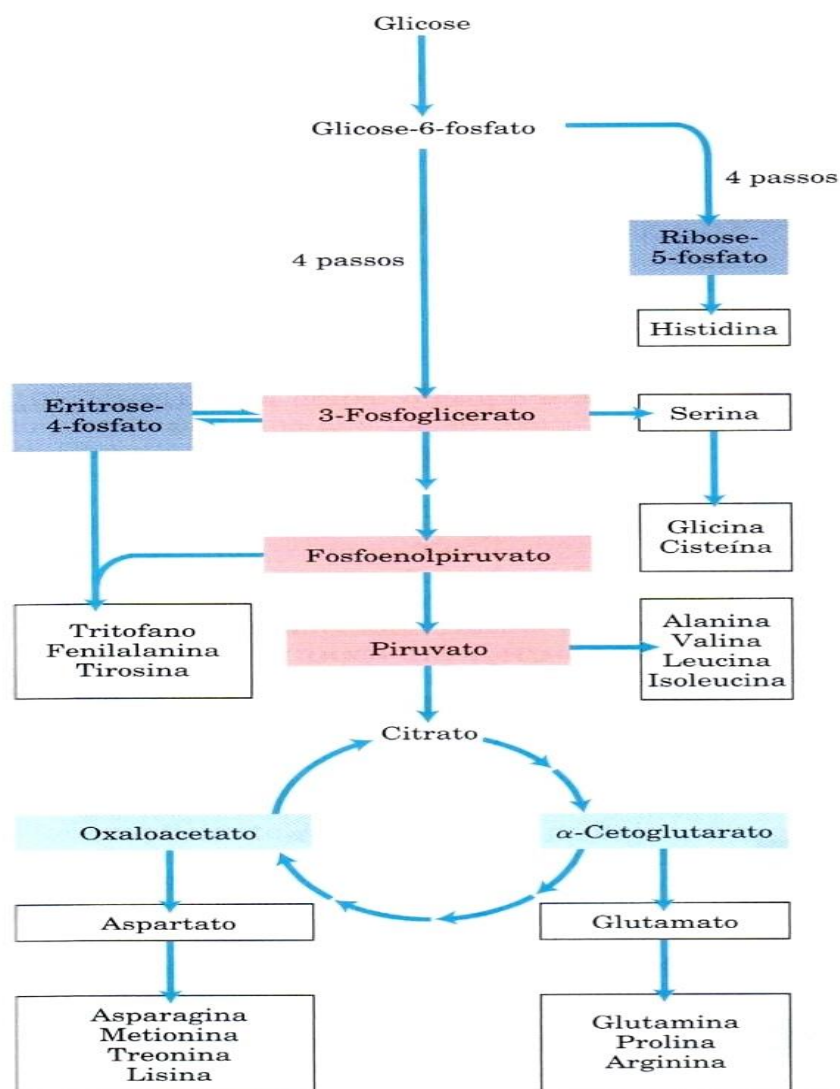


Figura 4: Biossíntese de aminoácidos em plantas e bactérias. Fonte: Adaptado de Lehninger e Cox (2011).

2.5.2. Carboidratos

Os carboidratos são importantes moléculas fornecedoras de energia para a planta. A disponibilidade de açúcares é um importante direcionador do crescimento e desenvolvimento embrionário e na germinação de sementes, uma vez que estes compostos atuam tanto como substrato intermediário para o metabolismo, quanto como moléculas sinalizadoras (Smeekens et al., 2010). Nas plantas, as rotas de percepção e sinalização têm sido descritas para diferentes tipos de açúcares, porém, para poucos destes, como por exemplo a glicose,

existe a disponibilidade de informações sobre os mecanismos de percepção e atuação (Smeekens et al., 2010).

Nos vegetais, a síntese de carboidratos tem início quando CO_2 atmosférico é assimilado pela célula, sendo incorporado em uma forma orgânica através da ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase (rubisco) para produzir intermediários que serão convertidos a carboidratos por reações específicas nos cloroplastos e citoplasma. Após assimilação de CO_2 , ocorre uma série de reações que levarão a síntese de trioses fosfato nos cloroplastos, as quais servirão como precursores para a biossíntese de frutose, glicose, ribose e xilose. Ainda nos cloroplastos, moléculas de glicose serão utilizadas para sintetizar o amido que quando hidrolisado dará origem a maltose. A sacarose é sintetizada no citoplasma a partir da ligação entre frutose e glicose, sendo estas formadas a partir de trioses fosfato provenientes dos cloroplastos. Parte da glicose presente no citoplasma vai para a rota das pentoses fosfato sendo convertidas em ribose, ou poderão sofrer isomerização originando manose, arabinose, dentre outros carboidratos (Voet et al., 2000; Taiz e Zeiger, 2009; Lehninger e Cox, 2011) (Fig. 5).

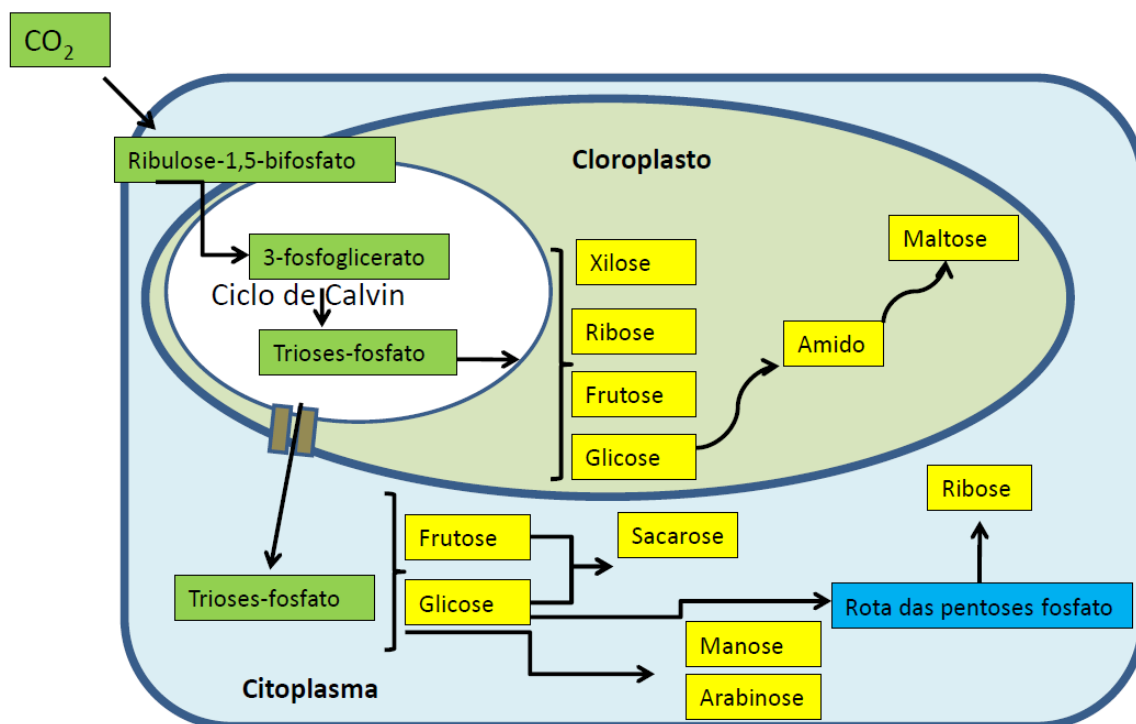


Figura 5: Esquema mostrando a biossíntese de carboidratos nos vegetais.

Durante a germinação de sementes em *Schizolobium parahyba*, os teores dos carboidratos solúveis totais do eixo embrionário e cotilédones apresentaram nítida redução durante a fase inicial da embebição e nos primeiros dias da germinação (Magalhães, 2010). Similarmente, em *Caesalpinia peltophoroides* (Corte et al., 2006) e *Guilfoylia monostylis* (Nkang, 2002) foi mostrado que os teores de carboidratos solúveis diminuíram continuamente durante a germinação, demonstrando que estas biomoléculas são de fundamental importância para o crescimento e estabelecimento da plântula. Para *C. fissilis* não há relatos na literatura sobre o metabolismo de carboidratos durante a germinação de sementes, e estudos neste sentido serão importantes para entender o papel destes compostos no processo germinativo nesta espécie.

Durante o processo de micropropagação, a adição de carboidratos ao meio de cultura, como fonte de carbono, é fundamental para a resposta morfogênética. Estes carboidratos são mobilizados para a formação das brotações, servindo como fonte de energia para os processos metabólicos (George, 2008).

Dados da literatura indicam a importância da adição de carboidratos na promoção do desenvolvimento de brotos *in vitro*, não havendo estudos associados aos níveis endógenos durante este evento morfogênético. Em pinhão-manso (*Jatropha curcas*) foi mostrado que o aumento das concentrações de sacarose no meio de cultura foi proporcional ao tamanho do comprimento da parte aérea de plântulas nesta espécie (Nunes et al., 2008). Entretanto, Saldanha (2010) quando utilizou sacarose no meio de cultura nas concentrações de 10 a 30 g L⁻¹ para promover o desenvolvimento *in vitro* de *Cedrela odorata*, constatou que a mesma não aumentou o crescimento de explantes caulinares nem o desenvolvimento de brotos.

Neste sentido, estudos visando entender o metabolismo de carboidratos endógenos nas brotações durante a morfogênese *in vitro* podem ser uma importante ferramenta para entender a rota destes compostos nestes eventos. Além do conhecimento básico sobre o metabolismo, estes estudos podem auxiliar ainda na melhoria dos protocolos de micropropagação de espécies arbóreas nativas.

2.5.3. Poliaminas

As PAs são moléculas alifáticas de baixo peso molecular, com dois ou mais grupos amino, presentes em todos os organismos vivos. Elas participam de vários processos que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, tais como, controle da divisão e diferenciação celular, regulação da expressão gênica, modulação de sinal, floração, germinação, embriogênese somática e zigótica (Bouchereau et al., 1999; Minocha et al., 1999; Silveira et al., 2004a,b; Silveira et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2006; Kusano et al., 2008; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011), bem como respostas a estresses bióticos e abióticos (Kuznetsov et al., 2007; Alcázar et al., 2010).

As principais PAs presentes nas plantas são a putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm), ocorrendo de forma livre ou conjugada com ácidos fenólicos e moléculas de baixo peso molecular (Bouchereau et al., 1999; Kuznetsov et al., 2006; Takahashi e Kakehi, 2010).

Durante o metabolismo de PAs, Put é sintetizada a partir dos aminoácidos arginina e ornitina pela ação das enzimas arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC). Para a produção de Spd e Spm, são necessários grupos aminopropil provenientes do aminoácido metionina a partir da S-adenosil-metionina (SAM), pela ação da SAM descarboxilase (SAMDC). Desta forma, a Spd é formada a partir da Put pela adição de um grupo aminopropil pela ação da enzima Spd sintase (SPDS). A Spd é convertida em Spm pela adição de grupo aminopropil pela ação da Spm sintase (SPMS) (Fig. 6). O catabolismo de Put, Spd e Spm é feito pela ação das enzimas diamina oxidase e PAs oxidase (Kusano et al., 2008). Estas moléculas parecem ser reguladas por processos análogos aos dos reguladores de crescimento vegetal (Handa e Mattoo, 2010), sendo seu metabolismo ainda pouco estudado em arbóreas.

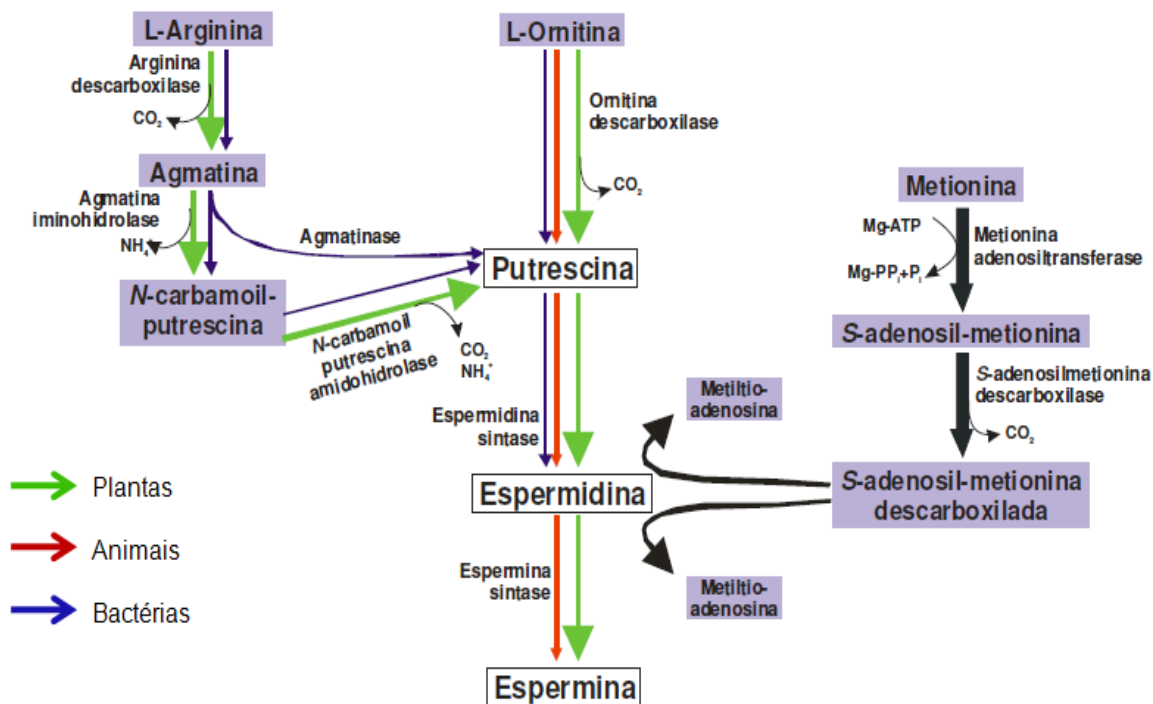


Figura 6: Biossíntese de poliaminas em plantas (setas verdes), animais (setas vermelhas) e bactérias (setas azuis). Adaptado de Kusano et al. (2008).

Os níveis de PAs totais e a razão entre PAs [Put/(Spd+Spm)] variam entre as espécies vegetais, os órgãos, os tecidos e também durante os estádios de desenvolvimento (Kuznetsov et al., 2006). Alguns estudos sobre a variação destes compostos durante a germinação da semente foram desenvolvidos (Gallardo et al., 1992; Puga-Hermida et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011). Estes estudos têm mostrado que os níveis de PAs são alterados durante a germinação de sementes, no qual os níveis de Put aumentam no início, enquanto os níveis de Spd e Spm decresceram durante todo o período da germinação em *Ocotea catharinensis* (Dias et al., 2009) e *Ocotea odorifera* (Pieruzzi et al., 2011), sugerindo o envolvimento das PAs no processo germinativo. Entretanto, estes estudos foram realizados para um número reduzido de espécies e ainda não está totalmente elucidado o modo de ação destas substâncias no processo germinativo.

Durante o processo de micropropagação, estudos sobre o papel das PAs são praticamente inexistentes na literatura (Kuznetsov et al., 2006), em especial para espécies arbóreas. Estudos mostram que estas podem atuar como promotores no desenvolvimento de brotações (Bais, 2000; Debiasi et al., 2007). Estudos da quantificação endógena de PAs durante o desenvolvimento de brotações *in vitro* são escassos, contudo tem-se constatado altos níveis de Put durante a emissão de brotações, sugerindo um papel importante destas biomoléculas no desenvolvimento morfogênético *in vitro* (Francisco et al., 2008).

3. TRABALHOS

3.1. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS, CARBOIDRATOS E POLIAMINAS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a variação e os níveis endógenos de aminoácidos, carboidratos, poliaminas (PAs) e proteínas durante a germinação de *C. fissilis*. Sementes foram germinadas em placas de Petri sob condições controladas e amostras foram coletadas antes da incubação (tempo 0) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de embebição para determinação da curva de embebição e análises bioquímicas. As concentrações de aminoácidos, carboidratos e PAs foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Proteínas foram quantificadas utilizando o método 2D-Quant Kit (GE Healthcare). Sementes de *C. fissilis* apresentaram o modelo clássico trifásico de absorção de água. O conteúdo de aminoácidos totais aumentou até a protrusão radicular

decrecendo na plântula em crescimento, sendo a treonina o aminoácido predominante. As concentrações de proteínas foram contrárias as de aminoácidos durante todos os dias analisados. Os conteúdos de carboidratos totais diminuíram durante a germinação, estando associado possivelmente ao aumento da atividade respiratória no início da embebição. A sacarose foi o carboidrato predominante, com diminuição constante de seu conteúdo durante o processo germinativo. Foi observada a ausência de monossacarídeos como frutose e glicose no processo germinativo de *C. fissilis*. Na plântula em crescimento, ao final do período da incubação (17^o dia), foram detectados frutose, glicose e sacarose. As concentrações de PAs totais decresceram durante todo o evento germinativo. Na semente madura as PAs em maior concentração foram espermidina (Spd) e espermina (Spm), sugerindo seu papel na maturação e tolerância a dessecação em *C. fissilis*. Durante a germinação, a Spd esteve presente em maior quantidade durante todos os dias, sugerindo o envolvimento desta PA na germinação de sementes de *C. fissilis*. Nas plântulas em crescimento foi observado um aumento significativo de putrescina (Put) e Spd e um decréscimo de Spm. O aumento de Put pode estar associado à atividade mitótica e diferenciação celular durante o crescimento da plântula.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the variation and endogenous levels of amino acids, carbohydrates, PAs and proteins during the germination of *C. fissilis*. Seeds were germinated in Petri dishes under controlled conditions and samples were collected before incubation (time 0) and after 2, 5, 7, 10 and 17 days of imbibition to determine the imbibition curve and biochemical analyzes. The concentrations of amino acids, carbohydrates and PAs were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The proteins were quantified using the 2D Quant Kit (GE Healthcare) method. Seeds of *C. fissilis* showed a triphasic model of water absorption. The total amino acids contents increased until the root

protrusion, decrease in plant growth, being the amino acid threonine the predominant one. The proteins content were contrary to the amino acids during all the analyzed days. The total amount of carbohydrates decreased throughout the germination, possibly being associated with an increase in the respiratory activity at the beginning of imbibition. The sucrose was the predominant carbohydrate, with a decrease of its amount during the germination process. We observed the absence of monosaccharide fructose and glucose during the germination process of *C. fissilis*. In the developing seedling, at the end of incubation (17th day) fructose, glucose and sucrose were detected. The total concentrations of free PAs decreased during the germination event. In the mature seed, the PAs in higher concentration were spermidine (Spd) and spermine (Spm), suggesting their important role in the maturation and tolerance to desiccation in *C. fissilis*. During the germination, Spd was present in greater amounts during the incubation, suggesting the involvement of this PA in the germination of *C. fissilis*. In growing seedlings, a significant increase of putrescine (Put) and Spd in the shoot decrease in Spm was observed. The increase of Put could be associated with the mitotic activity and cellular differentiation during the growth of the seedling.

1. INTRODUÇÃO

Cedrela fissilis Vellozo é uma espécie arbórea conhecida popularmente como cedro rosa. Pertencente à família Meliaceae, ocorre em todas as regiões do Brasil (Carvalho, 2003), encontrando-se ameaçada de extinção (IUCN, 2010).

Sementes de *C. fissilis* são ortodoxas e altamente utilizadas para a produção de mudas em viveiro, ou plantio direto no campo (Carvalho, 2003; Masetto et al., 2008). Entretanto, elas perdem a viabilidade com o tempo de armazenamento em condições ambientais de baixa umidade, dificultando sua utilização em programas de reflorestamento (Carvalho, 2003). Segundo Martins e Lago (2008), são escassos na literatura informações acerca dos processos que levam a perda da viabilidade das sementes de cedro rosa. Estes autores afirmam

que umidade e temperatura têm grande importância na conservação de sementes desta espécie, pois estes fatores podem influenciar diretamente as reações bioquímicas que regulam o metabolismo envolvido no processo germinativo. Entretanto, estudos bioquímicos de identificação e quantificação de compostos relacionados à promoção da germinação ainda não foram descritos na literatura para a espécie.

A germinação de sementes é um processo complexo que se inicia com a absorção de água pela semente quiescente e termina com a protrusão da radícula (Bewley, 1997), sendo os eventos posteriores denominados de crescimento da plântula (Gallardo et al., 2002). Durante a germinação vários fatores atuam de forma integrada no sentido de promover o crescimento do embrião, sendo as alterações fisiológicas observadas, resultado de um rigoroso controle bioquímico e molecular (Catusse et al., 2008). Durante o desenvolvimento da semente várias biomoléculas são sintetizadas e armazenadas, sendo estas mobilizadas durante o processo germinativo e crescimento inicial da plântula (Gallardo, et al., 2002; Penfield et al., 2005).

Dentre estes compostos, vários apresentam funções importantes durante a germinação de sementes, como aminoácidos, carboidratos e PAs. Os aminoácidos armazenados durante o desenvolvimento da semente são importante fonte de nitrogênio durante a germinação e crescimento inicial de plântulas (Rock e Quatrano, 1995). Estas biomoléculas podem ser precursoras de importantes vias metabólicas promotoras da germinação (Alhadi et al., 2012), servindo como blocos para a construção de proteínas ou precursores de metabólitos importantes no controle e na promoção da germinação (Gallardo et al., 2002; Onomo et al., 2010). Estudos com espécies arbóreas demonstram que estes compostos têm seus níveis alterados durante o desenvolvimento embrionário e germinação de sementes (Santa-Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009; Pieruzzi, 2011). Durante a germinação sugere-se que além de outras funções, os aminoácidos atuariam como agentes osmóticos, necessários para completar o evento germinativo (Pieruzzi, 2009). As variações observadas durante o período germinativo indicariam uma participação direta destes compostos em diferentes etapas do processo (Dias et al., 2009).

Os carboidratos são importantes moléculas fornecedoras de energia durante a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas, sendo intensamente consumidos durante este processo. Eles desempenham papel importante como moléculas sinalizadoras (Rolland et al., 2006), podendo atuar como agentes estimuladores de um largo espectro de funções ainda desconhecidas durante o processo germinativo. Fatores ambientais afetam a composição e quantidade de carboidratos nas plantas, bem como em estruturas específicas, tal como sementes (Tahir et al., 2011), o que pode ter influência direta sobre a germinação. Estudos da mobilização e identificação de carboidratos durante a germinação em arbóreas mostram que seu metabolismo é altamente dinâmico (Ferreira et al., 2009; Carrijo et al., 2010). Variações no conteúdo de carboidratos na semente madura e ao longo do período germinativo exibem perfis diferentes de acordo com a espécie (Pontes et al., 2002; Corte et al., 2006; Borek et al., 2006), podendo influenciar diretamente o metabolismo de outras biomoléculas (Borek et al., 2006).

As PAs são importantes moduladores de diversos eventos biológicos em plantas. Elas atuam como hormônios vegetais influenciando processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, tais como, expressão gênica, divisão e diferenciação celular, estabilização de membrana e eventos de morte celular programada (Tabor e Tabor, 1984; Igarashi e Kashiwagi, 2000; Kuehn e Phillips, 2005; Kusano et al., 2008). Elas também estão associadas com a promoção da embriogênese e organogênese em plantas (Minocha et al., 1999; Silveira et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2006) e germinação de sementes (Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011). Estudos mostram que os níveis e a razão entre as PAs são alterados durante a germinação de sementes, sendo um importante marcador do evento (Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estudar os níveis endógenos e variações de aminoácidos, carboidratos, PAs e proteínas durante a germinação de *C. fissilis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

As sementes de *C. fissilis* utilizadas nos experimentos de germinação foram obtidas do Viveiro Caiçara localizado no Estado de São Paulo - SP.

2.2. Assepsia das sementes

Anteriormente à incubação para a germinação, as sementes foram submetidas a processo de desinfestação de acordo com metodologia descrita por Santa-Catarina et al. (2001), com modificações. Inicialmente, as sementes foram lavadas com 250 mL de água contendo três gotas de detergente comercial neutro. Em seguida, foram lavadas por 10 vezes com água destilada, seguida de imersão por 1 min em álcool 70 % e 30 min em água sanitária comercial 100 %, contendo 2,5 % de cloro ativo acrescido de fungicida Derosal (100 µL/500 mL). Em seguida, as sementes foram submetidas a cinco lavagens com água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar.

2.3. Curva de embebição

Para determinação da curva de embebição foram utilizadas 7 repetições com 10 sementes cada embebidas em 10 mL de água destilada autoclavada contendo fungicida Derosal (100 µL/500 mL). Para a obtenção da matéria fresca (MF) as sementes foram pesadas nos intervalos de (0 - semente madura) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de embebição. Após a pesagem estas mesmas sementes foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 70 °C por 24 h para obtenção da massa da matéria seca (MS) e conteúdo de água.

2.4. Germinação de sementes

Sementes de *C. fissilis* foram submetidas a um teste de germinação para o estabelecimento dos dias de coleta durante o período germinativo. Durante o pré-teste a morfologia das sementes foi observada diariamente até a obtenção de plântulas completas. Para as análises bioquímicas, após assepsia, as sementes

com comprimento e largura média de 1,13 cm e 0,5 cm, respectivamente, foram inoculadas em placas de Petri contendo duas camadas de papel filtro embebidas em 10 mL de água destilada autoclavada contendo fungicida Derosal (100 µL/500 mL). Em seguida, foram incubadas em sala de cultivo com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 22 µmol m² s⁻¹ e temperatura de 25±2 °C.

Amostras foram coletadas antes da incubação (tempo 0 - semente madura) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de embebição (Fig. 1)

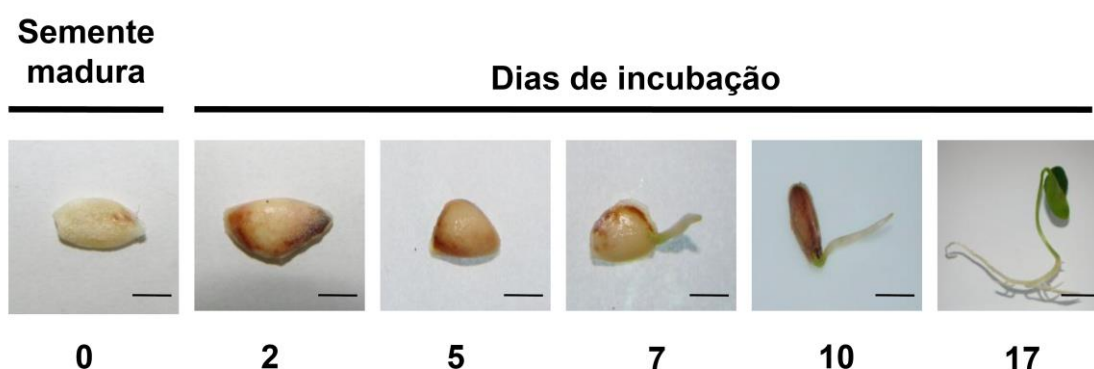


Figura 1: Morfologia de sementes de *C. fissilis* durante o processo germinativo. Barras = 0,5 cm.

Foram utilizadas 30 placas de Petri com 20 sementes cada, totalizando 600 sementes. Em cada período de coleta, 3 amostras foram coletadas ao acaso de 5 placas para cada análise (aminoácidos e proteínas, carboidratos e PAs). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 °C até as análises dos compostos.

2.5. Análises bioquímicas

2.5.1. Aminoácidos livres e proteínas solúveis em etanol

A metodologia para a determinação de aminoácidos foi conduzida de acordo com Santa-Catarina et al. (2006). Amostras de 200 mg de MF foram maceradas em 6 mL de etanol 80 % (v/v) e concentradas até eliminação do etanol em “speed vac”. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 2 mL com

água milli-Q e centrifugadas a 20.000xg por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,2 μm . Alíquotas de 20 μL do filtrado e 60 μL da solução o-fitaldialdeído (OPA)-borato foram utilizadas para a derivatização à temperatura ambiente por 2 min. Em seguida foram feitas a quantificação e identificação dos aminoácidos por HPLC.

Os aminoácidos foram quantificados e identificados utilizando-se uma coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS) de 5 μm . Como solventes foram utilizados: uma solução tampão (solvente A), contendo acetato de sódio (50 mM), fosfato de sódio (50 mM), metanol (20 mL L⁻¹) e tetrahidrofurano (20 mL.L⁻¹), pH 8,1 ajustado com ácido acético e metanol 65% (solvente B). A mudança na proporção do solvente B em relação ao solvente A definiu o gradiente de corrida, sendo o gradiente de B programado para 20 % durante os primeiros 32 min, de 20 a 100 %, entre 32 e 71 min e 100 % entre 71 e 80 min, com fluxo de 1 mL min⁻¹, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação a 250 nm e emissão em 480 nm. Foram injetados 20 μL da solução derivatizada com OPA. As áreas dos picos e os tempos de retenção de cada aminoácido foram avaliados por comparação com aminoácidos padrão em concentrações conhecidas: ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, serina, glutamina, histidina, glicina, arginina, treonina, alanina, ácido γ -aminobutírico, tirosina, metionina, triptofano, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina, ornitina e lisina. Proteínas solúveis em etanol foram quantificadas dos extratos etanólicos provenientes da extração de aminoácidos utilizando o método 2D-Quant Kit (GE Healthcare) de acordo com recomendações do fabricante.

2.5.2. Carboidratos

A metodologia utilizada para a determinação de carboidratos foi baseada na proposta por Filson e Dawson-Andoh (2009), com modificações. As amostras de 300 mg de MF foram maceradas com a adição de 1 mL de solução de extração composta por etanol (ETOH) 80 % (v/v), polivinilpolipirrolidona (PVPP) 3 % (m/v) e ácido ascórbico 1 % (m/v) a 4 °C. Após a maceração as amostras foram brevemente agitadas em vórtex, incubadas em banho-maria a 70 °C por 90 min e centrifugadas a 13.000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi armazenado e

o *pellet* ressuspendido em 1 mL de solução de extração e submetido à extração descrita. Os sobrenadantes resultantes foram adicionados aos provenientes da primeira centrifugação, filtrados em membrana de 0,2 μm antes da armazenagem a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os carboidratos foram identificados e quantificados por HPLC usando um detector de espalhamento de luz (ELSD-LT II), com configuração do detector para temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, pressão de N_2 em 350 mPa, com ganho 9 e filtro 4.

A coluna utilizada para a análise foi uma Prevail Carbohydrate ES 5 μm (250 x 4,6 mm), com uma pré-coluna do tipo Prevail Carbohydrate ES 5 μm (7,5 x 4,6 mm). A temperatura foi mantida a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Como solventes foram utilizados: água milli-Q (solvente A) e acetonitrila 100 % (solvente B), sendo ambas as soluções submetidas à filtração prévia (0,2 μm). A corrida foi realizada em gradiente isocrático ajustado para 80 % de solvente B durante 30 min com fluxo de 1 mL min^{-1} . As áreas e os tempos de retenção dos carboidratos analisados foram avaliados por comparação com carboidratos padrão em concentrações conhecidas: ribose, arabinose, xilose, frutose, manose, glicose, sacarose e maltose.

2.5.3. Poliaminas

A metodologia utilizada para a determinação de PAs livres foi conduzida conforme descrito por Santa-Catarina et al. (2006). Amostras de 200 mg de MF foram maceradas com 1,2 mL de ácido perclórico a 5 % (v/v), e mantidas no gelo por 1 h, em seguida foram centrifugadas a $20.000\times g$ por 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O *pellet* foi ressuspendido em 100 μL de ácido perclórico a 5 % (v/v), centrifugado nas condições já citadas e os dois sobrenadantes, contendo as PAs foram misturados.

Em seguida as PAs livres foram dansiladas. Para tanto, 40 μL da amostra contendo PAs foram misturados com 100 μL de cloreto de dansil (5 mg mL^{-1} em acetona 1,8 mM), 50 μL de solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 20 μL de 1,7- diaminoheptano (DAH) 0,05 mM, utilizado como padrão interno. Após a mistura, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. O excesso de cloreto de dansil foi removido pela adição de 25 μL 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 μL de

tolueno, e a fase apolar (orgânica), que contém as PAs foi coletada, seca sob jato de nitrogênio, e ressuspendida em 175 µL de acetonitrila absoluta.

A identificação e quantificação das PAs foi feita utilizando-se HPLC com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS) de 5 µm. Como solvente foram utilizados: acetonitrila 10 % em água, pH 3,5 ajustado com HCl 1N (solvente A) e acetonitrila absoluta (solvente B). A mudança na proporção da solução B em relação à solução A definiu o gradiente de corrida. 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. Foram injetados 20 µL da solução dansilada. As áreas dos picos e os tempos de retenção de cada PAs foram avaliados por comparação com PAs padrão em concentrações conhecidas: putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm).

2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK a 5 % (Sokal e Holhf, 1995) utilizando o software Sistema para Análises Estatísticas (SAEG[®]). Para carboidratos os dados foram transformados em $(\log x) + 1$, onde x é o dado de cada repetição. Depois de transformados, os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de médias SNK a 5%, apresentando os dados não transformados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Curva de embebição

Sementes de *C. fissilis* apresentaram o modelo trifásico de embebição durante a germinação (Fig. 2), conforme estabelecido por Bewley e Black (1994). Segundo estes autores a Fase 1 (F1) é um processo meramente físico, onde ocorre uma rápida absorção de água pelas sementes. A Fase 2 (F2) caracteriza-

se por uma redução da velocidade de embebição e intensidade respiratória. Nesta fase, os processos metabólicos, imprescindíveis para o crescimento embrionário, são intensificados e a germinação é concluída com a protrusão radicular, dando início à Fase 3 (F3).

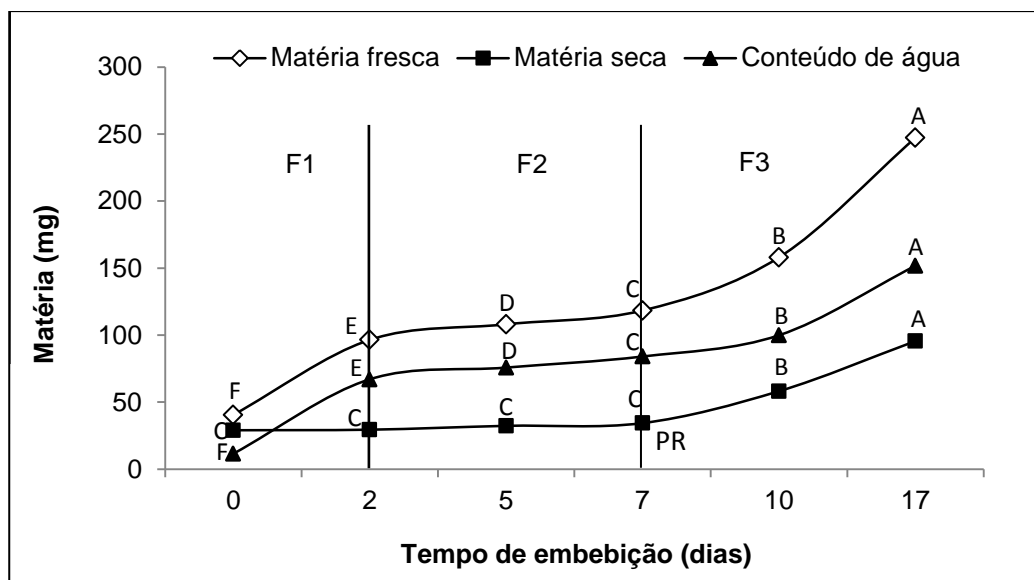


Figura 2: Curva de embebição de sementes de *C. fissilis*. PR = início da protrusão radicular. F1 = Fase 1; F2 = Fase 2; F3 = Fase 3. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n=7$; $CV_{\text{Matéria fresca}} = 4,6\%$. $CV_{\text{Matéria seca}} = 8,5\%$. $CV_{\text{Conteúdo de água}} = 7,0\%$).

Durante a germinação de sementes de *C. fissilis* a protrusão da radícula começou no 7º dia. Após este tempo, iniciou-se o crescimento, com obtenção de plântulas completas no 17º dia (Fig. 1). Durante este evento a F1 caracterizou-se por uma rápida absorção de água terminando no 2º dia, enquanto na F2 ocorreu uma lenta absorção de água que perdurou até o 7º dia, quando teve início a protrusão radicular marcando o início da F3 também caracterizada pela contínua absorção de água. O incremento de MS manteve-se inalterado até o 7º dia. A partir deste tempo houve um incremento significativo de MS devido ao alongamento da radícula e conseqüente crescimento da parte aérea. Estes dados corroboram com aqueles obtidos por Bonfante et al. (2011). Estes autores verificaram durante a germinação de sementes de *C. fissilis* a 20 °C que estas

atingem a F1 com 19 h (aproximadamente 1 dia) e F3 com 179 h (com 7,4 dias). A determinação da curva de embebição é importante no sentido de se conhecer a permeabilidade do tegumento para possíveis tratamentos de pré-hidratação (Carvalho e Nakagawa, 2000). A duração de cada uma das fases é característica de cada espécie e depende de propriedades particulares da semente, dentre as quais se destacam quantidade de compostos hidratáveis e permeabilidade do tegumento a água e oxigênio (Silva, 2010). Segundo Bewley e Black (1994), o padrão trifásico ocorre em sementes com condições ótimas para a germinação. Desta forma, sementes de *C. fissilis* mostraram-se aptas para os experimentos de germinação deste trabalho exibindo excelente absorção de água necessária à germinação e dispensando tratamentos pré-germinativos, sendo estas sementes utilizadas para os estudos bioquímicos.

3.2. Perfil bioquímico

3.2.1. Aminoácidos livres e proteínas

A figura 3 mostra o conteúdo de aminoácidos livres totais e proteínas durante a germinação de sementes de *C. fissilis*. Dentre os aminoácidos analisados, a treonina (Fig. 4A) foi a principal responsável pelo aumento no conteúdo total de aminoácidos, estando em maior concentração durante todo o período germinativo, resultando no mesmo padrão de variação dos aminoácidos livres totais (Fig. 3). Para outras espécies arbóreas *O. catharinensis* (Dias et al., 2009) e *O. odorifera* (Pieruzzi, 2009), o aminoácido em maior concentração durante toda a germinação foi asparagina, a qual está envolvida no transporte e nitrogênio nas plantas.

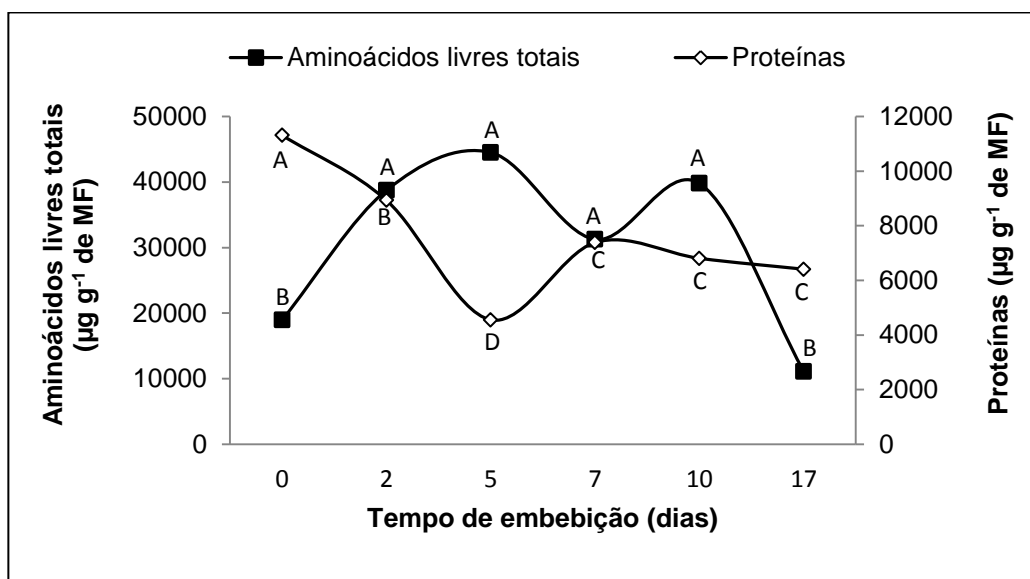


Figura 3: Conteúdo de aminoácidos livres totais e proteínas ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) durante a germinação de sementes de *C. fissilis* antes (0) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de incubação. MF: Massa Fresca. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n=3$; $CV_{\text{Aminoácidos livres totais}} = 20,27\%$. $CV_{\text{Proteínas totais}} = 6,83\%$).

Os menores níveis de aminoácidos livres totais foram encontrados na semente madura (tempo 0), antes da embebição e na plântula em crescimento no 17º dia. Os conteúdos endógenos aumentaram no início do processo germinativo sendo observados em maior concentração no 5º dia, decrescendo com o advento da protrusão radicular no 7º dia, porém sem diferenças estatísticas. Em adição, o conteúdo de proteínas decresceu até a protrusão radicular, mantendo-se a partir deste evento sem diferenças significativas (Fig. 3). Estes dados indicam que o aumento no conteúdo de aminoácidos está diretamente relacionado com a degradação de proteínas na semente até o 7º dia.

Adicionalmente, verificou-se um decréscimo acentuado no conteúdo de aminoácidos livres totais do 10º ao 17º dia, regulado pelo decréscimo no conteúdo de treonina (Fig. 4A). A treonina é um aminoácido essencial, importante durante o desenvolvimento e crescimento de plantas, sendo um dos produtos resultantes da via metabólica do ácido aspártico (Jander e Joshi, 2010). A treonina através de sua conversão em isoleucina e como um dos precursores de glicina participa de

vias metabólicas importantes nos vegetais, dentre elas na produção de energia celular e processos de fotorrespiração (Kang et al., 2006; Joshi et al., 2006).

O aumento nos conteúdos de aminoácidos livres totais durante a germinação de sementes de *C. fissilis* pode ser devido ao fato de que endopeptidases (proteínases A) atuam na degradação de proteínas de reserva no início da embebição durante a germinação. Estas enzimas catalisam uma proteólise limitada de proteínas armazenadas convertendo-as em peptídeos solúveis (Ferreira et al., 1995). Desta forma, as proteínas modificadas tornam-se susceptíveis à ação de proteínases B, carboxipeptidases, aminopeptidases e dipeptidases, que são incapazes de atacar proteínas nativas de sementes maduras, mas facilmente convertem os peptídeos solúveis em aminoácidos (Shutov e Vaintraub, 1987). Adicionalmente, Pieruzzi (2009) sugere que além da função de suprir a demanda de nitrogênio requerida pela plântula, o aumento nos conteúdos de aminoácidos estaria ligado à função que estes compostos exercem como agentes osmóticos, necessária para completar o processo germinativo. De acordo com Bove et al. (2001), antes do alongamento radicular, novos processos fisiológicos ocorrem preparando o embrião para o crescimento do eixo embrionário. O aumento de substâncias osmoticamente ativas como os aminoácidos, facilitaria a entrada de água na célula contribuindo para o alongamento radicular.

Após a protrusão da radícula foi verificado um aumento no conteúdo de aminoácidos totais livres em *C. fissilis*, porém sem diferenças estatísticas. O mesmo ocorreu para *O. catharinensis* (Dias et al., 2009). Este aumento pode ser relacionado com uma síntese *de novo* de aminoácidos ou degradação de proteínas fornecedoras destes compostos necessários ao metabolismo do nitrogênio para promover o desenvolvimento e crescimento inicial da plântula.

As concentrações dos aminoácidos livres foram variáveis durante todo o período germinativo (Figs. 4 e 5). Esta variação pode ser assumida como um fator genético que regula o metabolismo de proteínas, bem como os mecanismos de síntese de aminoácidos selecionados apontando uma elevada utilização destes compostos e indicando sua essencialidade para o processo germinativo (Rozan et al., 2000; Onomo et al., 2010). Adicionalmente, as sementes, durante o processo

de germinação, podem ser intensos sítios de síntese de aminoácidos (Onomo et al., 2010), o que teria contribuído de forma direta para o aumento dos conteúdos destas biomoléculas até a protrusão radicular. As variações nos conteúdos dos aminoácidos durante o evento germinativo indicam uma relação direta com a germinação, conforme sugerido por Dias et al. (2009). Para a maioria dos aminoácidos houve uma redução com a emissão da radícula e aumento após este evento no 10º dia (Figs. 4 e 5). Apenas glutamina (Fig. 4D), glicina (Fig. 4E), lisina (Fig. 5F) e treonina (Fig. 4A) não sofreram redução com o advento da protrusão da radícula. Em adição, a glutamina aumentou após a protrusão radicular exibindo um incremento significativo na plântula em crescimento no 17º dia. A glutamina é um aminoácido transportador de nitrogênio nas plantas (Oliveira et al., 2001). Ela atua como doador de nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos e compostos nitrogenados necessários a plântula em crescimento. Sendo ainda considerado um dos principais aminoácidos precursores dos demais (Coruzzi e Last., 2000)

Os aminoácidos treonina (Fig. 4A), serina (Fig. 4H), ácido γ -aminobutírico (Fig. 4I), valina (Fig. 5D), leucina (Fig. 5E), fenilalanina (Fig. 5H), isoleucina (Fig. 5J) e alanina (Fig. 5B) aumentaram durante o evento germinativo reduzindo suas concentrações no 7º dia quando iniciou-se a protrusão da radícula. Estes resultados sugerem que estes aminoácidos, embora em concentrações diferentes, possuem um papel importante nos eventos que antecedem a protrusão da radícula em *C. fissilis*. Dentre estes aminoácidos, o ácido γ -aminobutírico foi predominante durante a germinação de *Cola acuminata* e *Cola anomola* (Onomo et al., 2010). Este aminoácido não proteico normalmente aumenta durante a germinação de sementes e também sobre condições de estresse, tais como, acidificação e estresse hídrico (Snedden e Fromm, 1998; Bown et al., 2006). Ele tem um papel central na regulação do pH (Bown e shelp, 1997) e armazenamento de nitrogênio nas sementes, sendo um intermediário para síntese de aminoácidos proteicos (Rodriguez et al., 2008).

Além da treonina, a citrulina e o ácido glutâmico também apresentaram os maiores conteúdos durante o evento germinativo (Figs. 4A, 4B e 4C, respectivamente), parecendo ser essenciais no processo germinativo de *C.*

fissilis. O ácido glutâmico tem papel importante em reações de transaminação e ainda é precursor ou produto da degradação de arginina, prolina e histidina (Morot-Gaudry et al., 2001). Adicionalmente, a diminuição de ácido glutâmico durante o processo germinativo até a protrusão radicular em *C. fissilis* sugere seu papel na interconversão dos aminoácidos durante a germinação (Glevarec et al., 2004). O ácido glutâmico é um precursor dos aminoácidos glutamina e prolina que são usados como substrato para enzimas de rotas respiratórias durante a embebição (Buchanan et al., 2000; Rocha et al., 2010). No entanto, verificou-se neste trabalho que o ácido glutâmico decresceu até a protrusão da radícula, enquanto glutamina manteve-se estável. Após este evento, houve um aumento no conteúdo destes aminoácidos não sendo verificada uma correlação em seus conteúdos. Citrulina é um aminoácido não essencial (Rimando e Perkins-Veazie, 2005). Em *Juglans regia* este aminoácido foi encontrado em altas concentrações no eixo embrionário, cotilédones e caule de plântulas jovens sugerindo-se seu papel na translocação de nitrogênio nestes tecidos e no transporte de outros aminoácidos livres durante a germinação (Mapelli et al., 2001). Estes autores ainda afirmam que citrulina pode ser utilizada para a síntese de outros aminoácidos e é importante em processos fisiológicos onde ocorre a mobilização de compostos nitrogenados.

O aminoácido encontrado em menor concentração durante o processo germinativo foi a isoleucina (Fig. 5J). Este resultado corrobora com aquele encontrado por Onomo et al. (2010) para sementes maduras de *C. anomala*. Neste trabalho o autor verificou que os aminoácidos em menor concentração nas sementes maduras de *C. acuminata* foram glicina, tirosina, triptofano, valina, isoleucina e leucina. Estes dados são similares aos encontrados neste trabalho onde estes mesmos aminoácidos estiveram entre os de menor concentração, tanto na semente madura quanto durante o evento germinativo.

É importante observar que neste trabalho foram encontradas baixas concentrações de fenilalanina (Fig. 5H) e altas de arginina (Fig. 4F). Este fato é importante para a promoção da germinação, pois elevados teores de fenilalanina levam a síntese de ácido abscísico inibidor da germinação, enquanto altos níveis de arginina promovem a síntese de giberelinas promotoras da germinação como

verificado para variedades de *P. granatum* (Alhadi et al., 2012). Entretanto, mesmo em baixa quantidade, as concentrações de fenilalanina aumentaram até a protrusão da radícula sendo maior na plântula em crescimento. Isto se deve ao fato de aminoácidos aromáticos, tal como fenilalanina, serem precursores de vários compostos necessários a germinação e estabelecimento da plântula, como hormônios e lignina (Tzin e Galili, 2010).

Os aminoácidos arginina e ornitina são precursores da síntese de PAs e mantiveram um padrão semelhante durante a germinação em *C. fissilis*. Arginina apresentou um leve aumento no 2º dia, a partir do qual decresceu até a protrusão da radícula aumentando novamente no 10º dia. Este aminoácido contém a maior quantidade de nitrogênio entre os aminoácidos proteicos (Canton et al., 2005). Seu catabolismo fornece vários compostos intermediários necessários para a síntese de compostos nitrogenados envolvidos na diferenciação de tecidos e crescimento de plantas como PAs. Participa também da síntese de giberelinas necessárias a germinação (Hernandez-Sebastia et al., 2005; Weitbrecht et al., 2011). Neste trabalho não foi possível quantificar metionina individualmente, a qual foi quantificada juntamente com triptofano (Fig. 5G). Suas concentrações e variações foram similares às da arginina. Metionina está envolvida na síntese de importantes enzimas que regulam o metabolismo de síntese de etileno e PAs, envolvidos na promoção da germinação de sementes, além de estar envolvida em processos de metilação do DNA (Gallardo et al., 2002; Pawlowski, 2009, 2010). Ornitina decresceu durante todo o processo germinativo até a emissão da radícula, aumentando no 10º dia (Fig. 5I). A diminuição de arginina, metionina e ornitina durante todo o evento germinativo indica que pode estar havendo um controle metabólico destes aminoácidos envolvidos na síntese de PAs, uma vez que estas biomoléculas também decresceram durante todo o evento (Fig. 8). Desta forma, estes aminoácidos estariam sendo usados para a síntese de PAs e estas prontamente catabolisadas no processo germinativo.

A tirosina, um aminoácido aromático, apresentou um aumento significativo no 2º dia de germinação não sendo mais detectada após este tempo (Fig. 5A). A redução no conteúdo de tirosina no 5º dia coincide com um pico de alanina (Fig. 5B). A degradação de tirosina está relacionada com as vias energéticas como

glicólise e ciclo de Krebs para formar alanina e ácido glutâmico (Alhadi et al., 2012). Além disso, o pico de tirosina no 2º dia pode estar associado com a inibição de síntese de ABA, que suprime a germinação (Ghelis et al, 2008). Durante a germinação até o 2º dia observou-se altos níveis de tirosina e baixos de alanina. No 5º dia ocorre uma acentuada redução nas concentrações de tirosina e aumento nos conteúdos de alanina. No 7º dia quando ocorreu a protrusão radicular os níveis de alanina reduziram. Sugere-se que a degradação de tirosina é essencial nesta espécie, contribuindo diretamente para a síntese de alanina, que é prontamente metabolizada. Tal aspecto pode ser usado como um biomarcador na germinação de *C. fissilis*.

Os aminoácidos ácido glutâmico (Fig. 4C), glutamina (Fig. 4D), asparagina (Fig. 4G) e ácido aspártico (Fig. 4J), envolvidos no transporte de nitrogênio nas plantas, apresentaram um padrão de variação diversificado até a emissão da radícula. No entanto, todos estes aminoácidos apresentaram redução no momento da protrusão radicular, exceto glutamina, aumentando seus níveis após este evento. Este fato indica que estes aminoácidos são essenciais no processo germinativo desta espécie, uma vez que são transportadores e doadores de nitrogênio para a biossíntese de uma grande variedade de compostos importantes envolvidos no processo germinativo (Dias et al., 2009).

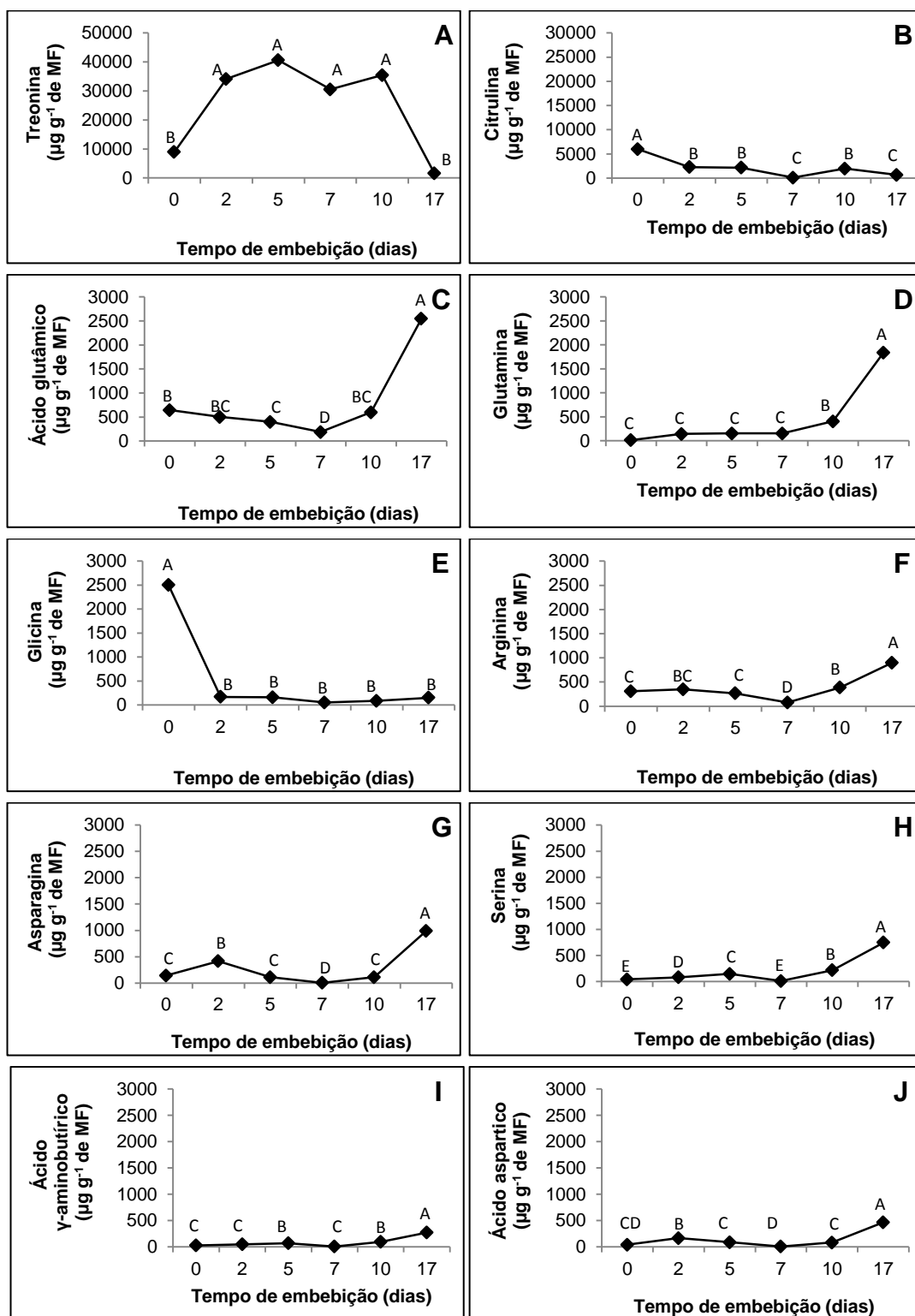


Figura 4: Conteúdo de aminoácidos ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) Treonina (A), Citrulina (B), Ácido glutâmico (C), Glutamina (D), Glicina (E), Arginina (F), Asparagina (G), Serina (H), Ácido γ -aminobutírico (I) e Ácido aspártico (J) durante a germinação de sementes de *C. fissilis* antes (0) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de incubação. MF: Massa Fresca. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n = 3$; $CV_{\text{Treonina}} = 23,9\%$, $CV_{\text{Citrulina}} = 21,7\%$, $CV_{\text{Ácido glutâmico}} = 12\%$, $CV_{\text{Glutamina}} = 10,5\%$, $CV_{\text{Glicina}} = 46,9\%$, $CV_{\text{Arginina}} = 7,8\%$, $CV_{\text{Asparagina}} = 11,9\%$, $CV_{\text{Serina}} = 9,1\%$, $CV_{\text{Ácido } \gamma\text{-aminobutírico}} = 27,8\%$, $CV_{\text{Ácido aspártico}} = 15,4\%$).

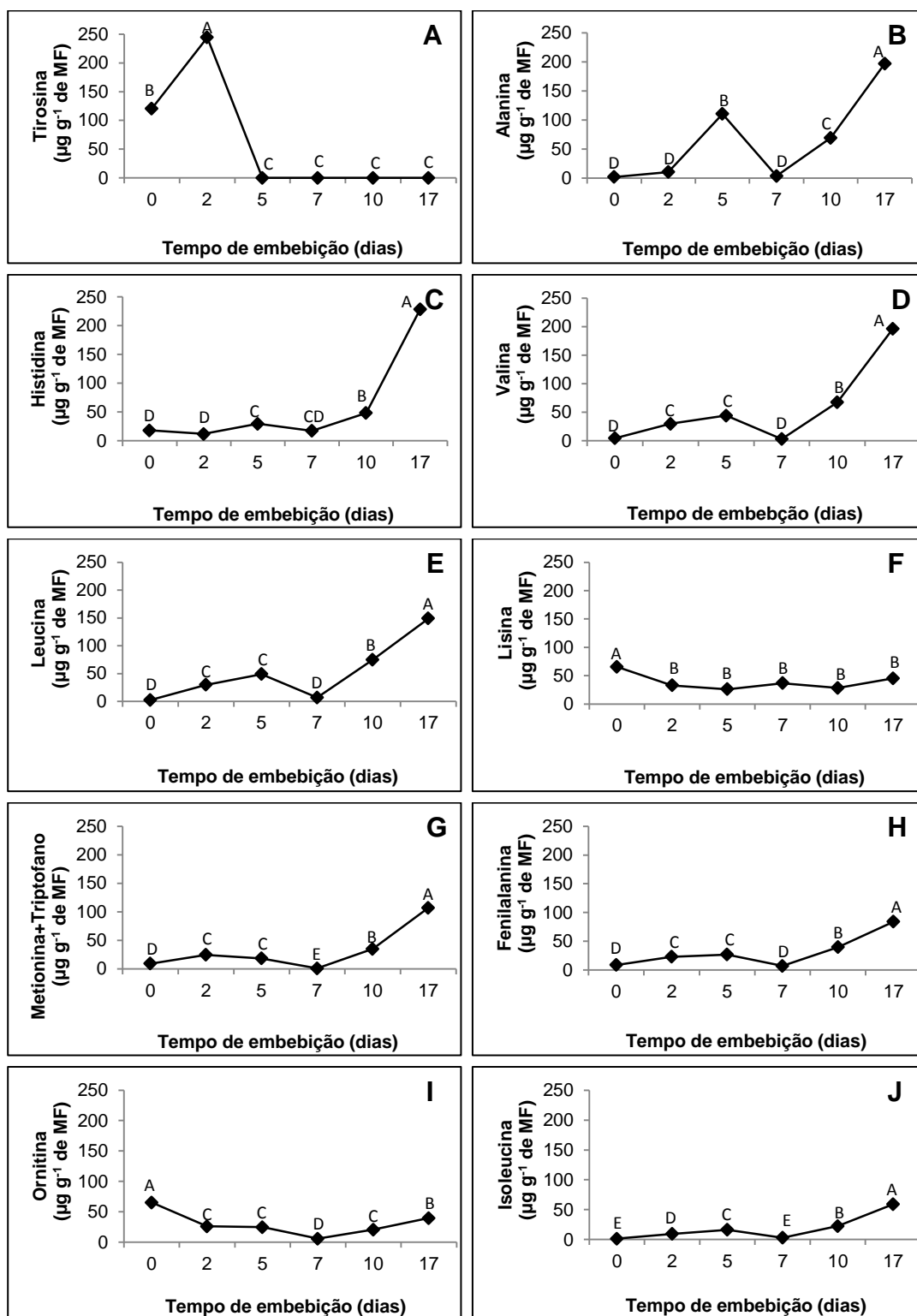


Figura 5: Conteúdo de aminoácidos ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) Tirosina (A), Alanina (B), Histidina (C), Valina (D), Leucina (E), Lisina (F), Metionina+triptofano (G), Fenilalanina (H), Ornitina (I) e isoleucina (J) durante a germinação de sementes de *C. fissilis* antes (0) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de incubação. MF: Massa Fresca. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n = 3$; $CV_{\text{Tirosina}} = 25,8\%$, $CV_{\text{Alanina}} = 15,8\%$, $CV_{\text{Histidina}} = 9,8\%$, $CV_{\text{Valina}} = 15,2\%$, $CV_{\text{Leucina}} = 20,7\%$, $CV_{\text{Lisina}} = 23,8\%$, $CV_{\text{Metionina+Triptofano}} = 12,6\%$, $CV_{\text{Fenilalanina}} = 10,9\%$, $CV_{\text{Ornitina}} = 16,5\%$, $CV_{\text{Isoleucina}} = 17,5\%$).

3.2.2. Carboidratos

Os carboidratos são fonte de energia para a célula e atuam como agentes osmóticos mantendo a integridade da membrana plasmática. Além destes papéis no metabolismo, existem evidências de sua atuação como moléculas sinalizadoras (Smeekens et al., 2010).

Neste trabalho foram quantificados os teores de carboidratos totais durante a germinação de sementes de *C. fissilis* (Fig. 6). Os resultados mostraram uma diminuição no conteúdo de carboidratos totais durante o evento germinativo. Em *Schizolobium parahyba* também foi verificado uma redução nos níveis de açúcares solúveis totais durante a germinação (Magalhães et al., 2010). O mesmo ocorreu em *Caesalpinia peltophoroides* (Corte et al., 2006) e *Guilfoylia monostylis* (Nkang, 2002). Esta redução pode estar associada ao aumento da intensidade respiratória durante as primeiras horas de embebição (Henning et al., 2010), o que leva a metabolização e degradação dos açúcares.

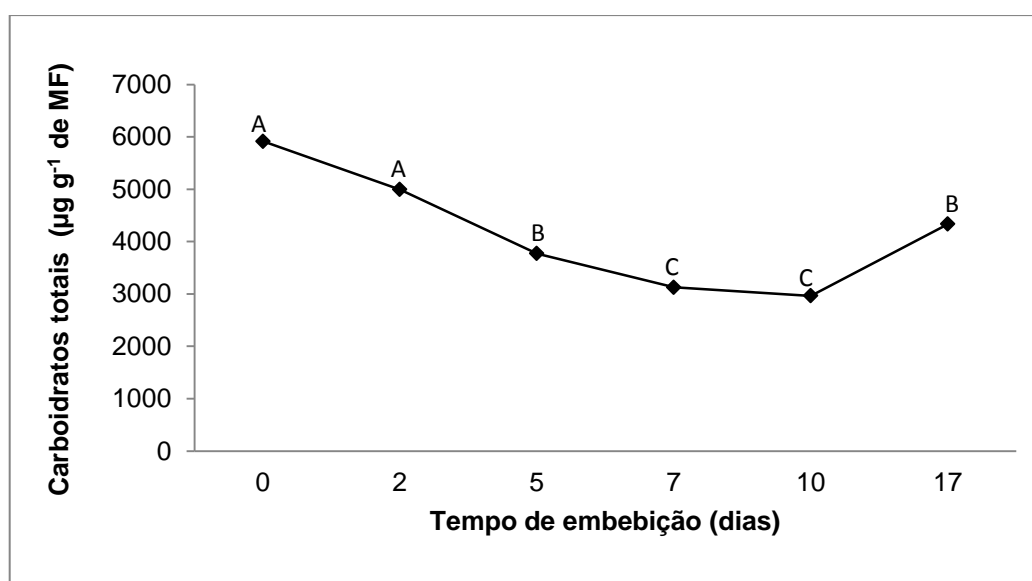


Figura 6: Conteúdo de carboidratos totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) durante a germinação de sementes de *C. fissilis* antes (0) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de incubação. MF: Massa Fresca. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n = 3$; $CV = 1,8\%$).

Nas sementes maduras (tempo 0) foi detectado uma baixa concentração de ribose em relação à sacarose (Figs. 7A e 7B). A partir do 2º dia houve o desaparecimento da ribose e somente sacarose foi detectada até o 7º dia, quando ocorreu a emissão da radícula (Fig. 7). O desaparecimento de ribose pode estar associado à utilização deste açúcar para a síntese *de novo* de DNA e RNA necessários na reativação do metabolismo e para as novas células em formação. Após a protrusão da radícula foram detectados frutose e sacarose no 10º dia (Figs. 7B e 7C) e glicose no 17º dia (Fig. 7D), indicando degradação da sacarose possivelmente para o fornecimento de energia necessária ao crescimento da plântula, obtida ao 17º dia de germinação.

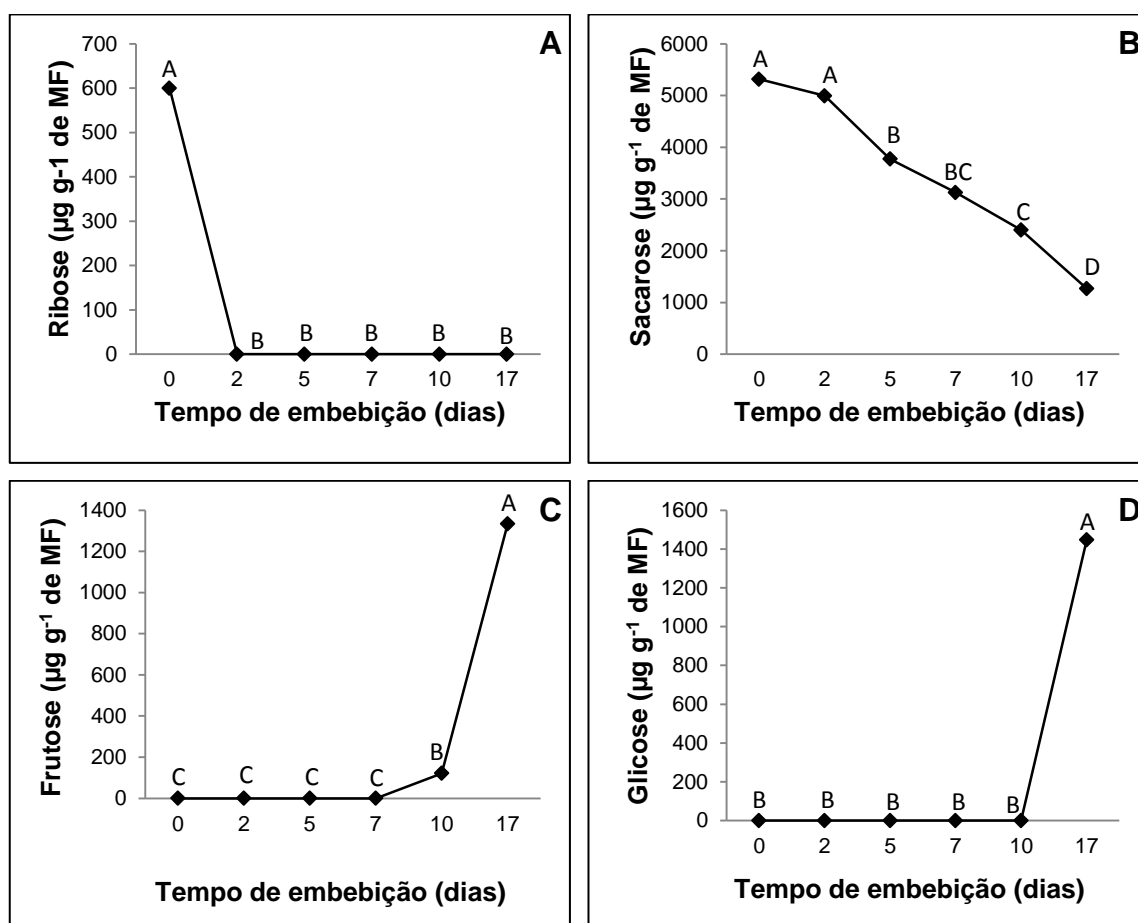


Figura 7: Conteúdo de ribose (A), sacarose (B), frutose (C) e glicose (D) ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) durante a geminação de sementes de *C. fissilis* antes (0) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de incubação. MF: Massa Fresca. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n=3$; $CV_{\text{Ribose}} = 32,7\%$. $CV_{\text{Sacarose}} = 8,5\%$ $CV_{\text{Frutose}} = 6,6\%$. $CV_{\text{Glicose}} = 17,1\%$).

Os resultados mostraram que a sacarose foi o carboidrato predominante durante todo o processo germinativo, sendo a diminuição desta constante durante o evento. Altos níveis de sacarose são importantes, pois podem manter as células osmoticamente ativas favorecendo o processo de embebição (Pastorini et al., 2003). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo não corroboram com os obtidos por Carrijo et al. (2010), os quais verificaram um aumento contínuo no conteúdo de sacarose durante a germinação de sementes de *Dalbergia nigra*, tanto nos cotilédones como no eixo embrionário. Estes autores também verificaram a presença de glicose, manose e ausência de frutose no evento. Contudo, Corte et al. (2006) afirmam que os níveis e mobilização de carboidratos são específicos para cada espécie.

A ausência de monossacarídeos como frutose e glicose até a protrusão radicular pode ser devido à utilização em baixas quantidades destes açúcares no processo germinativo. A degradação de sacarose forneceria frutose e glicose necessárias à respiração, no entanto estas hexoses não foram detectadas até a protrusão da radícula. Os altos teores de sacarose encontrados na semente madura podem estar associados ao processo de desenvolvimento das sementes e do embrião na espécie. A relação entre hexoses e sacarose foi relatada como estando envolvida no desenvolvimento de embriões de leguminosas. As hexoses promovem a divisão e diferenciação celular, enquanto sacarose promove o alongamento celular em *Vicia faba* (Borisjuk et al., 2003). Como durante a germinação o alongamento celular é o evento predominante, sugere-se que as altas concentrações de sacarose estejam associadas a este evento morfológico em *C. fissilis*. Em *Vicia faba*, hexoses estão associadas à nutrição do embrião, enquanto sacarose inibe este processo (Borisjuk et al. 2003). Gibson (2005) relata que altas concentrações de glicose podem retardar a germinação em várias espécies. Talvez a presença de frutose, glicose e outras hexoses não sejam necessárias em grandes concentrações no processo germinativo de *C. fissilis*.

Na plântula em crescimento de *C. fissilis*, ao final do período de incubação no 17º dia, houve detecção de frutose, glicose e sacarose. Este fato possivelmente está associado à ligação de hexoses e sacarose como um dos requisitos para divisão, diferenciação e alongamento celular, pois estes eventos

estão ocorrendo em grande intensidade nos tecidos jovens para promover o crescimento da planta. Neste estudo a mobilização de açúcares parece ocorrer após a protrusão da radícula, evidenciado pelo aparecimento de frutose no 10º dia e glicose no 17º dia. Estes dados corroboram com os de Sasaki e Felipe (1992), que mostraram um aumento nos teores de açúcares solúveis tanto na parte aérea como radicular em plântulas de *Dalbergia miscolobium* após a protrusão radicular.

Os baixos níveis de sacarose encontrados nas plântulas podem estar associados à sua degradação para o fornecimento de frutose e glicose e também à função regulatória que este açúcar parece exercer durante o alongamento radicular em plantas. Relatos na literatura mostram que altos níveis de sacarose durante a germinação de embriões somáticos de cenoura são inibitórios para o desenvolvimento da radícula (Huang e Villanueva, 1992; Yang et al., 2004). Estes autores sugerem que baixas concentrações de sacarose parecem regular o desenvolvimento da raiz, sendo este açúcar apontado como uma molécula sinalizadora para o alongamento da radícula.

3.2.3. Poliaminas

PAs totais foram quantificadas durante a germinação de *C. fissilis*. Houve um decréscimo estatisticamente significativo em todos os dias observados até o aparecimento da radícula, no 7º dia (Fig. 8). Estudos descritos na literatura relatam um aumento de PAs livres totais durante a fase inicial de embebição e um decréscimo ao final da germinação (Huang e Villanueva, 1992; Puga-Hermida et al., 2006; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011). Na plântula em crescimento no 17º dia, o conteúdo de PAs livres totais foi estatisticamente superior a todos os dias observados. Este aumento deve-se principalmente aos aumentos de Put observados neste tempo (Fig. 9).

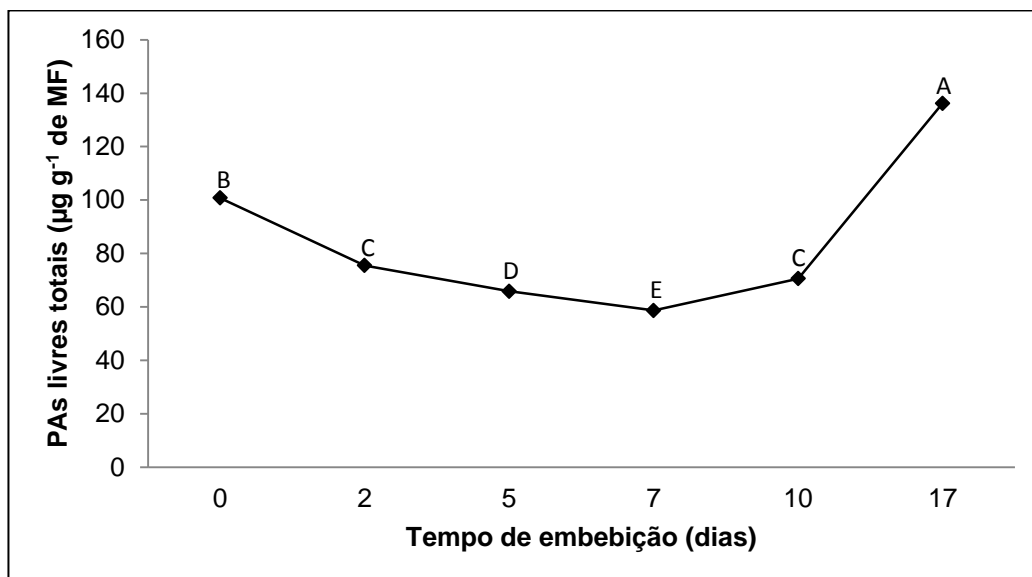


Figura 8: Conteúdo de PAs livres totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) durante a germinação de sementes de *C. fissilis* antes (0) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de incubação. MF: Massa Fresca. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n=3$; $CV_{\text{PAs livres totais}} = 4,5\%$).

Neste estudo foi possível detectar e quantificar Put, Spd e Spm durante todo o evento germinativo em *C. fissilis* (Fig. 9). Na semente madura as PAs em maior concentração foram Spd e Spm que diferiram estatisticamente de Put neste tempo. Conteúdos maiores de Spd e Spm na semente madura são um indicativo da maior participação destas PAs no final do desenvolvimento da semente, sugerindo seu importante papel na maturação e tolerância a dessecação em *C. fissilis*. Durante o desenvolvimento de embriões zigóticos de *Araucaria angustifolia* e *O. catharinensis* foi sugerido que Put é importante no início deste evento, quando a taxa de divisões celulares é maior, enquanto Spd e Spm seriam essenciais na fase final promovendo a diferenciação e alongamento celular (Astarita et al., 2003; Santa-Catarina et al., 2006). Em *O. catharinensis* sugere-se que a conversão de Put para Spm é um passo importante na fase final de desenvolvimento de embriões zigóticos onde o alongamento celular passa a ser o evento predominante (Santa-Catarina et al., 2006). Em *C. fissilis* sugere-se que Put pode ter sido transformada em Spd e Spm por ação das enzimas SPDS e SPMS ainda durante a maturação da semente. Similarmente, em sementes de

Zea mays foi verificado altos níveis de Spd e Spm ao final do processo de desenvolvimento da semente, sendo estas PAs apontadas como as mais importantes durante este evento (Cao et al., 2010). Este fato indica que os níveis e relações entre PAs durante o desenvolvimento da semente é específico para cada espécie.

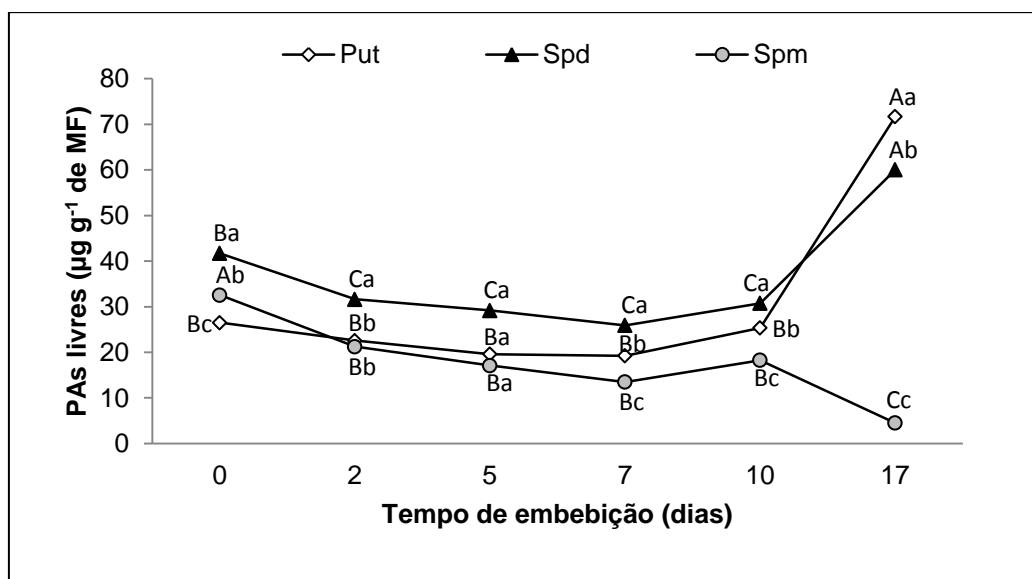


Figura 9: Conteúdo das PAs Put, Spd e Spm ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) durante a germinação de sementes de *C. fissilis* antes (0) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de incubação. MF: Massa Fresca. Put: Putrescina; Spd: espermidina; Spm: espermina. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas apresentam diferenças estatísticas significativas entre os tempos de embebição e letras minúsculas entre as diferentes PAs em cada tempo de embebição. ($n = 3$; $CV = 9,2\%$).

Durante o processo germinativo em *C. fissilis* a Spd esteve presente em maior quantidade durante todos os dias, exceto na plântula em crescimento no 17º dia. A Put, apesar de ser a segunda PA em maior concentração durante a germinação, somente diferiu estatisticamente da Spm, que esteve sempre em menor concentração, na emissão radicular no 7º dia. Resultados similares foram verificados durante a germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana* (Puga-Hermida et al., 2006), onde Spd também foi a PA em maior concentração durante o processo germinativo. Entretanto, nesta mesma espécie foi verificado que a

adição de altas concentrações de Put, além de tratamentos com Spd e Spm, inibiu a germinação (Mizra e Bagni, 1991). Estes dados mostram a existência de uma dinâmica nas concentrações de PAs e sugerem um papel estimulador de Put e Spd na germinação de *C. fissilis*, como o observado por Sinska e Lewandowska (2006) para sementes de maçã (*Malus domestica*). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que Spd é uma PA fundamental no processo germinativo de *C. fissilis*. Desta forma, sugere-se que para *C. fissilis* o decréscimo observado nos conteúdos das PAs é um aspecto intrínseco da espécie e necessário a promoção da germinação.

Observou-se um decréscimo das PAs, Spd e Spm durante todo processo germinativo até a emissão da radícula no 7º dia. Estes dados estão de acordo com os de Dias et al. (2009), os quais observaram um decréscimo de Spd e Spm durante todo o evento germinativo em *O. catharinenses*. Estes autores também verificaram um aumento de Put no início da germinação, com posterior decréscimo e estabilização durante o evento. Contrariamente, Pieruzzi et al. (2011) trabalhando com *O. odorifera* verificaram um aumento nos conteúdos de PAs durante todo o evento, ocorrendo incremento nos níveis de Spm após a protrusão da radícula, enquanto Spd foi constante e Put decresceu após este evento.

Na plântula em crescimento, ao final do 17º dia, houve um aumento significativo de Put e Spd e um decréscimo acentuado de Spm que diferiram estatisticamente do 10º dia. O aumento de Put pode estar associado a divisões celulares que estão ocorrendo nos tecidos jovens para promover o crescimento da planta. Matilla et al. (1996) associam a diferenciação celular a altos níveis de Spd e Spm, enquanto Put está mais relacionada à divisão celular. Adicionalmente, Kusano et al. (2008) sugerem que para algumas espécies Put e Spd são essenciais para embriogênese e crescimento, enquanto que Spm parece não ser essencial para o crescimento de plantas normais, estando mais associada ao desenvolvimento embrionário, confirmando assim a importância destas PAs durante a germinação e desenvolvimento da plântula em *C. fissilis*.

Com relação à razão das PAs [Put/(Spd+Spm)], observou-se que esta manteve o mesmo perfil durante todo o processo germinativo de *C. fissilis*, sem

diferenças estatísticas significativas. No entanto, na plântula em crescimento, no 17º dia, houve um aumento significativo da razão. (Fig. 10). Dias et al. (2009) e Pieruzzi et al. (2011), verificaram um aumento da razão entre PAs na germinação de *O. catharinensis* e *O. odorifera* respectivamente, sendo este indicado como um marcador do processo germinativo nestas espécies. No entanto, para *C. fissilis* a razão entre PAs não pode ser considerada como um marcador do processo germinativo. O maior valor de razão observado na plântula, que difere estatisticamente do período germinativo, pode ser em virtude das divisões mitóticas que ocorrem nestes tecidos com intensa atividade de crescimento, onde o conteúdo de Put é fundamental para as divisões celulares. Maki et al. (1991) usando inibidores de síntese de Put em suspensões celulares de *Catharanthus roseus* verificaram que estes inibidores causaram uma parada na proliferação celular impedindo a progressão do ciclo da fase G1 para S. Este resultado indica um papel indispensável de Put na promoção do ciclo celular e consequente divisões mitóticas.

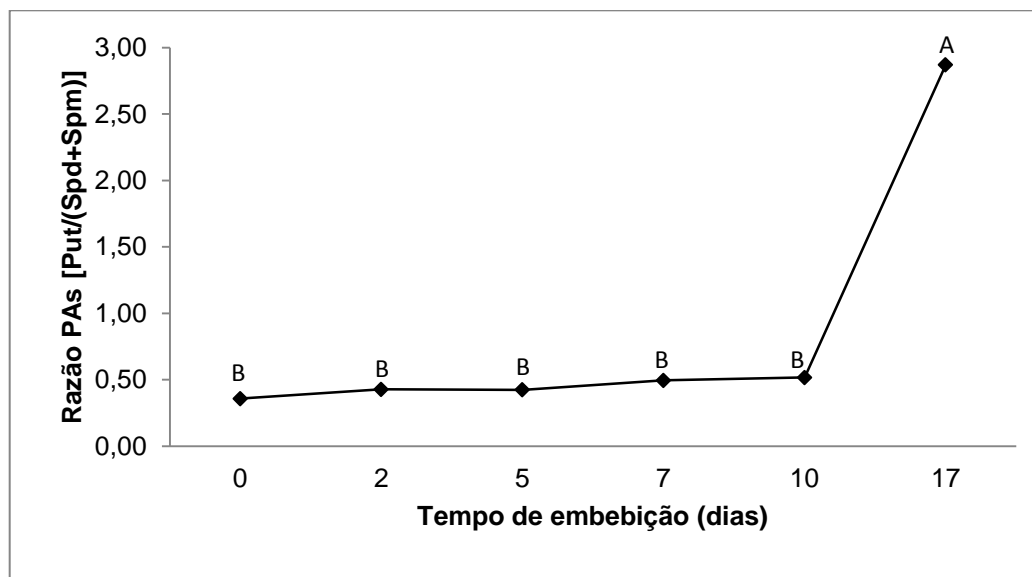


Figura 10: Razão entre PAs [Put/(Spd+Spm)] durante a germinação de sementes de *C. fissilis* antes (0) e após 2, 5, 7, 10 e 17 dias de incubação. MF: Massa Fresca. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). (n=3; CV_{razão PAs} = 13,6%).

Os resultados obtidos no presente estudo, além de serem inéditos para a espécie, mostram o papel de aminoácidos, carboidratos e PAs no controle da germinação em *C. fissilis*. Verificaram-se alterações no conteúdo e tipo destes compostos durante as diferentes fases da germinação, sugerindo o seu envolvimento neste processo.

4. CONCLUSÕES

- Sementes de *C. fissilis* iniciaram a protrusão radicular no 7º dia de embebição e apresentaram um modelo trifásico de absorção de água;
- Concentrações crescentes de aminoácidos livres totais foram verificadas ao longo da germinação, onde treonina, citrulina e ácido glutâmico foram observados em maior concentração;
- O conteúdo de carboidratos totais diminuiu durante o evento germinativo, aumentando na plântula em desenvolvimento;
- A sacarose apresenta-se como o carboidrato majoritário, enquanto frutose e glicose parecem ser carboidratos requeridos em pequenas quantidades durante a germinação;
- O conteúdo de PAs totais é decrescente até a protrusão radicular;
- A Spd é a PA predominante durante processo germinativo de *C. fissilis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alhadi, F A., Al-Asbahi, A. A. S., Alhammadi, A, S, A., Abdullah, Q. A. A. (2012) The effects of free amino acids profiles on seeds germination/dormancy and seedlings development of two genetically different cultivars of *Yemeni pomegranates*. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 8: 114-137.
- Astarita, L. V., Handro, W., Floh, E. I. S. (2003) Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Revista Brasileira de Botânica*, 26: 163-168.

Bewley, J. D., Black, M. (1994) *Seeds - physiology of development and germination*. 2. ed. New York: Plenum Press, 445p.

Bewley, J. D. (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.

Bonfante, L. V., Braga, L. F., Lavezo, A., Santos, W. M. (2011) Caracterização da curva de absorção de água de sementes de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). Anais do 4º Congresso de Iniciação Científica. Cáceres. Mato Grosso do Sul. V.7. CD- Rom 2178-7492.

Bown, A. W., Shelp, B. J. (1997) The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiology*, 115: 1-5.

Bown, A. W., Macgregor, K. B., Shelp, B. J. (2006) Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests? *Trends in Plant Science*, 11: 424-427.

Borek, S., Ratajczak, W., Ratajczak, L. (2006) Ultrastructural and enzymatic research on the role of sucrose in mobilization of storage lipids in germinating yellow lupine seeds. *Plant Science*, 170: 441-452.

Borisjuk, L., Rolletschek H., Wobus U., Weber H. (2003) Differentiation of legume cotyledon as related to metabolism gradients and assimilate transport into seeds. *Journal of Experimental Botany*, 54: 503-512.

Bove, J., Jullien, M., Grappin, P. (2001) Functional genomics in the study of seed germination *Genome Biology* 3 (1): reviews 1002.1-1002.5.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists: Rockville, MD, 1156 p.

Canton, F. R., Sua rez, M. F., Canovas, F. M. (2005) Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynthesis Research*, 83: 265-278.

Cao, D. D., Hua, J., Zhua, S. J., Hua, W. M., Knapp, A. (2010) Relationship between changes in endogenous polyamines and seed quality during development of sh2 sweet corn (*Zea mays* L.) seed. *Scientia Horticulturae*, 123: 301-307.

Carrijo, L. C., Borges, E. E. L., Pontes, C. A., Lopes, M. R., Brune, A. (2010) α -galactosidase activity and carbohydrate mobilization in seeds of *Dalbergia nigra* (Vell.) Alemão ex Benth. - Fabaceae (Brazilian Rosewood) During germination. *Cerne*, 16: 283-289.

Carvalho, N. M., Nakagawa, J. (2000) *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 588 p.

Carvalho, P. E. R. (2003) *Espécies arbóreas brasileiras*. Colombo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1039 p.

Catusse, J., Job, C., Job, D. (2008) Transcriptome and proteome wide analyses of seed germination. *C. R. Biologies*, 331: 815-822.

Coruzzi, G., Last, R. (2000) Amino acids. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists: Rockville, 358-410.

Corte, B. V., Borges, E. E. L., Pontes, C. A., Leite., I. T. A., Ventrella, M. C., Mathias, A. A. (2006) Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae Caesalpinioideae). *Revista Árvore*, 30: 941-949.

Dias, L. L. C., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Pieruzzi, F. P., Floh, E. I. S. (2009) Polyamines, aminoacids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. *Seed Science and Technology*, 37: 42-51.

Dias, L. L. C. (2009) Aspectos fisiológicos, bioquímicos e análise proteômica comparativa durante a maturação, germinação e conversão em plantas de embriões de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). Tese (Doutorado em Biotecnologia) - São Paulo - SP, Universidade de São Paulo - USP, 124p.

Ferreira, R. B., Melo, T. S., Teixeira, A. N. (1995) Catabolism of the seed storage proteins from *Lupinus albus*: fate of globulins during germination and seedlings growth. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 373-381.

Ferreira, C. S., Piedade, M. T. F., Tine, M. A. S., Rossatto, D. R., Parolin, P., Buckeridge, M. S. (2009) The role of carbohydrates in seed germination and seedling establishment of *Himatanthus sucuuba*, an Amazonian tree with populations adapted to flooded and non-flooded conditions. *Annals of Botany*, 104: 1111-1119.

Filson, P. B., Dawson-Andoh, B. E. (2009) Characterization of sugar from model and enzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detection. *Bioresource Technology*, 100: 6661-6664.

Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D. (2002) Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth. *Physiologia Plantarum*, 116: 238-247.

Ghelis, T., Bolbach, G., Clodic, G., Habricot, Y., Miginiac, E., Sotta, B., Jeannette, E. (2008) Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases are involved in abscisic acid-dependent processes in *Arabidopsis* seeds and suspension cells. *Plant Physiology*, 148: 1668-1680.

Gibson, S. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 93-102.

Glevarec, G., Bouton, S., Jaspard, E., Riou, M., Cliquet, J., Suzuki, A., Lilmami, A. M. (2004) Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germination growth in model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 219: 286-297.

- Henning, F. A., Mertz, L. M., Junior, E. A. J., Machado, R. D., Fiss, G., Zimmer, P. D. (2010) Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. *Bragantia*, 69: 727-734.
- Hernandez-Sebastia, C., Marsolais, F., Saravitz, C., Israel, D., Dewey, R.E., Huber, S.C. (2005) Free amino acid profiles suggest a possible role for asparagine in the control of storage product accumulation in developing seeds of low- and high-protein soybean lines. *The Journal of Experimental Botany*, 56: 1951-63.
- Huang, H. T., Villanueva, V. R. (1992) Inhibition of polyamine biosynthesis and seed germination in *Picea abies*. *Phytochemistry*, 31: 3353-3356.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271: 559-564.
- International Union for Conservation of Nature. (2010) The IUCN red list of threatened species. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em 25 de abril de 2012.
- Jander, G., Joshi, V. (2010) Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants. *Molecular Plant*, 3: 54-65.
- Joshi, V., Laubengayer, K. M., Schauer, K. M., Fernie, A., Jander, G. (2006). Two Arabidopsis threonine aldolases are non-redundant and compete with threonine deaminase for a common substrate pool. *Plant Cell*, 18: 3564-3575.
- Kang, J. H., Wang, L., Giri, A., Baldwin, I. T. (2006) Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid–isoleucine–mediated defenses against *Manduca sexta*. *The Plant Cell*, 18: 3303-3320.
- Kuehn, G. D., Phillips, G. C. (2005) Role of polyamines in apoptosis and other recent advances in plant polyamines. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 123-130.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228: 367-381.
- Magalhães, S. R., Lima e Borges, E. E., Berger, A. P. A. (2010) Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (vell.) S. F. Blake durante a germinação. *Ciência Florestal*, 20: 589-595.
- Maki, H., Ando, S., Kodama, H., Komamine, A. (1991) Polyamines and the cell Cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. *Plant Physiology*, 96: 1008-1013.
- Mapelli, S., Brambilla, I., Bertani, A. (2001) Free amino acids in walnut kernels and young seedlings. *Tree Physiology*, 21: 1299-1302.
- Martins, L., Lago, A. A. (2008) Conservação de semente de *Cedrela fissilis*: teor de água da semente e temperatura do ambiente. *Revista brasileira de sementes*, 30: 161-167.
- Masetto, T. E., Faria, J. M. R., Queiroz, S. E. E. (2008) Avaliação da qualidade de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* - Meliaceae) pelo teste de raios-x. *Ciência e Agrotecnologia*, 32: 1708-1712.

Matilla, A. J. (1996). Polyamines and seed germination. *Seed Science Research*, 6: 81-93.

Minocha, R., Dale, R. S., Cathie, R., Steele, K.D. and Minocha, S.C. (1999) Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 105: 155-164.

Mirza, J. I., Bagni, N. (1991) Effects of exogenous polyamines and difluoromethylornithine on seed germination and root growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 10: 163-168.

Morot-Gaudry, J. F., Job, D., Lea, P. J. (2001) Amino acid metabolism. In: Lea, P. J., Morot-Gaudry, J. F. *Plant nitrogen*. New York: Springer (eds.) Berlin Heidelberg 167-211 p.

Nkang, A. (2002) Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *Journal of Plant Physiology*, 159: 473-483.

Oliveira, I. C., Brenner, E., Chiu, J., Hsieh, M. H., Kouranov, A., Lam, H. M., Shin, M. J., Coruzzi, G. (2001) Metabolite and light regulation of metabolism in plants: Lessons from the study of a single biochemical pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological*, 34: 567-575.

Onomo, P. F., Niemenak, N., Ndoumou, D. O., Lieberei, R. (2010) Change in amino acids content during germination and seedling growth of *Cola sp.* *African Journal of Biotechnology*, 9: 5632-5642.

Pastorini, L. H., Bacarin, M. A., Trevizol, F. C., Bervald, C. M. P., Fernandes, H.S. (2003) Produção e teor de carboidratos não estruturais em tubérculos de batata obtidos em duas épocas de plantio. *Horticultura Brasileira*, 21: 660-665.

Pawłowski, T. A. (2009) Proteome analysis of Norwaymaple (*Acer platanoides* L.) seeds dormancybreaking and germination: influence of abscisic and gibberellic acids. *BMC Plant Biology*, 4: 9-48.

Pawłowski, T. A. (2010) Proteomic approach to analyze dormancy breaking of tree seeds. *Plant Molecular Biology*, 73: 15-25.

Penfield, S., Graham, S., Graham, I. (2005) Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: *Arabidopsis* as a model system. *Biochemical Society Transactions*, 33: 380-383.

Pieruzzi, F. P. (2009) Quantificação de aminoácidos, poliaminas, AIA, ABA e marcadores protéicos na germinação de sementes de *Ocotea odorifera*. Tese (Mestrado em Ciências) - São Paulo - SP, Universidade de São Paulo – USP, 69p.

Pieruzzi, F. P., Dias, L. L. C., Balbuena, T. S., Santa-Catarina, C., Santos, A. L. W dos, Floh, E. I. S. (2011) Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrante seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Annals of Botany*, 108: 337-345.

- Pontes, C. A., Borges, E. E. L., Borges, R. C.G., Soares, C. P. B. (2002) Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (Garapa) durante a embebição. *Revista Árvore*, 26: 593-601.
- Puga-Hermida, M. I., Gallardo, M., Rodriguez-Gacio, M. C., Matilla, A. J. (2006) Polyamine contents, ethylene synthesis, and BrACO2 expression during turnip germination. *Biology Plantarum*, 50: 574-580.
- Rimando, A. M., Perkins-Veazie, P. M. (2005) Determination of citrulline in watermelon rind. *Journal of Chromatography A*, 1078: 196-200.
- Rocha, M., Licausi, F., Araujo, W., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A. R., Van Dongen, J. T. (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 152: 1501-1513.
- Rock, C. D., Quatrano, R. S. (1995) The role of hormones during seed development. pp. 671-697 In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2. ed. Kluwer Academic Publishers.
- Rodriguez, C., Frias, J., Vidal-Valverde, C., Hernandez, A. (2008) Correlation between some nitrogen fractions, lysine, histidine, tyrosine, and ornithine contents during the germination of peas, beans, and lentils. *Food Chemistry*, 108: 245-252.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57:675-709.
- Rozan, P., Kuo, Y., Lambein, F. (2000) Free amino acids present in commercially available seedlings sold for human consumption. A potential hazard for consumers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 716-723.
- Santa-Catarina, C., Maciel, S. da C., Pedrotti, E. L. (2001). Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). *Revista Brasileira de Botânica*, 24: 501-510.
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Balbuena, T.S., Maranhão, M. E. E., Handro, W., Floh, E. I. S. (2006) IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regulation*, 49: 237-247.
- Sasaki, R. M., Felipe, G. M. (1992) Remoção dos cotilédones e desenvolvimento inicial de *Dalbergia miscolobium*. *Revista Brasileira de Botânica*, 15: 5-16.
- Shutov, A. D., Vaintraub, I. A. (1987) The degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*, 26: 1557-1566.
- Silva, F. F. S. (2010). Qualidade de sementes e produção de mudas de *Sideroxylon obtusifolium* (SAPOTACEAE) de duas procedências. Tese (Mestrado em Agronomia) - Areia - PB, Universidade Federal da Paraíba - UFPB, 120p.
- Silveira, V., Santa-Catarina, C., Tun, N. N., Scherer, G. F. E, Handro, W., Guerra, M. P. and 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: 91-98.

Sinska, I., Lewandowska, U. (2006) Polyamines and ethylene in the removal of embryonal dormancy in apple seeds. *Physiologia Plantarum*, 81:59-64.

Smeeckens S., Ma J., Hanson, J., Rolland, F. (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*. 13: 274-279.

Snedden, W. A., Fromm, H. (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science*, 3: 299-304.

Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1995) *Biometry*. 3. ed. New York: Freeman and Co, 957p.

Tabor, C. W., Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annual Review of Biochemistry*, 53: 749-790.

Tahir, M., Vandenberg, A., Chibbar, R. N. (2011) Influence of environment on seed soluble carbohydrates in selected lentil cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 596-602.

Tzin, V., Galili, G. (2010) The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis book*, 8: 1-32.

Weitbrecht, K., Muller, K., Leubner-Metzger, G. (2011) First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62: 3289-3309.

Yang, Z., Zhang, L., Diao, F., Huang, M., Wu, N. (2004) Sucrose regulates elongation of carrot somatic embryo radicles as a signal molecule. *Plant Molecular Biology*, 54: 441-459.

3.2. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS E POLIAMINAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES *IN VITRO* DE *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar os níveis endógenos de carboidratos e poliaminas (Pas) durante o desenvolvimento de brotações *in vitro* em *C. fissilis*. Plântulas germinadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. Segmentos nodais apicais e cotiledonares foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog), na ausência (0 μ M - controle) e presença (2,5 μ M) de 6-benziladenina (BA). Ao final de 30 dias de cultivo foram obtidos dados de crescimento e desenvolvimento das brotações. Amostras foram coletadas antes da inoculação (tempo 0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de incubação para análise do conteúdo de carboidratos e PAs por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Explantes nodais apicais e cotiledonares mostraram uma alta taxa de indução de brotações, com valores superiores a 94%. Maior número de brotos por explantes foi obtido nos tratamentos com BA, enquanto o maior comprimento das brotações foi verificado para explantes cotiledonares com BA.

Foram detectados frutose, glicose e sacarose durante os dias de cultivo para todos os tratamentos. As brotações exibiram um perfil similar de frutose e glicose durante a incubação, com acréscimo no início, durante a indução das brotações, decréscimo no meio da incubação e acréscimo novamente no final do cultivo, quando ocorre o alongamento das brotações, sugerindo que estes dois carboidratos estejam envolvidos na organogênese nesta espécie. O conteúdo de sacarose aumentou no início e diminuiu ao final do cultivo, sugerindo ser um carboidrato essencialmente para o fornecimento de frutose e glicose necessárias à indução e ao alongamento das brotações. Sugere-se que o BA estimula a degradação de sacarose para o fornecimento de frutose e glicose. Verificou-se que os conteúdos de putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) variaram nos diferentes tempos e tratamentos, sendo que em média foram obtidos valores maiores para Put seguida de Spd e Spm. Este resultado sugere a participação de Put e Spd nos eventos de divisão e diferenciação, que estão ocorrendo nos tecidos em desenvolvimento. Verificou-se um aumento de PAs totais no final do cultivo, sugerindo a atuação destas biomoléculas em eventos celulares necessários ao crescimento da plântula. A razão entre PAs aumentou no final do cultivo, pelo aumento de Put, indicando um biomarcador neste processo regenerativo.

ABSTRACT

The objective of this work was to identify and quantify endogenous levels of carbohydrates and PAs during *in vitro* shooting development in *Cedrela fissilis*. Seedlings germinated *in vitro* were used as the source of explants. Apical and cotyledonary nodal segments were inoculated in MS culture medium in absence (0 μM - controle) and presence (2,5 μM) of 6- benzyladenine (BA). After 30 days of cultivation, data about shoot growth and development was obtained. Samples were collected before inoculation (time 0) and after 3, 6, 10, 20 and 30 days of incubation for analysis of carbohydrate and polyamines (PAs) amounts through

high-performance liquid chromatography (HPLC). Nodal apical and cotyledonary explants showed a high rate of shooting induction with amounts greater than 94%. A higher number of shoots per explants was obtained in treatments with BA, while the highest shoot length was observed for cotyledonary explants with BA. Fructose, glucose and sucrose were detected during the days of cultivation for all treatments. Shoots showed a similar profile fructose and glucose during the incubation, with an increase at the beginning, during the induction, a decrease in the middle of the incubation process and another increase at the end of cultivation, when the elongation of the shoots occurs, suggesting that these two carbohydrates are involved in organogenesis in this species. An increase in the amount of sucrose at the beginning and lower levels at the end of cultivation were observed, suggesting that this carbohydrate supplies fructose and glucose required for the induction and elongation of shoots. One may suggest that BA stimulates the degradation of sucrose for the supply of fructose and glucose. It was found that the amounts of Put, Spd and Spm varied in different times and treatments, and greater amounts were obtained for Put, followed by Spd and Spm. This result suggests the involvement of Put and Spd in the division and differentiation events that are occurring in developing tissues. There is an increase in the total amount of PAs at the end of cultivation, suggesting the presence of these biomolecules in cellular events required for seedling growth. The ratio among PAs increases at the end of cultivation, by the increase of Put, indicating a biomarker in this regenerative process.

1. INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais oferece técnicas importantes como uma opção para a multiplicação eficaz e melhoria de espécies vegetais dentro de um curto período de tempo (Giri et al., 2004). Em especial, a cultura de tecidos pode ser usada como uma estratégia para salvar diversas espécies florestais

ameaçadas de extinção, principalmente aquelas que apresentam dificuldades de propagação por mecanismos naturais (Bunn et al., 2011).

O sucesso da regeneração *in vitro* é especialmente difícil para espécies recalcitrantes e depende do controle da morfogênese, que é influenciada por vários fatores, incluindo genéticos, tipo do explante, componentes nutricionais do meio de cultura, reguladores de crescimento vegetal e condições de cultura. Duas estratégias básicas usadas na micropropagação de espécies florestais são a regeneração direta e a indireta. A regeneração indireta, por passar pela fase de calo pode induzir variação somaclonal, tornando-se uma estratégia indesejável para a multiplicação clonal em larga escala. Portanto, a regeneração direta é o método mais confiável para a propagação clonal (Giri et al., 2004). Desta forma, a grande maioria dos trabalhos com espécies arbóreas disponíveis na literatura utiliza a via direta, utilizando como explantes, segmentos nodais apicais e cotiledonares para a indução de brotações *in vitro* (Pijut et al., 2012). Estes explantes contêm gemas axilares preexistentes, o que facilita a proliferação e confere maior estabilidade genética às novas plantas resultantes da micropropagação (Giri et al., 2004).

Tradicionalmente, o desenvolvimento de brotações é induzido utilizando-se meio de cultura enriquecido com citocininas que estimulam a divisão celular, podendo ser combinadas com outros compostos (Hartmann et al., 2002; Nicioli et al., 2008). Elas desempenham um papel importante regulando diversos processos que levam a proliferação e crescimento celular (Stoyanova-Bakalova e Petrov, 2009). Dentre as citocininas, a 6-benziladenina (BA) é uma das mais utilizadas para a promoção do desenvolvimento de gemas axilares, especialmente em espécies arbóreas (Giri et al., 2004). Este regulador de crescimento vegetal atua superando a dominância apical exercida pelas auxinas nos explantes de segmentos nodais apicais e inibindo seu efeito sobre gemas de segmentos nodais abaixo do apical, estimulando o desenvolvimento de brotações (Mohebalipour et al., 2012). Porém, os mecanismos envolvidos na capacidade que as células vegetais têm de regeneração *in vitro* ainda não são totalmente conhecidos. Abordagens do metabolismo celular são essenciais para o conhecimento da função que as células vegetais exercem, e a cultura de tecidos pode ser usada

como uma ferramenta importante na compreensão do processo (Bunn et al., 2011).

Desta forma, estudos do metabolismo bioquímico que identifiquem os níveis endógenos de biomoléculas, como carboidratos e poliaminas (PAs) envolvidas no desenvolvimento de brotações, em especial em espécies arbóreas, são pouco desenvolvidos, e são fundamentais para entender os mecanismos envolvidos na capacidade celular de regeneração.

Dentre estes compostos, os carboidratos são moléculas fornecedoras de energia para a célula, e também estão envolvidos em eventos de sinalização celular, transporte e expressão gênica (Carrier et al., 1999; Smeekens et al., 2010). Estes compostos atuam em vários processos associados ao desenvolvimento vegetal, tais como, embriogênese, germinação de sementes, desenvolvimento de plântulas, formação de folhas e raízes (Gibson, 2005). Atuam também como substrato para o crescimento e reguladores da morfogênese e diferenciação celular (Smeekens, 2000), podendo ser moléculas-chave na modulação dos processos morfogenéticos *in vitro*. No desenvolvimento de brotações *in vitro* foi verificado que carboidratos adicionados ao meio de cultura exercem papel fundamental no processo organogênico, atuando como agentes osmóticos, sendo absorvidos através da membrana plasmática (Zohra et al., 2009). Eles também atuam promovendo a indução e desenvolvimento de brotações e a embriogênese somática (Gemmas e Bessa, 2006; Ceasar e Ignacimuthu, 2010). Teores endógenos de carboidratos durante a embriogênese de *Acca sellowiana* indicam que estes estão envolvidos no desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos (Pescador et al., 2008). Entretanto, embora vários estudos mostrem a importância da suplementação de carboidratos no meio de cultura para a organogênese *in vitro*, não existem muitos estudos mostrando o metabolismo endógeno destes compostos associados a este processo morfogenético.

As PAs são pequenas aminas alifáticas carregadas positivamente, que devido a esta característica, ligam-se a moléculas com carga negativa como DNA, RNA e proteínas influenciando diretamente em processos de replicação, transcrição, tradução, divisão e expansão celular (Kuznetsov et al., 2006; Kusano,

2008). As PAs são importantes moduladoras de vários eventos celulares, atuando em processos de desenvolvimento e crescimento vegetal, tais como, divisão e diferenciação celular, organogênese e embriogênese (Minocha et al., 1999; Silveira et al., 2004, 2006; Santa-Catarina et al., 2006). As principais PAs encontradas nos vegetais são putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) (Bouchereau et al., 1999). Estudos mostram que a relação entre as PAs é um importante biomarcador da regeneração em plantas (Shoeb et al., 2001). Porém, não existem estudos mostrando os níveis endógenos de PAs durante a organogênese *in vitro* para espécies arbóreas, em especial aquelas ameaçadas de extinção.

Cedrela fissilis Vellozo é uma arbórea nativa da Mata Atlântica, que devido à sua importância econômica para a produção de madeira, foi intensamente explorada ao longo dos anos. Atualmente, encontra-se ameaçada de extinção na categoria em perigo (IUCN, 2010). Estudos visando estabelecer protocolos de micropropagação foram desenvolvidos para esta espécie (Nunes et al., 2002; Amaral 2006), bem como protocolos de regeneração *in vitro* por meio da embriogênese somática (Vila et al., 2009), produção artificial e criopreservação de sementes (Nunes et al., 2003). Entretanto, até o momento, não existem estudos que mostram o papel de carboidratos e PAs na organogênese *in vitro* desta espécie.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi indentificar e quantificar os níveis endógenos de carboidratos e PAs durante o desenvolvimento de brotações *in vitro* em *C. fissilis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Utilizaram-se segmentos nodais apicais e nodais cotiledonares como explantes para a indução de brotações *in vitro*. Estes explantes foram obtidos a partir de plântulas de *C. fissilis* germinadas *in vitro*. As sementes foram obtidas do Viveiro Caiçara localizado no Estado de São Paulo - SP.

2.2. Indução de brotações

Para a obtenção dos explantes, sementes, após a assepsia, foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com sacarose (20 g L^{-1}) e fitagel ($2,0 \text{ g L}^{-1}$). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, a $1,5 \text{ atm}$ por 15 min. Após a inoculação, as sementes foram colocadas para germinar em sala de cultura com fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de $22 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Plântulas com 60 dias de idade foram utilizadas como fonte de explante, isolando-se segmentos nodais cotiledonares e nodais apicais (Fig. 1). A metodologia utilizada para os estudos de indução de brotações baseou-se naquela proposta por Nunes et al. (2002), inoculando-se os explantes em meio de cultura com $2,5 \text{ } \mu\text{M}$ (BA), o tratamento que propiciou a melhor resposta para número de indução de brotações por explante, e na ausência de BA como controle.

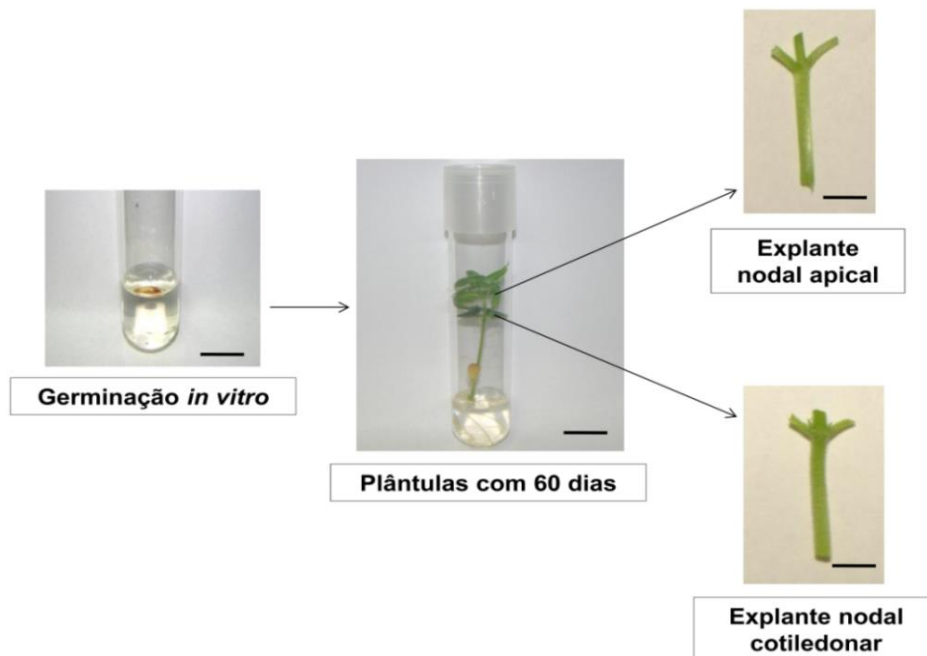


Figura 1: Esquema geral da obtenção dos explantes de segmentos nodais apicais e nodais cotiledonares a partir de plântulas de *C. fissilis* germinadas *in vitro*. Barras = 1 cm.

Explantos de segmentos nodais apicais e nodais cotiledonares foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L^{-1}), fitagel ($2,0 \text{ g L}^{-1}$) e BA (0 e $2,5 \mu\text{M}$). Desta forma, os tratamentos foram os seguintes: explantes nodais apicais sem (A0) e com BA (A2,5) e explantes nodais cotiledonares sem (C0) e com BA (C2,5). O pH foi ajustado para 5,7 e o meio (30 mL/frasco) foi distribuído em frascos de cultura (250 mL), seguido de autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, a $1,5 \text{ atm}$ por 15 min . Após a autoclavagem, as culturas foram mantidas em sala de cultura com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ao final dos 30 dias de cultura foram obtidos dados de percentagem de indução de brotações, número de brotos por explante e comprimento de brotações. Para o estudo do metabolismo endógeno de carboidratos e PAs durante o desenvolvimento das brotações, explantes cultivados nas condições citadas foram coletados antes da inoculação (tempo 0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de incubação (Fig. 2).

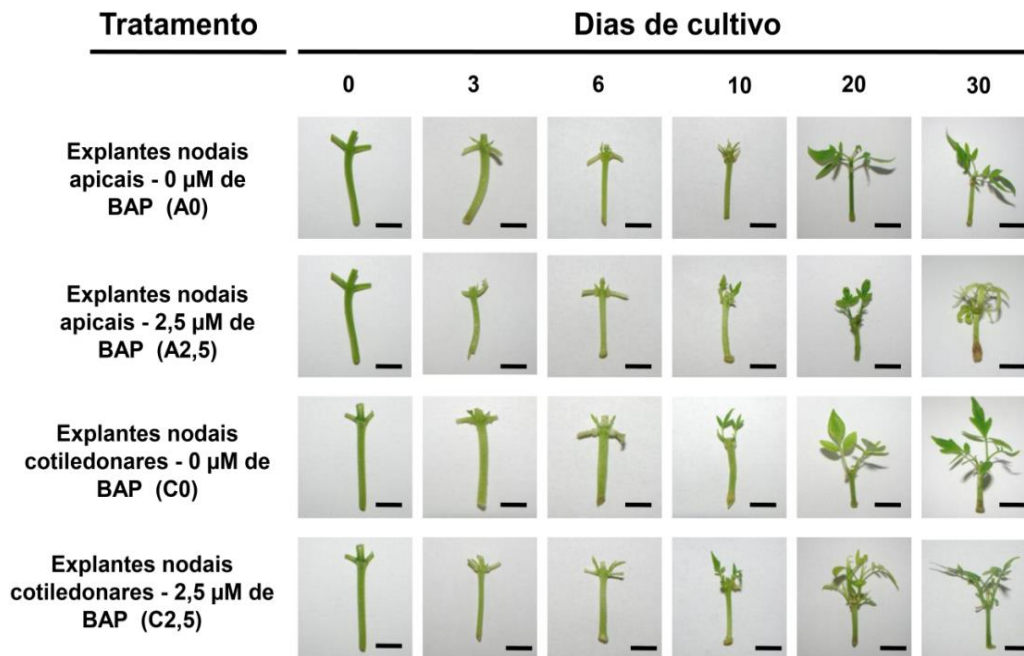


Figura 2: Aspectos morfológicos dos explantes de segmentos nodais apicais (A) e nodais cotiledonares (C) de *C. fissilis* durante o processo de indução e desenvolvimento de brotações em meio de cultura sem ($0 \mu\text{M}$) e com ($2,5 \mu\text{M}$) de BA. A0 e A2,5: explantes nodais apicais sem e com regulador de crescimento, respectivamente. C0 e C2,5: explantes nodais cotiledonares sem e com regulador de crescimento, respectivamente. Barras = $0,5 \text{ cm}$.

As amostras coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 °C até a realização das análises bioquímicas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para cada análise foram utilizados 25 repetições constituídas por um frasco com quatro explantes, sendo coletadas 3 amostras ao acaso de 5 frascos/tratamento em cada período de coleta.

2.3. Análises bioquímicas

2.3.1. Carboidratos

A análise de carboidratos foi baseada na metodologia proposta por Filson e Dawson-Andoh (2009), com modificações, conforme descrito no item 2.6.2, do capítulo 1.

2.3.2. Poliaminas

A análise de PAs livres foi conduzida conforme descrito por Santa-Catarina et al. (2006), conforme descrito no item 2.6.3, do capítulo 1.

2.4. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK a 5 % (Sokal e Holhf, 1995) utilizando o software Sistema para Análises Estatísticas (SAEG[®]).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Indução de brotações

Ao analisar a resposta morfogênica *in vitro* dos explantes de *C. fissilis* verificou-se uma alta percentagem de indução de brotações, com respostas similares para todos os tratamentos, obtendo-se um percentual de indução de 94 % e 95 % para os explantes nodais apicais sem (A0) e com BA (A2,5), respectivamente, e de 97 % e 94 % para os explantes nodais cotiledonares sem

(C0) e com BA (C2,5), respectivamente (Fig. 3A). Estes resultados são similares aos descritos por Nunes et al. (2002), os quais verificaram uma indução de 99 % e 100 % para os explantes de segmentos nodais apicais e nodais cotiledonares, respectivamente, em meio MS contendo 2,5 μ M de BA. Uma indução de brotações de 90 % a 100 % em explantes nodais cotiledonares sem a adição de BA também foi observada para *C. fissilis* (Amaral, 2006). Estes resultados sugerem que, para esta espécie, não há necessidade de reguladores de crescimento para a indução de brotações e que ambos os explantes, segmentos nodais apicais ou nodais cotiledonares, possuem resposta similar para este parâmetro analisado.

Quanto ao parâmetro número de brotos/explante verificou-se diferenças estatísticas significativas quanto à adição de BA ao meio de cultura para ambos os explantes nodais apicais e nodais cotiledonares (Fig. 3B). Comparando os tratamentos A0 (apicais sem BA) e C0 (cotiledonares sem BA), verificou-se que houve diferença significativa com médias de 1,15 e 1,95 brotos por explante, respectivamente. Em *Cedrela odorata* verificou-se nestes mesmos tratamentos (A0 e C0) um número médio de 0,55 e 0,45 brotos/explante. Quando BA foi adicionado ao meio obtiveram-se os melhores resultados na concentração de 4,44 μ M produzindo em média 1,45 e 1,5 brotos/explante tanto para explantes nodais apicais quanto cotiledonares (Saldanha, 2010). Em *C. fissilis*, Nunes et al. (2002) obtiveram uma média de 2,7 brotos/explante em explantes nodais cotiledonares (C2,5), enquanto Amaral (2006) obteve o mesmo resultado quando utilizou 5 μ M de BA. Verificou-se que a concentração de reguladores de crescimento vegetal adequados para proporcionar o maior número de brotos varia dentro da mesma espécie e podem estar associados ao genótipo da planta e à fonte de explante.

Comparando-se os tipos de explantes nodais apicais (A2,5) e cotiledonares (C2,5) na presença de BA, verificou-se que não houve diferenças significativas para número de brotos/explante quando aplicado BA (Fig. 3B). Estes dados indicam que explantes nodais apicais e cotiledonares apresentam resposta morfogênica *in vitro* semelhante quando BA é usado como regulador de crescimento. Por outro lado, segmentos nodais apicais quando inoculados em

meio de cultura sem regulador de crescimento (A0) mostraram-se pouco eficazes para induzir brotações quando comparados com os demais. Neste sentido, os resultados sugerem que a suplementação do meio de cultura com BA é necessária para induzir um número maior de brotos/explantes nos dois tipos de explantes utilizados, sendo recomendado seu uso nesta espécie. Vários estudos mostram a importância da aplicação de citocininas em especial BA para a indução de brotações em explantes nodais de espécies arbóreas. Em *Dalbergia sissoo* e *Terminalia beleirica* o uso de 4,44 μM de BA foi eficiente para o estabelecimento de brotações *in vitro* em meio MS (Joshi et al., 2003; Ramesh et al., 2005), enquanto que em *Ceiba pentrandia* 2,2 μM de BA foi o suficiente para a proliferação de brotos *in vitro* (Silva et al., 2010). A espécie *Albizia odoratissima* foi micropropagada usando-se 3,3 μM BA (Borthakur et al., 2011). Similarmente, em meristemas apicais de *Nicotiana tabacum* foi verificado que a concentração de 3 μM de BA foi eficiente na indução de brotos, enquanto a aplicação de 100 μM inibiu o crescimento de gemas axilas e acelerou o processo de senescência (Uzelac et al., 2012). Estudos mostram que as citocininas estão envolvidas na proliferação celular em plantas conduzindo ao crescimento e à morfogênese. Elas atuam definindo o tamanho, atividade e manutenção dos meristemas apicais por meio de um controle no balanço entre divisão e diferenciação celular (Uzelac et al., 2012). Nestes tecidos as citocininas controlam o ciclo celular influenciando nas transições entre as fases G1/S e G2/M durante a mitose (Uzelac et al., 2012). Em células meristemáticas de raiz em *Vicia faba* foi verificado que 0,54 μM de BA acelerou a progressão do ciclo celular através da ativação de ciclinas dependentes de quinase em pontos de controle do ciclo (Polit et al., 2003).

Em relação ao comprimento das brotações, não há diferenças significativas comparando-se os explantes nodais apicais (A0) e nodais cotiledonares (C0) sem a suplementação de BA (Fig. 3C). Porém, para os dois tipos de explantes (nodais apicais e nodais cotiledonares) suplementados com BA (2,5 μM), verificaram-se diferenças significativas apenas para explantes nodais cotiledonares, sendo este regulador de crescimento eficaz na promoção do comprimento de brotações quando usado neste tipo de explante.

Adicionalmente, verificou-se que explantes nodais apicais não apresentaram resposta significativa quando adicionado BA foi adicionado ao meio de cultura, apresentando comprimento médio das brotações de 0,49 cm e 0,55 cm para A0 e A2,5, respectivamente. Entretanto, para os explantes nodais cotiledonares verificou-se que a adição de BA (C2,5) foi eficiente, promovendo brotações com um comprimento médio de 1,12 cm, comparativamente com os explantes sem BA (C0), os quais apresentaram comprimento médio de 0,49 cm (Fig. 3C). Resultados contrários foram observados para esta mesma espécie por Nunes et al. (2002). Estes autores observaram comprimento médio de 1,1 cm para o tratamento com explantes nodais apicais com 2,5 μM de BA (A2,5) e 1,7 cm para explantes nodais cotiledonares com 2,5 μM de BA (C2,5), enquanto para explantes nodais cotiledonares sem BA (C0) verificou-se um tamanho médio de 2 cm (Nunes et al., 2002). Já em *C. odorata* o tratamento com explantes nodais cotiledonares sem BA (C0) apresentou média de 0,74 cm e o tratamento com 4,4 μM de BA resultou em 0,92 cm (Saldanha, 2010). Estes resultados sugerem que o BA, apesar de resultar em resposta similar para número de brotos em segmentos nodais apicais e cotiledonares em *C. fissilis* (Fig. 3B), é fundamental para induzir o maior comprimento de brotações em segmentos nodais cotiledonares comparativamente aos nodais apicais (Fig. 3C). Ribas et al. (2005) observaram para *Aspidosperma polyneuron* uma tendência no aumento do número de brotos por explante a medida que utilizou concentrações crescentes (2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM) de BA em explantes de segmentos nodais cotiledonares. Entretanto, estes autores verificaram que à medida que as concentrações foram aumentando houve uma diminuição no comprimento das brotações. Também observaram que a concentração de 2,2 μM de BA produziu em média 2 brotos/explante, corroborando com os resultados do presente trabalho, onde 2,5 μM de BA promoveu o maior número de brotos/explante. Assim como em *C. fissilis*, a adição de BA também tem sido mais eficiente para promover a multiplicação *in vitro* em diversas espécies lenhosas, como *Ficus carica* (Fráguas et al., 2004), *Swietenia macrophylla* (Schottz et al., 2007), *Cabralea canjerana* (Rocha et al., 2007) e *C. odorata* (Saldanha, 2010).

Além da presença de BA, o tipo de explante mostrou ser fundamental para o comprimento das brotações em *C. fissilis*, visto que explantes nodais cotiledonares apresentaram maior comprimento na presença de BA comparativamente aos explantes nodais apicais. O balanço entre auxinas e citocininas parece ser fundamental no alongamento de brotações em *C. fissilis*. A auxina é transportada do ápice caulinar para a base da planta formando um gradiente de concentração ao longo do caule (Faria et al., 2007). Desta forma, explantes nodais apicais teriam maior conteúdo de auxina comparativamente aos explantes nodais cotiledonares. Assim, o balanço entre auxinas e citocininas teria influência direta no alongamento das brotações sendo a atuação do BA favorecida em explantes nodais cotiledonares por estes conterem, provavelmente, menor conteúdo de auxina endógena.

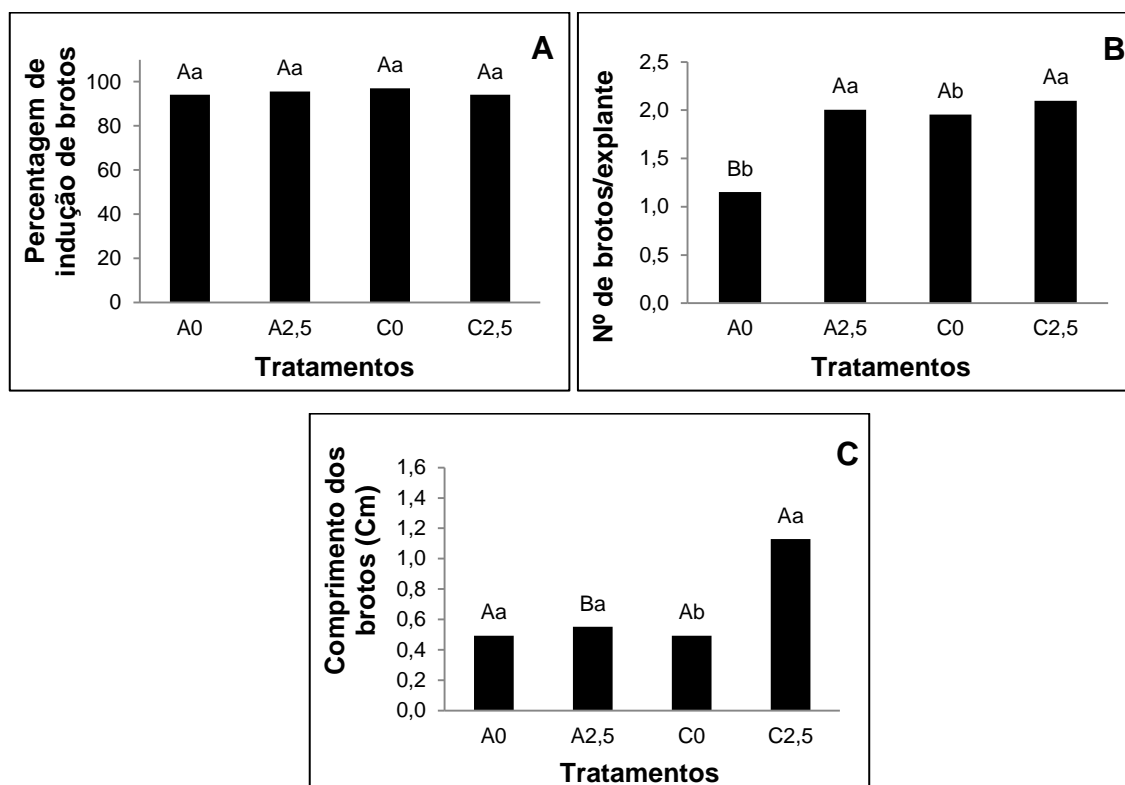


Figura 3: Percentagem de indução de brotações (A), número de brotos por explante (B) e comprimento de brotos (C) em explantes nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* nos tratamentos A0 e A2,5 (explantes nodais apicais sem e com 2,5 μ M de BA, respectivamente) e C0 e C2,5 (explantes nodais cotiledonares sem e com 2,5 μ M de BA, respectivamente). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o SNK ($P < 0,05$). Letras maiúsculas apresentam diferenças estatísticas comparando-se os tratamentos A0 e C0 e A2,5 e C2,5. Letras minúsculas apresentam diferenças estatísticas entre a concentração de BA para cada tipo de explante, apical ou cotiledonar. (Média, $n = 25$, $CV_{\text{percentagem de indução brotação}} = 11,2\%$, $CV_{\text{número de brotos}} = 12\%$, $CV_{\text{comprimento das brotações}} = 51,7\%$).

3.2. Perfil bioquímico

3.2.1. Carboidratos

Níveis endógenos de carboidratos foram quantificados durante a indução e desenvolvimento de brotações visando entender melhor o papel destes compostos na morfogênese *in vitro* de *C. fissilis*. O papel dos carboidratos na cultura de tecidos tradicionalmente está ligado à suplementação do meio de cultura e às melhorias do potencial osmótico (Nakagawa et al., 2001; Gaj, 2004). Entretanto, estudos mostram que eles exercem ainda um papel importante na sinalização celular, atuando como agentes promotores do crescimento

(Smeekens et al., 2010). Relatos na literatura da adição de carboidratos ao meio de cultivo para a promoção do desenvolvimento de brotações são comuns. No entanto, não há estudos associados ao metabolismo endógeno destas biomoléculas, principalmente em arbóreas nativas da Mata Atlântica ameaçadas de extinção.

Dentre os carboidratos analisados no presente estudo verificou-se a presença de frutose, glicose e sacarose durante todos os dias de cultivo para todos os tratamentos testados. Os níveis endógenos de frutose (Fig. 4) no tempo 0 (explantes antes da inoculação) foram iguais para todos os tratamentos utilizados. Ao longo da incubação, verificou-se um aumento significativo deste carboidrato no 3º dia em todos os tratamentos, provavelmente oriundo da absorção de sacarose do meio e sua metabolização gerando seus produtos, frutose e glicose. Segundo Gema e Bessa (2006), a importação de carboidratos do meio de cultura no começo do cultivo é importante para iniciar a indução e promover o crescimento das brotações. No 10º dia de cultivo houve um declínio significativo no conteúdo de frutose no tratamento com explantes nodais apicais sem BA (A0), enquanto os demais tratamentos mantiveram-se com valores semelhantes. Por outro lado, no 20º ao 30º dia houve um aumento dos conteúdos endógenos de frutose em relação ao 10º para os tratamentos com explantes nodais apicais sem (A0) e com BA (A2,5) e nodais cotiledonares com BA (C2,5), enquanto para os explantes cotiledonares sem BA (C0) os níveis endógenos se mantiveram baixos e sem diferenças significativas durante todo o tempo de cultivo. Ao final dos 30º dia verificou-se um aumento significativo de frutose para os dois tipos de explantes em meio contendo BA em relação ao controle (sem a adição de BA). Os maiores conteúdos de frutose no início e no final do cultivo sugerem uma participação deste carboidrato nos processos de indução e alongamento das brotações, respectivamente. Resultados similares foram verificados para brotações obtidas a partir de calos em *Digitalis lanata* (Zohra et al., 2009). Adicionalmente, em explantes nodais de *Anacardium occidentale* foi verificado que a frutose é essencial para promover o comprimento das brotações, enquanto maltose aumenta o número de brotos (Gema e Bessa, 2006). O efeito de frutose no alongamento de brotações também foi relatado para *Prunus cerasus*

(Borkowska e Szczerba, 1991). Para *C. fissilis*, a menor concentração de frutose em explantes nodais cotiledonares sem BA (C0) no final do cultivo, em relação aos demais tratamentos, pode estar relacionada com o menor comprimento médio destas brotações neste tratamento, sugerindo que frutose tem um papel fundamental para o alongamento de brotos nesta espécie. Adicionalmente, a adição do regulador de crescimento BA aumentou os níveis endógenos de frutose nos últimos dias de cultivo em *C. fissilis*, sugerindo a existência de uma rede de sinalização entre o metabolismo de açúcares e os reguladores de crescimento vegetal, na qual as citocininas poderiam estar atuando na indução de invertases e transportadores de hexoses regulando o metabolismo de açúcares, conforme relatado por Gibson (2003).

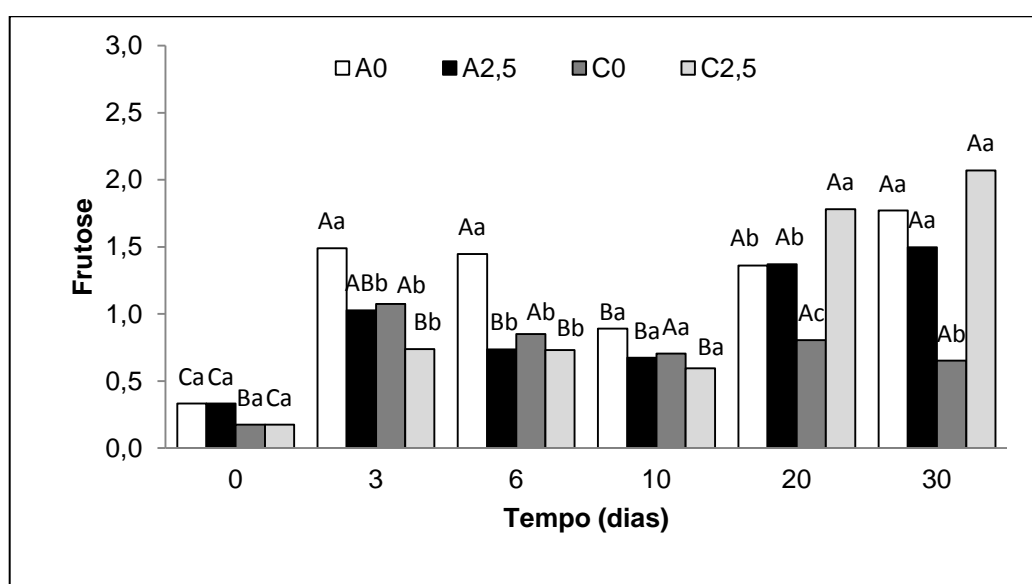


Figura 4: Conteúdo endógeno de frutose (mg.g^{-1} de MF) em explantes de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* antes (0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de cultivo. A0 e A2,5: explantes nodais apicais sem e com 2,5 μM de BA, respectivamente. C0 e C2,5: explantes nodais cotiledonares sem e com 2,5 μM de BA, respectivamente. Médias seguidas pela mesma não diferem estatisticamente entre si de acordo com o SNK ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre si em cada tempo de incubação comparando todos os tratamentos. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre os diferentes tempos de incubação para cada tratamento. (Média, $n = 3$, $\text{CV} = 21,6\%$).

Analisando o conteúdo endógeno de glicose verificou-se que não houve diferença estatística significativa no tempo 0 para os dois tipos de explantes antes da inoculação nos diferentes tratamentos testados (Fig. 5). No entanto, houve um aumento nos níveis endógenos deste carboidrato no 3º dia de incubação, porém sem diferença estatística significativa em relação ao tempo 0 apenas para os explantes de segmentos nodais cotiledonares com BA (C2,5). Ao analisar os conteúdos de glicose do 6º ao 10º dia observou-se uma estabilidade no conteúdo para os tratamentos de explantes nodais apicais com BA (A2,5) e nodais cotiledonares sem (C0) e com BA (C2,5), porém houve uma significativa redução do conteúdo deste açúcar nos explantes nodais apicais sem BA (A0). Valores maiores de glicose foram encontrados do 20º ao 30º de cultivo para os explantes nodais apicais sem (A0) e com BA (A2,5) e cotiledonares com BA (C2,5) (Fig.5). Os explantes nodais cotiledonares sem BA (C0) não apresentaram diferenças no conteúdo de glicose durante todo o período de cultivo.

Comparativamente, verificou-se que frutose e glicose exibiram um perfil de variação similar durante a indução e desenvolvimento das brotações em *C. fissilis* (Figs. 4 e 5). A dinâmica destes carboidratos seguiu um padrão de acréscimo no início (até o 3º dia), decréscimo no meio (entre 6º e o 10º dia) e acréscimo novamente no final da incubação, sugerindo que estes dois carboidratos podem estar diretamente envolvidos na indução de brotos, que se dá no início da incubação, e no alongamento das brotações, que se dá no final da incubação. Adicionalmente, o aumento no conteúdo destes dois carboidratos verificados no início da incubação neste trabalho pode ser associado com a mesma percentagem de indução de brotações encontradas para todos os tratamentos, sugerindo a atuação da glicose e frutose na indução das brotações. Similarmente, Gema e Bessa (2006) verificaram que a adição de maltose e frutose ao meio de cultura aumentou a indução de brotações em genótipos de *A. occidentale*. Estes autores relatam que glicose e frutose seriam as primeiras moléculas a atuarem na sinalização enquanto o papel da sacarose seria inicialmente de fornecimento destas hexoses para somente depois atuar também como sinalizadora no processo de desenvolvimento das brotações. É possível que, o aumento destas hexoses no início da incubação esteja associado à

absorção e degradação da sacarose (Fig. 6) para fornecer frutose e glicose necessárias à sinalização para a indução e alongamento das brotações. Adicionalmente, verificou-se, de um modo geral, que o aumento das hexoses frutose e glicose no final da incubação pode estar relacionado com o alongamento das brotações em *C. fissilis*.

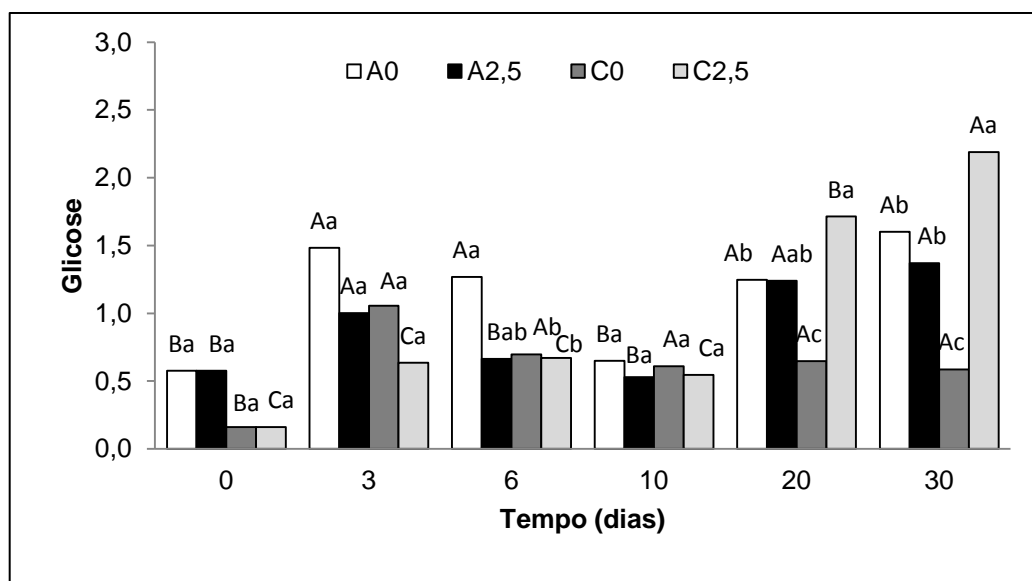


Figura 5: Conteúdo endógeno de glicose (mg.g^{-1} de MF) em explantes de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* antes (0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de incubação. A0 e A2,5: explantes nodais apicais sem e com $2,5 \mu\text{M}$ de BA, respectivamente. C0 e C2,5: explantes nodais cotiledonares sem e com $2,5 \mu\text{M}$ de BA, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre si em cada tempo de incubação comparando todos os tratamentos. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre os diferentes tempos de incubação para cada tratamento. (Média, $n = 3$, $\text{CV} = 29,2\%$).

Como verificado para frutose e glicose, o conteúdo de sacarose também aumentou até o 3º dia de incubação para todos os tratamentos, sendo significativo estatisticamente para A0, A 2,5 e C0 (Fig. 6). Este aumento sugere uma intensa absorção da sacarose adicionada no meio de cultura, o qual também é importante para o fornecimento de hexoses, como frutose e glicose, por meio de sua degradação.

Para os explantes nodais apicais sem BA (A0) verificou-se valores similares no conteúdo de sacarose até o 20º dia, seguido de um aumento significativo no 30º dia de incubação, quando se verificou as maiores concentrações deste carboidrato comparativamente aos demais tratamentos (Fig. 6). Em explantes nodais apicais na presença de BA (A2,5) verificou-se uma estabilidade no conteúdo de sacarose do 3º até o 6º dia, porém em menor concentração que nos mesmos explantes sem BA (A0), seguido de um decréscimo significativo do 6º até o 10º dia, mantendo valores similares até o 30º dia de incubação.

Nos explantes nodais cotiledonares sem a adição de BA (C0) houve uma redução no conteúdo de sacarose entre o 3º e 6º dia de incubação, aumentando significativamente no 10º dia, declinando significativamente no 20º dia e mantendo-se estável até o 30º dia de incubação (Fig. 6). Para os explantes nodais cotiledonares mantidos na presença de BA (C2,5) não houve diferença estatística significativa durante o período de incubação, entretanto, observou-se uma leve redução do 3º ao 10º dia, seguido de pequeno aumento do 20º ao 30º dia de incubação. Em explantes nodais cotiledonares de *Bixa orellana* foi verificado que sacarose, juntamente com glicose, adicionadas em meio MS na concentração de 87,6 mM, foram os melhores carboidratos tanto para indução quanto para número de brotos por explante (Neto et al., 2003). Desta forma, as variações encontradas nestes tratamentos sugerem uma dinâmica no metabolismo de sacarose durante a indução e alongamento de brotações, que pode estar associada ao fornecimento de hexoses necessárias aos eventos morfogênicos em *C. fissilis*.

As menores concentrações de sacarose foram encontradas nos explantes nodais apicais com BA (A2,5), e nodais cotiledonares sem (C0) e com BA (C2,5). No entanto, este fato não afetou a indução de brotações nestes tratamentos, corroborando com os resultados encontrados por Debnath (2004). Este autor verificou que concentrações menores de sacarose adicionadas ao meio de cultura também estimularam a indução de brotações em *Vaccinium angustifolium*.

A sacarose é considerada o melhor carboidrato para a suplementação no meio de cultura (Fuentes et al., 2000; Neto et al., 2003). Isto se deve à sua eficiente absorção por meio da membrana plasmática (Borkowska e Szczerba,

1991). Neste trabalho a sacarose exógena parece ser um carboidrato essencial para a indução e o crescimento das brotações, sendo absorvido pela membrana plasmática para fornecer frutose e glicose necessárias a estes eventos morfogênicos em *C. fissilis*.

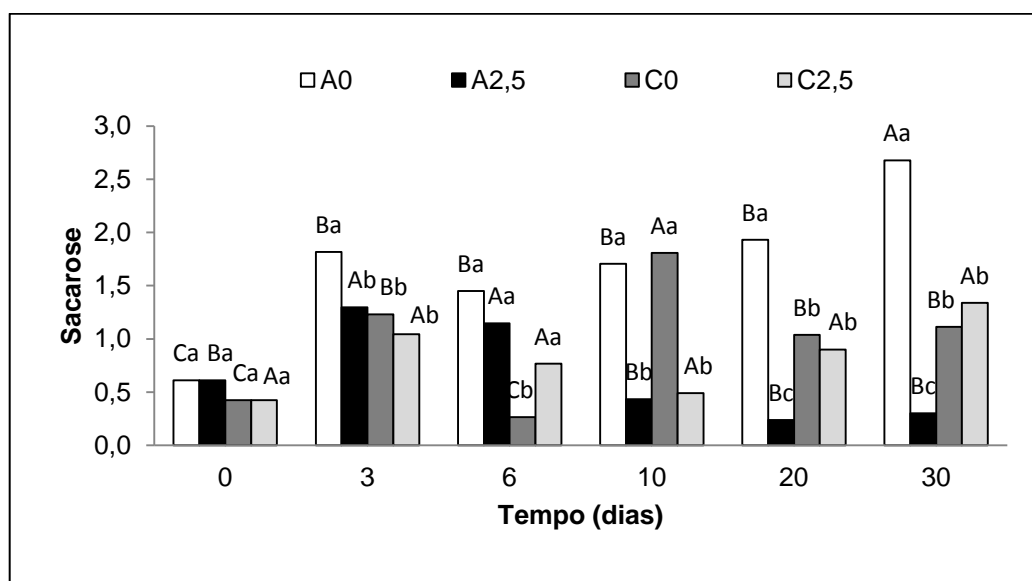


Figura 6: Conteúdo endógeno de sacarose (mg.g^{-1} de MF) em explantes de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* antes (0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de incubação. A0 e A2,5: explantes nodais apicais sem e com $2,5 \mu\text{M}$ de BA, respectivamente. C0 e C2,5: explantes nodais cotiledonares sem e com $2,5 \mu\text{M}$ de BA, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre si em cada tempo de incubação comparando todos os tratamentos. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os diferentes tempos de incubação para cada tratamento. (Média, $n = 3$, $\text{CV} = 21,4\%$).

Adicionalmente, comparando os níveis endógenos de frutose, glicose e sacarose observou-se uma diminuição dos níveis de sacarose e aumento de frutose e glicose, principalmente no período final de cultivo entre o 20º e 30º dias de incubação nos explantes nodais apicais e nodais cotiledonares incubados na presença de $2,5 \mu\text{M}$ de BA. Estes resultados sugerem que este regulador de crescimento pode estar estimulando, simultaneamente, (a) a atividade de invertases extracelulares presentes no apoplasto que degradam sacarose em frutose e glicose e (b) transportadores de hexoses presentes na membrana

plasmática, os quais transportam frutose e glicose para dentro das células em pontos com intensa atividade de crescimento (Roitsch e Ehne, 2000). Adicionalmente, estudos mostram que reguladores de crescimento vegetal podem interagir com outros componentes do meio de cultura, como carboidratos e fontes de nitrogênio, e influenciar a resposta morfogênética (Jeannin et al., 1995; Ahn et al., 1996). Desta forma, a função do BA como regulador de crescimento não estaria somente associada à promoção da divisão celular, mas também ao metabolismo de carboidratos durante a organogênese em *C. fissilis*. Segundo Roitsch e Ehne (2000), as citocininas induzem a ação de invertases extracelulares e transportadores de hexoses. Desta forma, atuariam promovendo a entrada de frutose e glicose nas células em pontos de crescimento, as quais atuariam na regulação gênica.

Neste trabalho analisou-se o perfil e conteúdo dos carboidratos frutose, glicose e sacarose durante a morfogênese *in vitro*, os quais apresentam conteúdos diferenciados ao longo da incubação, indicando sua atuação em pontos específicos durante o desenvolvimento de brotações em *C. fissilis*. Sugere-se que eles tenham um papel importante nos eventos celulares que levam a indução e desenvolvimento de brotações, atuando como agentes sinalizadores do crescimento e não somente como moléculas fornecedoras de energia.

3.2.2. Poliaminas

Analisaram-se os conteúdos endógenos de PAs livres durante a indução e o desenvolvimento de brotações *in vitro* em *C. fissilis*. As PAs são compostos que atuam em vários processos fisiológicos nas plantas. Elas estão associadas a processos de divisão, diferenciação e alongamento celular atuando em eventos de crescimento e desenvolvimento tais como, desenvolvimento de embriões zigóticos, germinação de sementes, rizogênese ou ainda ligadas à resposta a estresses ambientais (Santa-Catarina et al., 2006; Kusano et al., 2008; Naija et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011).

Foi analisado o conteúdo de PAs livres totais durante o período de incubação dos dois tipos de explantes nos diferentes tratamentos testados (Fig. 7). Verificou-se que o conteúdo de PAs livres totais não diferiu significativamente

no tempo 0, em explantes nodais apicais e cotiledonares antes da inoculação, ocorrendo diferenças estatísticas significativas apenas no 30º dia de incubação.

Para os explantes nodais apicais inoculados em meio de cultura sem BA (A0) não houve diferenças significativas durante todo o período de cultivo. Por outro lado, explantes nodais apicais na presença de BA (A2,5) apresentaram aumento significativo no conteúdo de PAs livres totais no 30º dia de cultivo, quando apresentaram conteúdo superior aos demais tratamentos (Fig. 7).

Para os explantes cotiledonares sem (C0) e com BA (C2,5), observou-se um aumento significativo no conteúdo de PAs livres a partir do 20º dia de incubação, apresentando no 30º dia valores similares entre si e significativamente superiores aos demais dias de incubação.

O maior conteúdo de PAs livres totais para os explantes nodais apicais com BA (A2,5) e cotiledonares sem (C0) e com (C2,5) BA no 30º dia de incubação está associado aos maiores conteúdos de Put encontrados neste período (Fig. 8), resultando possivelmente no maior número de brotos/explante (Fig. 3B) observado nestes mesmos tratamentos após 30 dias de incubação.

Estudos mostram que os níveis de PAs são, geralmente, altos em células meristemáticas em divisão (Li e Burrit, 2003). Deste modo, o aumento no conteúdo de PAs livres totais observado no final da incubação pode estar associado ao crescimento das brotações, uma vez que estes tecidos estão em intensa atividade de divisão, diferenciação e alongamento celular.

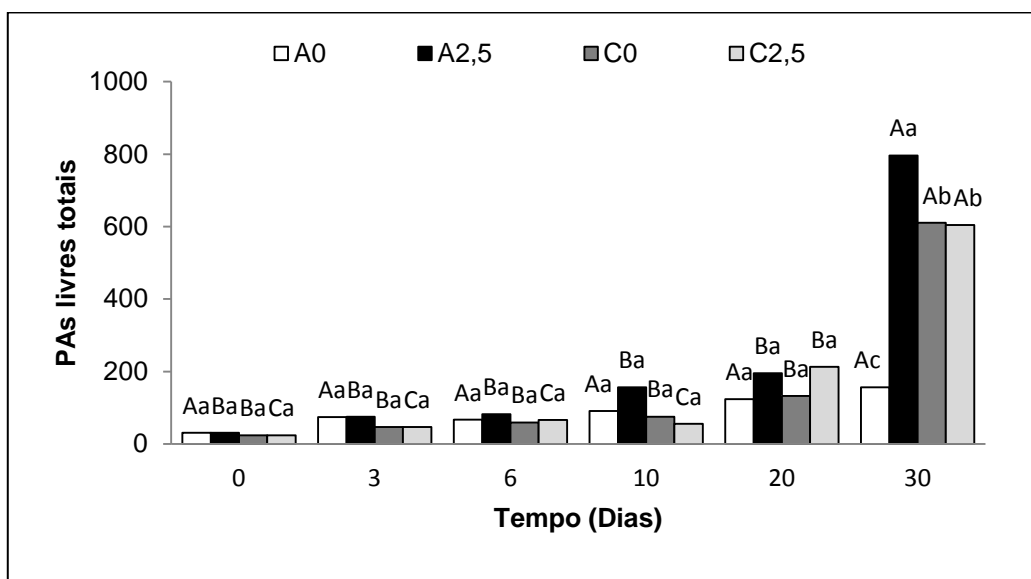


Figura 7: Conteúdo endógeno de PAs livres totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) em explantes de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* antes (0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de incubação. A0 e A2,5: explantes nodais apicais sem e com $2,5 \mu\text{M}$ de BA, respectivamente. C0 e C2,5: explantes nodais cotiledonares sem e com $2,5 \mu\text{M}$ de BA, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre si em cada tempo de incubação comparando todos os tratamentos. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os diferentes tempos de incubação para cada tratamento (Média, $n=3$, $CV=30\%$).

Analisando as diferentes PAs, verificou-se que os conteúdos de Put, Spd e Spm variaram nos diferentes períodos de incubação e tratamentos utilizados, sendo verificados conteúdos maiores para Put, seguido de Spd e Spm (Figs. 8, 9 e 10). Resultados similares foram verificados para tecidos medulares haploides e diploides de *N. tabacum* cultivados *in vitro*, onde foi demonstrada uma alta concentração endógena de Put seguida de Spd e Spm (Carone et al., 2010).

Analisando-se os conteúdos de Put (Fig.8) verificou-se que o conteúdo desta PA determinou o perfil do conteúdo de PAs livres totais (Fig. 7) ao longo da incubação. Adicionalmente, verificou-se que não houve diferença significativa entre os níveis endógenos Put no tempo 0 para os dois tipos de explantes antes da incubação, sugerindo que não há diferenças significativas para esta PA nos dois tipos de explantes utilizados, nodais apicais e nodais cotiledonares.

Para os explantes nodais apicais sem (A0) e com BA (A2,5), verificou-se aumento significativo no conteúdo de Put durante os primeiros 3 dias de incubação, mantendo-se estável até o 6º dia, ocorrendo um aumento significativo do 10º ao 30º dia de incubação, quando os conteúdos se mantiveram similares para A0 e aumentaram significativamente nos explantes nodais apicais com BA (A2,5). Este resultado mostra que a adição de BA ao meio de cultura induziu um aumento significativo no conteúdo de Put em explantes nodais apicais.

Para os explantes nodais cotiledonares sem (C0) e com BA (C2,5), o conteúdo de Put não variou do tempo 0 até o 6º dia de incubação, aumentando no 20º e 30º dias de incubação, com valores significativamente maiores no final do cultivo. Estes dados sugerem que segmentos nodais cotiledonares resultam em um aumento na quantidade de Put livre ao final da incubação, independente da presença de BA no meio de cultura.

Quando se comparou o conteúdo de Put entre os diferentes tratamentos, verificou-se valores superiores no final da incubação para os explantes nodais apicais com BA (A2,5), seguido dos explantes nodais cotiledonares sem (C0) e com BA (C2,5). Por outro lado, os explantes nodais apicais sem BA (A0) apresentaram valores inferiores neste período. Estes resultados sugerem que a Put pode estar associada ao maior número de brotos/explante (Fig. 3B) verificado nestes tratamentos ao final da incubação. Em *N. tabacum* foi verificado que maiores conteúdos de Put comparativamente a Spd e Spm podem estar associados à divisão e totipotência celular em protoplastos obtidos de folhas completamente expandidas de culturas *in vitro* (Papadakis et al., 2005). Adicionalmente, estudos com esta mesma espécie revelam que a síntese de Put é maior em meristemas apicais da parte aérea e da raiz (Paschalidis e Roubelakis-Angelakis, 2005). Estes autores colocam que elevadas concentrações de Put nos meristemas apicais do caule e da raiz devem-se ao fato de que estes locais são sítios de intensa atividade mitótica para promover o crescimento da planta. Neste sentido, os maiores conteúdos de Put no 30º dia de incubação podem estar associados à intensa divisão celular que está ocorrendo nestes tecidos para o crescimento das novas brotações. Segundo Paschalidis e Roubelakis-Angelakis (2005), as divisões celulares são intensas durante o

desenvolvimento das folhas, após este evento há uma progressiva diminuição e aumento da expansão celular nestes órgãos em *N. tabacum*, sugerindo desta forma a correlação entre a presença de folhas em desenvolvimento nas brotações e as elevadas concentrações de Put encontradas no presente trabalho.

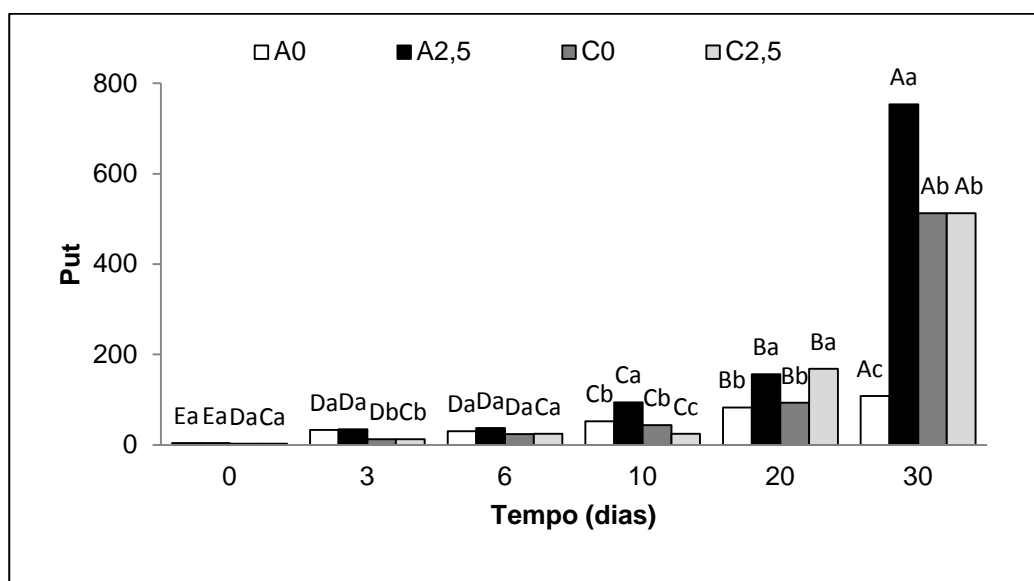


Figura 8: Conteúdo endógeno de Put livre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) em explantes de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* antes (0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de incubação. A0 e A2,5: explantes nodais apicais sem e com $2,5 \mu\text{M}$ de BA, respectivamente. C0 e C2,5: explantes nodais cotiledonares sem e com $2,5 \mu\text{M}$ de BA, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre si em cada tempo de incubação comparando todos os tratamentos. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os diferentes tempos de incubação para cada tratamento. (Média, $n = 3$, $CV = 8,1\%$).

Quando se relaciona as concentrações de Put com o número de brotos/explante e comprimento das brotações verifica-se uma baixa concentração de Put para os explantes nodais apicais sem BA (A0) ao final do cultivo. Este fato pode estar associado ao menor comprimento de brotações observado neste tratamento. Por outro lado, elevadas concentrações encontradas em explantes nodais apicais com BA (A2,5) indicam um papel estimulador do BA para síntese de Put, porém sem promoção do crescimento (Fig. 3C), mas com promoção da indução de brotações, que é resultante principalmente de divisões celulares (Fig.

3B). Similarmente, Francisco et al. (2008) verificaram em *Colocasia esculenta* que os maiores teores de Put endógena no desenvolvimento de brotações foram encontrados em tratamento com adição de 5 μM de BA em associação com 10 μM de ácido idolacético (AIA) em meio MS.

Analisando os conteúdos de Spd (Fig. 9) verificou-se que estes são similares no tempo 0 para os dois tipos de explantes (nodais apicais e cotiledonares) antes da incubação, diferindo durante o período de cultivo apenas no 10º dia onde foi significativamente maior para explantes nodais apicais com BA (A2,5). Para explantes nodais apicais sem (A0) e com BA (A2,5) houve um aumento significativo até o 3º dia de incubação, sem diferenças significativas entre estes dois tratamentos. No 10º dia houve um aumento significativo em explantes nodais apicais com BA (A2,5). Do 20º ao 30º dia foi observada uma estabilização nas concentrações, sem diferenças estatísticas significativas das observadas no 3º e 6º dia de incubação.

Em explantes nodais cotiledonares sem BA (C0) e com BA (C2,5) verificou-se um perfil similar ao encontrado para explantes nodais apicais, ocorrendo diferenças entre estes tratamentos apenas no 10º dia de incubação onde segmentos nodais cotiledonares com BA (C2,5) apresentaram menor conteúdo em relação ao tratamento sem BA (C0).

As concentrações similares e a estabilidade no conteúdo de Spd encontradas em todos os tratamentos sugerem uma regulação celular do metabolismo desta PA durante o cultivo *in vitro* das brotações em *C. fissilis*. Este resultado mostra uma distribuição mais uniforme desta PA durante o cultivo com menores diferenças temporais em relação a Put. Sugere-se também que pode estar havendo uma conjugação de Spd, favorecendo a atuação de Put nos eventos de divisão celular. O aumento até o 3º dia pode estar relacionado à atuação da Spd nos eventos de diferenciação celular necessários a formação dos novos tecidos que irão formar a nova planta. Estudos mostram que concentrações maiores de Spd e Spm têm sido associadas ao alongamento e diferenciação celular, enquanto Put estaria relacionada com a divisão celular (Papadakis et al., 2005). Quanto à suplementação do meio de cultura com BA verificou-se que este regulador de crescimento vegetal não interfere no metabolismo de Spd, uma vez

que o conteúdo desta PA não foi significativamente aumentado ao longo da incubação quando BA foi adicionado ao meio de cultura.

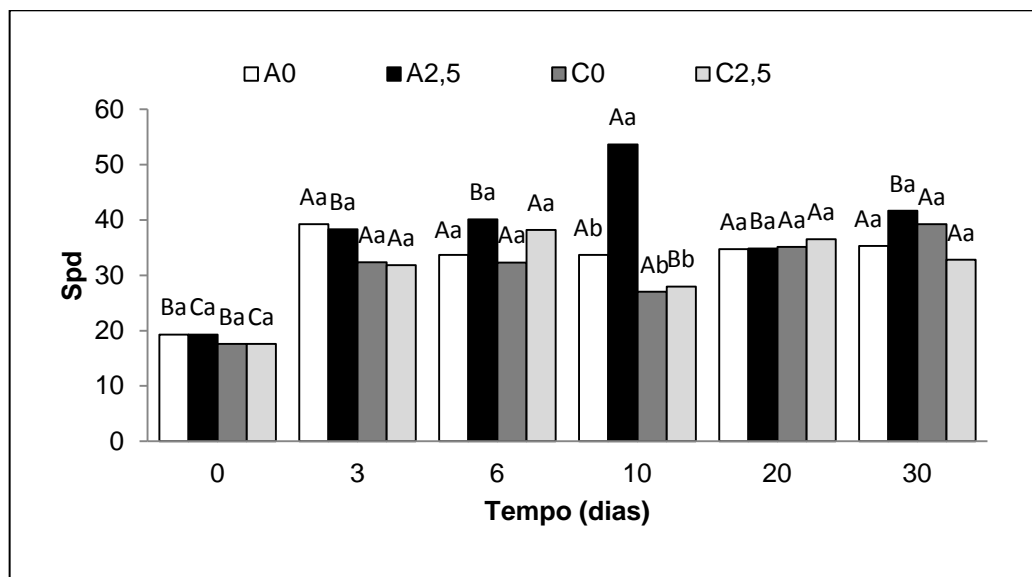


Figura 9: Conteúdo endógeno de Spd livre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) em explantes de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* antes (0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de incubação. A0 e A2,5: explantes nodais apicais sem e com 2,5 μM de BA, respectivamente. C0 e C2,5: explantes nodais cotiledonares sem e com 2,5 μM de BA, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre si em cada tempo de incubação comparando todos os tratamentos. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os diferentes tempos de incubação para cada tratamento (Média, $n = 3$, $\text{CV} = 12,1\%$).

Em relação a Spm, verificou-se que esta PA foi encontrada em menor concentração comparativamente a Put e Spd durante a indução e desenvolvimento das brotações em *C. fissilis*. Adicionalmente, diferente de Put e Spd, houve uma redução significativa desta PA do tempo 0 (explantes antes da incubação) para o 3º dia de incubação sem diferença entre os tratamentos neste tempo (Fig.10).

Em explantes nodais apicais sem BA (A0) verificou-se um aumento no conteúdo de Spm do 10º ao 30º dia de incubação. Para explantes nodais apicais com BA (A2,5) ocorreu um aumento do 3º ao 10º dia seguido de redução significativa no 20º dia e aumento também significativo no 30º dia.

Para explantes nodais cotiledonares sem BA (C0) ocorreu um aumento no conteúdo até o final do cultivo, enquanto nos com BA (C2,5) verificou-se uma redução do 6º ao 10º dia com posterior aumento e redução significativa do 20º ao 30º dia.

A diminuição dos conteúdos endógenos de Spm no início do cultivo pode estar associada a uma degradação ou conjugação de Spm, embora esta análise não tenha sido realizada. Ressalta-se que a conjugação pode ser considerada uma forma de controle intracelular das concentrações de PAs nas células vegetais, regulando o seu metabolismo (Katerova e Todorova, 2009). Os aumentos no conteúdo de Spm verificados ao final do cultivo para todos os tratamentos podem estar associados à participação desta PA no alongamento celular necessário ao crescimento das folhas em desenvolvimento, conforme sugerido por Paschalidis e Roubelakis-Angelakis (2005).

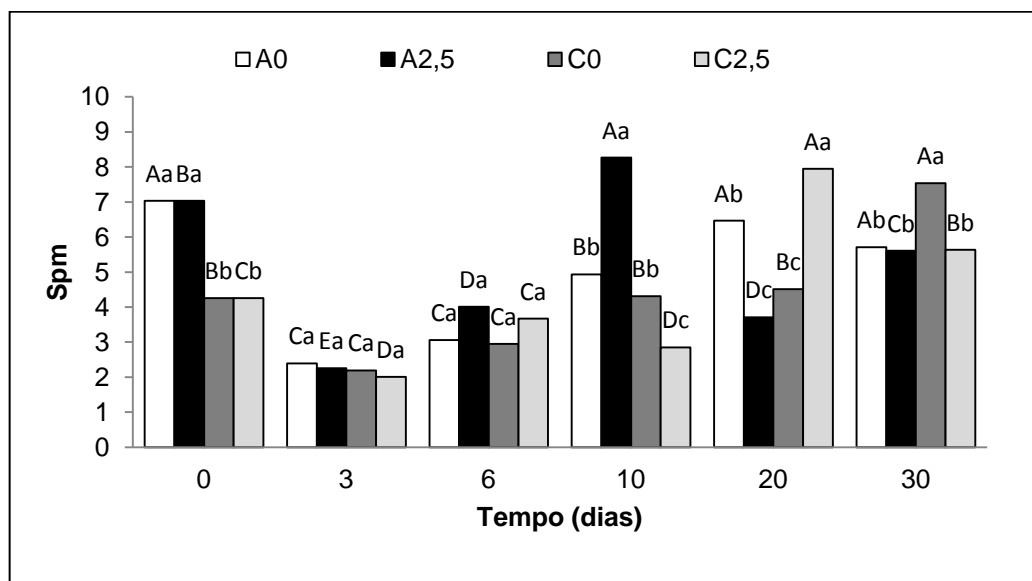


Figura 10: Conteúdo endógeno de Spm livre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF) em explantes de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* antes (0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de incubação. A0 e A2,5: explantes nodais apicais sem e com $2,5 \mu\text{M}$ de BA, respectivamente. C0 e C2,5: explantes nodais cotiledonares sem e com $2,5 \mu\text{M}$ de BA, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre si em cada tempo de incubação comparando todos os tratamentos. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os diferentes tempos de incubação para cada tratamento (Média, $n = 3$, $\text{CV} = 12,3\%$).

Analisou-se a razão das PAs [$\text{Put}/(\text{Spd}+\text{Spm})$] durante a indução e o desenvolvimento de brotações em *C. fissilis*. Verificou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo tempo e entre os diferentes tempos até o 10º dia de incubação (Fig. 11). Também, observou-se que para explantes nodais apicais sem BA (A0) não houve diferenças significativas ao longo de todo o período de incubação. No entanto, para explantes nodais apicais com BA (A2,5) houve um expressivo aumento entre o 20º e o 30º dia de incubação, sendo este superior aos demais tratamentos.

Para explantes nodais cotiledonares sem BA (C0) foi verificado um perfil similar ao de explantes nodais apicais com BA (A2,5), porém em menor concentração. Por outro lado, explantes nodais cotiledonares com BA (C2,5) não apresentaram aumento entre o 20º e 30º dia. Estudos sugerem que um aumento na razão das PAs está relacionado com os tecidos em intensa divisão celular, pela maior concentração de Put, enquanto um baixo valor está associado a taxas de alongamento e diferenciação celular (Papadakis et al., 2005).

Baixos valores de razão das PAs até o 10º dia indicam o envolvimento das PAs, Spd e Spm associadas ao alongamento e diferenciação celular, enquanto os altos valores encontrados no final do cultivo, decorrentes do maior conteúdo de Put, mostram que neste período podem estar ocorrendo os eventos mitóticos necessários ao crescimento dos brotos. Em outros eventos morfogênicos em arbóreas, como embriogênese zigótica e germinação de sementes, verificou-se uma diminuição da razão ao longo destes processos associada principalmente a aumentos nos níveis de Spd e Spm necessários ao alongamento celular (Santa-Catarina et al., 2006; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011). Shoeb et al. (2001) sugerem que a razão entre PAs constitui um importante biomarcador da capacidade regenerativa em plantas. Então, valores menores de razão no começo da incubação podem ser importantes para a diferenciação celular enquanto valores maiores no final estariam associados a divisões mitóticas necessárias ao crescimento.

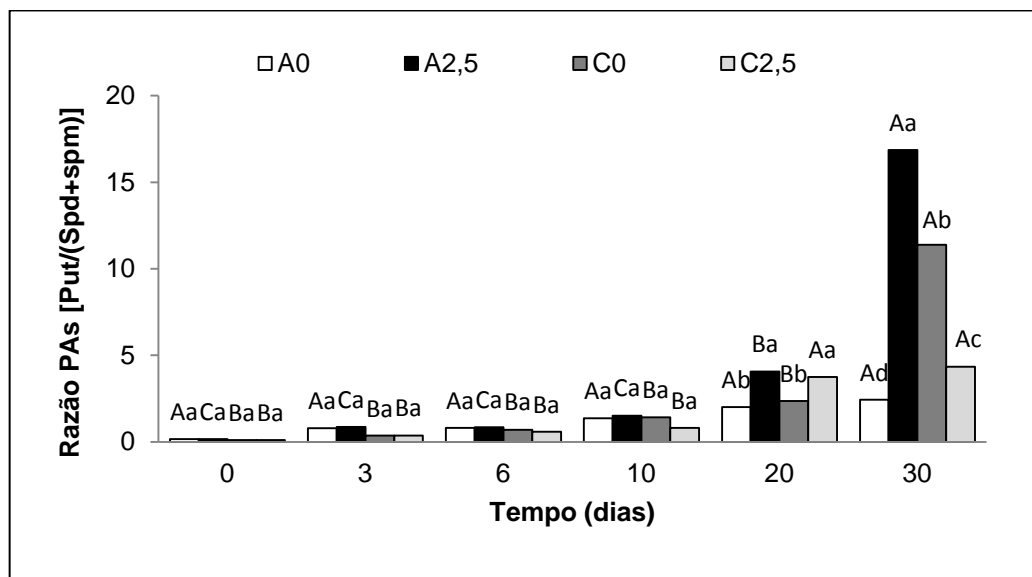


Figura 11: Razão entre PAs [Put/(Spd+Spm)] em explantes de segmentos nodais apicais e cotiledonares de *C. fissilis* antes (0) e após 3, 6, 10, 20 e 30 dias de incubação. A0 e A2,5: explantes nodais apicais sem e com 2,5 μM de BA, respectivamente. C0 e C2,5: explantes nodais cotiledonares sem e com 2,5 μM de BA, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre si em cada tempo de incubação comparando todos os tratamentos. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os diferentes tempos de incubação para cada tratamento. (Média, $n=3$, $\text{CV}= 25,6\%$).

Embora análises tenham sido realizadas em nível de gene para outros sistemas (Janne et al., 2004), informações disponíveis sobre o papel de PAs no desenvolvimento das plantas em cultura de tecidos, ainda são restritas. Sabe-se que elas são importantes moduladores da organogênese (Alcázar et al., 2010), embora a sua atuação ainda não esteja bem conhecida. As alterações nos conteúdos de PAs durante o cultivo *in vitro* de explantes de origem caulinar em *C. fissilis* sugerem que estes compostos podem estar relacionados com a indução e o desenvolvimento de brotações, uma vez que os seus níveis foram alterados durante os diferentes períodos de incubação.

4. CONCLUSÕES

- Em *C. fissilis* não houve necessidade de reguladores de crescimento vegetal para indução de brotações em explantes nodais apicais e nodais cotiledonares;
- A adição de BA ao meio de cultura promoveu um maior número de brotos por explante em explantes nodais apicais e nodais cotiledonares, sendo este regulador de crescimento importante para a resposta morfogênica *in vitro* nesta espécie;
- A adição de BA promoveu um maior comprimento de brotações em explantes nodais cotiledonares;
- Foram detectados frutose, glicose e sacarose durante a indução e desenvolvimento das brotações em *C. fissilis*;
- A adição de BA reduziu o conteúdo endógeno de sacarose para o fornecimento de frutose e glicose;
- O conteúdo de PAs totais foi crescente ao longo da incubação;
- A adição de BA induz um aumento no conteúdo de Put em explantes nodais apicais não influenciando sua síntese em explantes nodais cotiledonares;
- Conteúdo endógeno de Put está associado com o maior número de brotos/explante em explantes nodais apicais com BA e nodais cotiledonares com e sem BA;
- Spd parece ser uma PA não essencial para a indução e desenvolvimento das brotações, pois não apresentou alterações significativas ao longo da incubação nos diferentes tratamentos;
- A adição de BA não interferiu no conteúdo endógeno de Spd;
- A Spm está associada à promoção do alongamento das brotações no final da incubação;
- A razão entre as PAs aumentou no final do cultivo, sendo apontada como um biomarcador para a capacidade regenerativa de *C. fissilis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., Tiburcio, A. F. (2010) Polyamines: molecules with functions in plant abiotic stress tolerance. *Plant*, 231: 1237-1249.

Amaral, V.F.M. (2006) *Multiplificação in vitro de Cedrela fissilis Vell.* Tese (mestrado em engenharia florestal) - Santa Maria - RS, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, 63p.

Ahn, I. O., Vanle, B., Gendy, C., Van, T. I. (1996) Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell and Tissue Culture*, 45: 237-243.

Borkowska, B., Szczerba, J. (1991) Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. *Journal of Experimental Botany*, 42: 911-915.

Borthakur, A., Das, S. C., Kalita, M. C., Sen, P. (2011) *In vitro* plant regeneration from apical buds of *Albizia odoratissima* (L.f.) Benth. *Advances in Applied Science Research*, 2: 457-464.

Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140:103-125.

Bunn, E., Turner, S. R., Dixon, K. W. (2011) Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47:188-200.

Carone, S. B., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Floh, E. I. S. (2010) Polyamine Patterns in Haploid and Diploid Tobacco Tissues and *in vitro* Cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 409-417.

Carrier, D.J., Kendall, E.J., Bock, C.A., Cunningham, J.E., Dunstan, D.I. (1999) Water content, lipid deposition, and (+)- abscisic acid content in developing white spruce seeds. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1359-1364.

Cesar, S. A., Ignacimuthu, S. (2010) Effects of cytokinins, carbohydrates and amino acids on induction and maturation of somatic embryos in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum* Linn.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 102: 153-162.

Debnath, S. C. (2004) *In vitro* culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Small Fruits Review*, 3: 393-408.

Dias, L. L. C., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Pieruzzi, F. P., Floh, E. I. S. (2009) Polyamines, aminoacids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. *Seed Science and Technology*, 37: 42-51.

Faria, G. A., Costa, M. A. P. C., Ledo, C. A. S., Junghans, T. G., Souza, A. S., Cunha, M. A. P. (2007) Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. *Bragantia*, 4: 535-546.

Francisco, A. A., Tavares, A. R., Kanashiro, S., Ramos, P. R. R., Lima, G. P. P (2008) Reguladores vegetais e teores endógenos de poliaminas durante o desenvolvimento de taro cultivado *in vitro*. *Ciência Rural*, 38: 1251-1257.

Filson, P. B., Dawson-Andoh, B. E. (2009) Characterization of sugar from model and enzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detection. *Bioresource Technology*, 100: 6661-6664.

Fráguas, C. B., Pasqual, M., Pereira, A. R. (2004) Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. *Ciência e Agrotecnologia*, 28: 49-55.

Fuentes, S. R. L., Calheiros, M. B. P., Manetti-Filho, J., Vieira, L. G. E. (2000) The effects of silver nitrates and different carbohydrates sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 5-13.

Gaj, M. D. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43: 27-47.

Gemas, V., Bessa, A. (2006) Influence of various carbohydrates in shoot development in nodal culture of Guinean *Anacardium occidentale* genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85: 103-108.

Gibson, S. I. (2003) Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal Experimental Botany*, 55: 253-264.

Gibson, S. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 93-102.

Giri, C. C., Shyamkumar, B., Anjaneyulu, C. (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18:115-135.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., Geneve, R. L. (2002) *Plant Propagation: Principles and Practices*. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall.

International Union for Conservation of Nature.(2010) The IUCN Red List of Threatened species. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em 25 de abril de 2012.

Janne, J., Alhonen, L., Pietila, M., Keinanen, T.A (2004) Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *European Journal Biochemistry*, 271:877-894.

Jeannin, G., Bronner, R., Gunther, H. (1995) Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar. *Plant Cell Reports*, 15: 200-204.

Joshi, I., Bisht, P., Sharma, V. K., Uniyal, D. P. (2003) Studies on effect of nutrient media for clonal propagation of superior phenotypes of *Dalbergia sissoo* Roxb. through tissue culture. *Silvae Genetica*, 52: 143-147.

- Katerova, Z. I., Todorova, D. (2009) Endogenous polyamines lessen membrane damages in pea plants provoked by enhanced ultraviolet-C radiation. *Plant Growth Regulation*, 57: 145-152.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228: 367-381.
- Kuznetsov, V., Radyukina, N. L., Shevyakova, N. I. (2006) Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53: 583-604.
- Li, Z., Burrit, D. J. (2003) Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. *Plant Growth Regulation*, 40: 65-74.
- Minocha, R., Dale, R. S., Cathie, R., Steele, K. D., Minocha, S. C. (1999) Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 105: 155-164.
- Mohebalipour, S., Aharizad, S., Mohammadi, S. A., Motallebiazar, A. R., Arefi, H. M. (2012) Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10: 280-286.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Naija, S., Elloumi, N., Ammar, S., Kevers, C., Dommès, J. (2009) Involvement of polyamines in the adventitious rooting of micropropagated shoots of the apple rootstock M106. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45: 83-91.
- Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S., Ito, A. (2001) Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Scientia Horticulturae*, 90: 85-92.
- Neto, V. B. P., Da Mota, T. R., Otoni, W. C. (2003) Direct organogenesis from hypocotyls derived explants of annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75: 159-167.
- Nicoli, P. M., Paiva, R., Nogueira, R. C., Santana, J. R. F., Silva, L. C., Silva, D. P. C., Porto, J. M. P. (2008) Ajuste no processo de micropropagação de barbatimão. *Ciência Rural*, 38: 685-689.
- Nunes, E. C., Benson, E. E., Oltramari, A. C., Araujo, P. S., Moser, J. R., Viana, A. M. (2003) *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, 12: 837-848.
- Nunes, E. C., Castilho, C. V., Moreno, F. N., Viana, A. M. (2002) *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell tissue and Organ Culture*, 70: 259-268.

Papadakis, A. K., Paschalidis, K. A., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2005) Biosynthesis profile and endogenous titers of polyamines differ in totipotent and recalcitrant protoplasts. *Physiology Plantarum*, 125: 10-20.

Paschalidis, K. A., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2005) Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiology*, 138: 142-152.

Pescador, P., Kerbauy, G. B., E. Kraus, J. E., Ferreira, W. M., Guerra, M. P., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. (2008) Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44: 289-299.

Pieruzzi, F. P., Dias, L. L. C., Balbuena, T. S., Santa-Catarina, C., Santos, A. L. W dos, Floh, E. I. S. (2011) Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrante seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Annals of Botany*, 108: 337-345.

Pijut, P. M., Beasley, R. R., Lawson, S. S., Palla, K. J., Micah, E. Stevens, M. E., Wang, Y. (2012) *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species – a review (2001-2011). *Propagation of Ornamental Plants*, 12: 25-51.

Polit, J. T., Maszewski, J., Kazmierczak, A. (2003) Effect of BAP and IAA on the expression of G1 and G2 control points and G1-S and G2-M transitions in root meristem cells of *Vicia faba*. *Cell Biology International*, 27: 559-566.

Ramesh, M., Umate, P., Rao, K. V., Sadanandam, A. (2005) Micropropagation of *Terminalia bellirica* Roxb. - a sericulture and medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41: 320-323.

Ribas, L. L. F., Zanette, F., Kulchetscki, L., Guerra, M. P. (2005) Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. *Revista Árvore*, 29: 517-524.

Rocha, S. C., Quorim, M., Ribas, L. L. F., Koehler, H. H. (2007) Micropropagação de *Cabralea canjerana*. *Revista Árvore*, 31: 43-50.

Roitsch, T., Ehner, R. (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation*, 32: 359-367.

Saldanha, A. L. M. (2010) Protocolo para propagação in vitro de cedro (*Cedrela odorata* L.). Tese (Dissertação de mestrado em agronomia) - Belém - PA, Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA, 56 p.

Santa-Catarina, C., Silveira, V., Balbuena, T.S., Maranhão, M. E. E., Handro, W., Floh, E. I. S. (2006) IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regulation*, 49: 237-247.

Schottz, E. S., Filho, A. N. K. , Tracz, A. L., Koehler, H., Ribas, L. L. F., Quoirin, M. (2007) Multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) a partir de material juvenil. *Ciência Florestal*, 17:109-117.

Shoeb, F., Yadav, J. S., Bajaj, S., Rajam, M. V. (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism indifferent genotypes of Indica rice. *Plant Science*, 160: 1229-1235.

Silva, P. P., Contim, L. A. S., Freitas, D. V., Aride, P. H. R., Santos, A. L. W. (2010). Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn). *Scientia Agraria*, 11: 437-443.

Silveira, V., Floh, E.I.S., Handro, W., Guerra, M. P. (2004) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 233-249.

Silveira, V., Santa-Catarina, C., Tun, N. N., Scherer, G. F. E, Handro, W., Guerra, M. P., 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, 91-98.

Smeeckens S., Ma J., Hanson, J., Rolland, F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 274-279.

Smeeckens, S. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 49-81.

Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1995) *Biometry*. 3. ed. New York: Freeman and Co. 957p.

Stoynova-Bakalova, E., Petrov, P. I. (2009) Modulating zucchini cotyledon plate meristem activity by interactions between the cycline-dependent kinase inhibitor roscovitine and cytokinins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97: 263-269.

Uzelac, B., Janošević, D., Stojičić, D., Budimir, S. (2012) Effect of cytokinins on shoot apical meristem in *nicotiana tabacum*. *Archives of Biological Sciences*, 64: 511-516.

Vila, S., Gonzalez, H., Rey, H., Mroginski, L. (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cedrela fissilis*. *Biologia Plantarum*, 53: 383-386.

Zohra, F., Abdul, M., Samar, F., Anjum, A., Shahid, U. (2009) Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates. *Turkish Journal of Botany*, 33: 393-405.

4. RESUMOS E CONCLUSÕES

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) e Laboratório de Biotecnologia (LBT) da UENF, em Campos dos Goytacazes - Rio de Janeiro e no Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BioCel-USP) da Universidade de São Paulo.

O objetivo deste trabalho foi estudar os níveis e as variações endógenas de aminoácidos, carboidratos e PAs durante a germinação de sementes e de carboidratos e PAs durante o desenvolvimento de brotações *in vitro* em *C. fissilis*.

Sementes de *C. fissilis* apresentaram um modelo trifásico de absorção de água. O conteúdo de aminoácidos foi crescente, enquanto proteínas totais decresceram durante a germinação mostrando a atuação destes compostos neste evento. As concentrações de carboidratos e PAs totais diminuíram durante todo o evento germinativo sugerindo a metabolização destas biomoléculas neste processo. Para *C. fissilis* Spd é a PA predominante durante todo o evento, demonstrando que, para esta espécie, Spd tem um importante papel na promoção da germinação. Assim, as alterações nos conteúdos destes compostos durante o evento germinativo indicam que estas biomoléculas exercem funções importantes durante este evento morfogenético.

Durante o desenvolvimento de brotações verificou-se que para a indução de brotações em explantes nodais apicais e cotiledonares não há necessidade da adição de BA. Por conseguinte, este regulador de crescimento vegetal é essencial nesta espécie para promover um maior número de brotos em explantes nodais apicais e cotiledonares e maior comprimento de brotos em explantes nodais cotiledonares. A interação de BA com o tipo de explante parece ser importante na organogênese desta espécie. BA aumenta os níveis endógenos de Put em explantes nodais apicais conferindo a este tipo de explante um potencial morfogênético similar aos explantes nodais cotiledonares. BA também atua interferindo no metabolismo endógeno de outros compostos importantes no processo organogênico de *C. fissilis*, como sacarose. Spd não foi uma PA importante na indução e desenvolvimento das brotações nas condições deste trabalho, enquanto Spm parece atuar no final do cultivo promovendo o alongamento das brotações. Para *C. fissilis* a razão entre as PAs pode ser apontada como um biomarcador na capacidade regenerativa de segmentos nodais apicais e cotiledonares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn, I. O., Vanle, B., Gendy, C., Van, T. I. (1996) Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture of *Panax guising*. *Plant Cell and Tissue Culture*, 45: 237-243.

Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., Tiburcio, A. F. (2010) Polyamines: molecules with functions in plant abiotic stress tolerance. *Plant*, 231: 1237-1249.

Alhadi, F. A., Al-Asbahi, A. A. S., Alhammadi, A. S. A., Abdullah, Q. A. A. (2012) The effects of free amino acids profiles on seeds germination/dormancy and seedlings development of two genetically different cultivars of *Yemeni pomegranates*. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 8: 114-137.

Amaral, V. F. M. (2006) *Multiplicação in vitro de Cedrela fissilis Vell.* Tese (Mestrado em Engenharia Florestal) - Santa Maria - RS, Universidade Federal de Santa Maria -UFSM, 63p.

Amaral, W. A. N., Nakagawa, J. (1989) Dispersão, maturação e armazenamento de sementes de duas espécies do gênero *Cedrela*. Anais do simpósio brasileiro sobre tecnologia de sementes florestais, 2, Atibaia. São Paulo, p. 287.

Astarita, L. V., Floh, E. I. S., Handro, W. (2003a) Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidase associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). *Plant Growth Regulation*, 39: 113-118.

Astarita, L. V., Handro, W., Floh, E. I. S. (2003b) Changes in polyamines contents associated with zygotic embryogenesis in Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *Revista Brasileira de Botânica*, 26: 163-168.

Atlas de remanescentes da Mata Atlântica. (2012) Disponível em <http://mapas.sosma.org.br/>. Acesso em 16 de março de 2012.

- Bais, H. P., Sudha, G. S., Ravishankar, G. A. (2000) Putrescine and silver nitrate influence shoot multiplication, in vitro flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19: 238-248.
- Balbuena, T. S., Silveira, V., Junqueira, M., Dias, L. L. C., Santa-Catarina, C., Shevchenko, A., Floh, E. I. S. (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *Journal of Proteomics*, 72: 337-352.
- Bewley, J. D., Black, M. (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. 2. ed. New York: Plenum Press, 445p.
- Bewley, J. D. (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.
- Bown, A. W., Shelp, B. J. (1997) The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiology*, 115: 1-5.
- Bown, A. W., Macgregor, K. B., Shelp, B. J. (2006) Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests? *Trends in Plant Science*, 11: 424-427.
- Bonfante, L. V., Braga, L. F., Lavezo, A., Santos, W. M. (2011) Caracterização da curva de absorção de água de sementes de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.) Anais do 4º Congresso de Iniciação Científica. Cáceres. Mato Grosso do Sul. V.7. CD- Rom 2178-7492.
- Borek, S., Ratajczak, W., Ratajczak, L. (2006) Ultrastructural and enzymatic research on the role of sucrose in mobilization of storage lipids in germinating yellow lupine seeds. *Plant Science*, 170: 441-452.
- Borghetti, F. (2004) Dormência embrionária. In Ferreira, A. G. e Borghetti, F. (orgs). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artimed, p. 109-124.
- Borisjuk, L., Rolletschek H., Wobus U., Weber H. (2003) Differentiation of legume cotyledon as related to metabolism gradients and assimilate transport into seeds. *Journal of Experimental Botany*, 54: 503-512.
- Borkowska, B., Szczerba, J. (1991) Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. *Journal of Experimental Botany*, 42: 911-915.
- Borthakur, A., Das, S. C., Kalita, M. C., Sen, P. (2011) *In vitro* plant regeneration from apical buds of *Albizzia odoratissima* (L.f.) Benth. *Advances in Applied Science Research*, 2: 457-464.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J., (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140:103-125.
- Bove, J., Jullien, M., Grappin, P. (2001) Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology*, 3: 1002.1-1002.5.
- Bruce, R. W. (1976) *Production and distribution of Amazon timbers*. IBDF, Brasília, 60p.

- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. 1156 p.
- Bunn, E., Turner, S. R., Dixon, K. W. (2011) Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47:188-200.
- Cangahuala-Inocente, G. C., Silveira, V., Caprestano, C. A., Ducroquet, J. P. H. J., Floh, E. I. S., Guerra, M. P. (2009) Dynamics of biochemical and morphophysiological changes during zygotic embryogenesis in "*Acca sellowiana*" (Berg.) Burr. *Plant Growth Regulation*, 59: 103-115.
- Canton, F. R., Sua Rez, M. F., Canovas, F. M. (2005) Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynthesis Research*, 83: 265-278.
- Cao, D. D., Hua, J., Zhua, S. J., Hua, W. M., Knapp, A. (2010) Relationship between changes in endogenous polyamines and seed quality during development of sh2 sweet corn (*Zea mays* L.) seed. *Scientia Horticulturae*, 123: 301-307.
- Carone, S. B., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Floh, E. I. S. (2010) Polyamine Patterns in Haploid and Diploid Tobacco Tissues and *in vitro* Cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 409-417.
- Carrier, D. J., Kendall, E. J., Bock, C. A., Cunningham, J. E., Dunstan, D. I. (1999) Water content, lipid deposition, and (+)- abscisic acid content in developing white spruce seeds. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1359-1364
- Carrijo, L. C., Borges, E. E. L., Pontes, C. A., Lopes, M. R., Brune, A. (2010) α -galactosidase activity and carbohydrate mobilization in seeds of *Dalbergia nigra* (Vell.) Alemão ex Benth. – Fabaceae (Brazilian Rosewood) during germination. *Cerne*, 16: 283-289.
- Carvalho, N. M., Nakagawa, J. (2000) Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ª ed. Jaboticabal, Funep. 588 p.
- Carvalho, P. E. R. (2003) *Espécies arbóreas brasileiras*. Colombo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1039p.
- Carvalho, P. E. R. (1998) *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira*. Colombo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 640p.
- Catusse, J., Job, C., Job, D. (2008) Transcriptome and proteome wide analyses of seed germination. *C. R. Biologies*, 331: 815-822.
- Ceasar, S. A., Ignacimuthu, S. (2010) Effects of cytokinins, carbohydrates and amino acids on induction and maturation of somatic embryos in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum* Linn.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 102:153-162.
- Cherobini, E. A. I., Muniz, M. F. B., Elena Blume, E. (2008). Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. *Ciência Florestal*, 18: 65-73.

- Corte, V. B., Borges, E. E. L., Pontes, C. A., Leite, I. T. A., Ventrella, M. C., Mathias, A. A. (2006) Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae Caesalpinoideae). *Revista Árvore*, 30: 941-949.
- Coruzzi, G., Last, R. (2000) Amino acids. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 358-410.
- Dean, W. (1996) *A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira*. 1. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 484 p.
- Debiasi, C., Fraguas, C. B., Lima, G. P. P. (2007) Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis* sp. *Ciência Rural*, 37: 1014-1020.
- Debnath, S. C. (2004) *In vitro* culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Small Fruits Review*, 3: 393-408.
- Dias, L. L. C. (2009) *Aspectos fisiológicos, bioquímicos e análise proteômica comparativa durante a maturação, germinação e conversão em plantas de embriões de Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). Tese (Doutorado em Biotecnologia) – São Paulo – SP, Universidade de São Paulo – USP, 124p.
- Dias, L. L. C., Balbuena, T. S., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Shevchenko, A., Floh, E. I. S. (2010) Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22: 23-32.
- Dias, L. L. C., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Pieruzzi, F. P., Floh, E. I. S. (2009) Polyamines, aminoacids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. *Seed Science and Technology*, 37: 42-51.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., Sangwan, R. S. (2011) De novo shoot organogeneses: from art to science. *Trends in plant science*, 16: 597-606.
- Faria, G. A., Costa, M. A. P. C., Ledo, C. A. S., Junghans, T. G., Souza, A. S., Cunha, M. A. P. (2007) Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. *Bragantia*, 4: 535-546.
- Ferreira, R. B., Melo, T. S., Teixeira, A. N. (1995) Catabolism of the seed storage proteins from *Lupinus albus*: fate of globulins during germination and seedlings growth. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 373-381.
- Ferreira, A. G., Borghetti, F. (2004) *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artimed. 323p.
- Ferreira, C. S., Piedade, M. T. F., Tine, M. A. S., Rossatto, D. R., Parolin, P., Buckeridge, M. S. (2009) The role of carbohydrates in seed germination and seedling establishment of *Himatanthus sucuuba*, an Amazonian tree with populations adapted to flooded and non-flooded conditions. *Annals of Botany*, 104: 1111-1119.

- Filson, P. B., Dawson-Andoh, B. E. (2009) Characterization of sugar from model and enzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detection. *Bioresource Technology*, 100: 6661-6664.
- Fligliolia, M. B., Silva, A. da., Jardim, D. C. P., Ywane, M. S. (1988) Viabilidade de sementes liofilizadas de essências florestais nativas. *Silvicultura em São Paulo*, 22: 47-55.
- Fonseca, G. A. B., Mittermeier, R. A., Seligmann, P. (2005). Prefácio. In: Galindo-leal, C. e Câmara, I. G. (Ed.) *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte: Conservação Internacional. 471 p.
- Fráguas, C. B., Pasqual, M., Pereira, A. R. (2004) Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. *Ciência e Agrotecnologia*, 28: 49-55.
- Francisco, A. A., Tavares, A. R., Kanashiro, S., Ramos, P. R. R., Lima, G. P. P (2008) Reguladores vegetais e teores endógenos de poliaminas durante o desenvolvimento de taro cultivado *in vitro*. *Ciência Rural*, 38: 1251-1257.
- Fuentes, S. R. L., Calheiros, M. B. P., Manetti-Filho, J., Vieira, L. G. E. (2000) The effects of silver nitrates and different carbohydrates sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tiss and Organ Culture*, 60: 5-13.
- Fundação SOS Mata Atlântica. (2009). Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2005-2008 relatório parcial. São Paulo: SOS Mata Atlântica/INPE.
- Fundação SOS Mata Atlântica. (2010) Relatório de atividades 2010. São Paulo: SOS Mata Atlântica.
- Fundação SOS Mata Atlântica. (2011) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2008-2010. São Paulo: SOS Mata Atlântica/INPE.
- Fundação SOS Mata Atlântica. (2012) Fisionomias vegetais originais da Mata Atlântica. Disponível em: <http://mapas.sosma.org.br/>. Acesso em 22 maio de 2012.
- Gaj, M. D. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43: 27-47.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J. and Job, D. (2002) Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth. *Physiologia Plantarum*, 116: 238-247.
- Gallardo, M., Bueno, M., Angosto, T., Gallardo, E., Matilla, A.J. (1992) Free polyamines in *Cicer arietinum* seeds during the onset of germination. *Phytochemistry*, 31: 2283-2287.
- Gemas, V., Bessa, A. (2006) Influence of various carbohydrates in shoot development in nodal culture of Guinean *Anacardium occidentale* genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85: 103-108.

George, E. F. (2008) Plant tissue culture procedure - Background. In: George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. J. *Plant propagation by tissue culture*. 3 ed. Netherlands: Springer; cap1; Vol.1; 1-28.

Ghelis, T., Bolbach, G., Clodic, G., Habricot, Y., Miginiac, E., Sotta, B., Jeannette, E. (2008) Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases are involved in abscisic acid-dependent processes in *Arabidopsis* seeds and suspension cells. *Plant Physiology*, 148: 1668-1680.

Gibson, S. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 93-102.

Gibson, S. I. (2003) Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal Experimental Botany*, 55: 253-264.

Giri, C. C., Shyamkumar, B., Anjaneyulu, C. (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18:115-135.

Glevarec, G., Bouton, S., Jaspard, E., Riou, M., Cliquet, J., Suzuki, A., Lilmami, A. M. (2004) Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germination growth in model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 219: 286-297.

Handa, A. K., Mattoo, A. K. (2010) Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 540-546.

Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies, F. T.; Geneve, R. L. (2002) *Plant Propagation: Principles and Practices*. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall.

Henning, F. A., Mertz, L. M., Junior, E. A. J., Machado, R. D., Fiss, G., Zimmer, P.D. (2010) Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. *Bragantia*, 69: 727-734.

Hernandez-Sebastia, C., Marsolais, F., Saravitz, C., Israel, D., Dewey, R. E., Huber, S. C. (2005) Free amino acid profiles suggest a possible role for asparagine in the control of storage product accumulation in developing seeds of low- and high-protein soybean lines. *The Journal of Experimental Botany*, 56: 1951-63.

Huang, H. T., Villanueva, V. R. (1992) Inhibition of polyamine biosynthesis and seed germination in *Picea abies*. *Phytochemistry*, 31: 3353-3356.

Igarashi K, Kashiwagi K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271: 559-564.

International Union for Conservation of Nature. (2010) The IUCN Red List of Threatened species. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em 25 de abril de 2012.

Jander, G., Joshi, V. (2010) Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants. *Molecular Plant*, 3: 54-65.

Janne, J., Alhonen, L., Pietila, M., Keinanen, T. A. (2004) Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *European Journal Biochemistry*, 271: 877-894.

Jeannin, G., Bronner, R., Gunther, H. (1995) Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar. *Plant Cell Reports*, 15: 200-204.

Joshi, I., Bisht, P., Sharma, V. K., Uniyal, D. P. (2003) Studies on effect of nutrient media for clonal propagation of superior phenotypes of *Dalbergia sissoo* Roxb. through tissue culture. *Silvae Genetica*, 52: 143-147.

Joshi, V., Laubengayer, K. M., Schauer, K. M., Fernie, A., Jander, G. (2006) Two Arabidopsis threonine aldolases are non-redundant and compete with threonine deaminase for a common substrate pool. *Plant Cell*, 18: 3564-3575.

Kalani, A., Li, G., Peng, Z. (2009) Role of AUX1 in the control of organ identity during *in vitro* organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin interaction in Arabidopsis. *Planta*, 229: 645-657.

Kang, J.-H., Wang, L., Giri, A., Baldwin, I. T. (2006) Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid–isoleucine–mediated defenses against *Manduca sexta*. *The Plant Cell*, 18: 3303-3320.

Katerova, Z. I., Todorova, D. (2009) Endogenous polyamines lessen membrane damages in pea plants provoked by enhanced ultraviolet-C radiation. *Plant Growth Regulation*, 57: 145-152.

Kuehn, G. D., Phillips, G. C. (2005) Role of polyamines in apoptosis and other recent advances in plant polyamines. *Critical Reviews in Plant Science*, 24: 123-130.

Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228: 367-381.

Kuznetsov, V., Radyukina, N. L., Shevyakova, N. I. (2006). Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53: 583-604.

Kuznetsov, V., Shorina, M., Aronova, E., Stetsenko, L., Rakitin, V., Shevyakova, N. I. (2007) NaCl and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. *Plant Science*, 172: 363-370.

Lago, J. H. G., Junior, P. A., Aquino, C. M., Moreno, P. R. H., Ohara, M. T., Limberger, R. P., Apel, M. A., Henriques, A. T. (2004) Volatile oils from leaves and stem barks of *Cedrela fissilis* (Meliaceae): Chemical composition and antibacterial activities. *Flavour and Fragrance Journal*, 19: 448-451.

Lehninger, D. N., Cox, M. M. (2011) *Princípios de Bioquímica*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 1274 p.

- Leon, E. A. B. (2010) *Germinação, estabelecimento, regeneração e calogênese in vitro em explantes de açoita-cavalo (Luehea divaricata Mart. & Zucc.)* Tese (mestrado em engenharia florestal) - Santa Maria - RS, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, 59p.
- Li, Z., Burrit, D. J. (2003) Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. *Plant Growth Regulation*, 40: 65-74.
- Magalhães, S. R., Lima e Borges, E. E., Berger, A. P. A. (2010) Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (vell.) S. F. Blake durante a germinação. *Ciência Florestal*, 20: 589-595.
- Maki, H., Ando, S., Kodama, H., Komamine, A. (1991) Polyamines and the cell Cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. *Plant Physiology*, 96: 1008-1013.
- Mapelli, S., Brambilla, I., Bertani, A. (2001) Free amino acids in walnut kernels and young seedlings. *Tree Physiology*, 21: 1299-1302.
- Marcos-Filho, J. (2005) *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ, 495 p.
- Martins, L., Lago, A. A. (2008) Conservação de semente de *Cedrela fissilis*: teor de água da semente e temperatura do ambiente. *Revista brasileira de sementes*, 30: 161-167.
- Masetto, T. E., Faria, J. M. R., Queiroz, S. E. E. (2008) Avaliação da qualidade de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* - Meliaceae) pelo teste de raios X. *Ciência e Agrotecnologia*. 32: 1708-1712.
- Matilla, A. J. (1996). Polyamines and seed germination. *Seed Science Research*, 6: 81-93.
- Minocha, R., Dale, R. S., Cathie, R., Steele, K. D., Minocha, S. C. (1999) Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 105: 155-164.
- Mirza, J. I., Bagni N. (1991) Effects of exogenous polyamines and difluoromethylornithine on seed germination and root growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 10: 163-168.
- Mittermeier, R. A., Fonseca, G. A. B da., Rylands, A. B., Brandon, K. (2005) Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. *Megadiversidade*. 1: 14-21.
- Mohebalipour, S., Aharizad, S., Mohammadi, S. A., Motallebiazar, A. R., Arefi, H. M. (2012) Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10: 280-286.
- Morot-Gaudry, J. F., Job, D., Lea, P. J. (2001) Amino acid metabolism. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF Plant nitrogen. New York: Springer (eds.) Berlin Heidelberg 167-211 p.

- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B., Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 845-853.
- Naija, S., Elloumi, N., Ammar, S., Kevers, C., Dommès, J. (2009), Involvement of polyamines in the adventitious rooting of micropropagated shoots of the apple rootstock M106. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45: 83-91.
- Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S., Ito, A. (2001) Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Scientia Horticulturae*, 90: 85-92.
- Neto, V. B. P., Da Mota, T. R., Otoni, W. C. (2003) Direct organogenesis from hypocotyls derived explants of annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75: 159-167.
- Nicoli, P. M.; Paiva, R.; Nogueira, R. C.; Santana, J. R. F.; Silva, L. C.; Silva, D. P. C.; Porto, J. M. P. (2008) Ajuste no processo de micropropagação de barbatimão. *Ciência Rural*, 38: 685-689.
- Nkang, A. (2002) Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *Journal of Plant Physiology*, 159: 473-483.
- Nunes, C. F., Pasqual, M., Santos, D. N., Custódio, T. N., Araújo, A. G. (2008) Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-mansô. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 9-14.
- Nunes, E. C., Benson, E. E., Oltramari, A. C., Araujo, P. S., Moser, J. R., Viana, A. M. (2003) *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, 12: 837-848.
- Nunes, E. C., Castilho, C. V., Moreno, F. N., Viana, A. M. (2002) *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell tissue and Organ Culture*, 70: 259-268.
- Oliveira-Filho, A. T., Fontes, M. A. L. (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica*, 32: 793-810.
- Oliveira, I. C., Brenner, E., Chiu, J., Hsieh, M. H., Kouranov, A., Lam, H. M., Shin, M. J., Coruzzi, G. (2001) Metabolite and light regulation of metabolism in plants: Lessons from the study of a single biochemical pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological*, 34: 567-575.
- Onomo, P. F., Niemenak, N., Ndoumou, D. O., Lieberei, R. (2010) Change in amino acids content during germination and seedling growth of *Cola* sp. *African Journal of Biotechnology*, 9: 5632-5642.
- Paiva, H. N., Gomes, J. M. (1995) *Propagação vegetativa de espécies florestais*. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 40 p.

- Papadakis, A. K., Paschalidis, K. A., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2005) Biosynthesis profile and endogenous titers of polyamines differ in totipotent and recalcitrant protoplasts. *Physiology. Plantarum*, 125: 10-20.
- Paschalidis, K. A., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2005) Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. Correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiology*, 138: 142-152.
- Pastorini, L. H., Bacarin, M. A., Trevizol, F. C., Bervald, C. M. P., Fernandes, H. S. (2003) Produção e teor de carboidratos não estruturais em tubérculos de batata obtidos em duas épocas de plantio. *Horticultura Brasileira*, 21: 660-665.
- Pawłowski, T. A. (2010) Proteomic approach to analyze dormancy breaking of tree seeds. *Plant Molecular Biology*, 73: 15-25.
- Pawłowski, T. A. (2009) Proteome analysis of Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds dormancy breaking and germination: influence of abscisic and gibberellic acids. *BMC Plant Biology*, 4: 9-48.
- Peixoto, G. L., Martins, S. V., Silva, A. F., Silva, E. (2004) Composição florística do componente arbóreo de um trecho de Floresta Atlântica na área de proteção ambiental da Serra da Capoeira Grande, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, 18: 151-160.
- Penfield, S., Graham, S., Graham, I. (2005) Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: *Arabidopsis* as a model system. *Biochemical Society Transactions*, 33: 380-383.
- Pescador, P., Kerbauy, G. B., E. Kraus, J. E., Ferreira, W. M., Guerra, M. P., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. (2008) Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44: 289-299.
- Pieruzzi, F. P. (2009) *Quantificação de aminoácidos, poliaminas, AIA, ABA e marcadores protéicos na germinação de sementes de Ocotea odorifera*. Tese (Mestrado em Ciências) - São Paulo - SP, Universidade de São Paulo – USP, 69p.
- Pieruzzi, F. P., Dias, L. L. C., Balbuena, T. S., Santa-Catarina, C., Santos, A. L. W dos, 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: 337-345.
- Pijut, P. M., Beasley, R. R., Lawson, S. S., Palla, K. J., Stevens, M. E., Wang, Y. (2012) *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species – a review (2001-2011). *Propagation of Ornamental Plants*, 12: 25-51.
- Pinto, L. P. S., Costa, J. P. de O., Fonseca, G. A. B., Costa, C. M. R. C. (1997) Mata Atlântica: Ciência, conservação e políticas. Documentos Ambientais, Secretaria do Meio Ambiente, Governo do Estado de São Paulo, São Paulo.

- Pinto, P. P., Bedê, L., Paese, A., Fonseca, M., Paglia, A., Lamas, I. (2006) Mata Atlântica brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um *hotspot* mundial. In: Rocha, C. F. D., Bergallo, H. G., Sluys, M. V., Alves, M. A. S. (Eds.). *Biologia da conservação: essências*. São Carlos: Rima, 91-118 p.
- Polit, J. T., Maszewski, J., Kazmierczak, A. (2003) Effect of BAP and IAA on the expression of G1 and G2 control points and G1-S and G2-M transitions in root meristem cells of *Vicia faba*. *Cell Biology International*, 27: 559-566.
- Pontes, C. A., Borges, E. E. L., Borges, R. C. G., Soares, C. P. B. (2002) Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (Garapa) durante a embebição. *Revista Árvore*, 26: 593-601.
- Puga-Hermida, M. I., Gallardo, M., Rodriguez-Gacio, M. C. and Matilla, A. J. (2006) Polyamine contents, ethylene synthesis, and BrACO2 expression during turnip germination. *Biology Plantarum*, 50: 574-580.
- Ramesh, M., Umate, P., Rao, K. V., Sadanandam, A. (2005) Micropropagation of *Terminalia bellirica* Roxb. - a sericulture and medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41: 320-323.
- Ribas, L. L. F., Zanette, F., Kulchetscki, L., Guerra, M. P. (2005) Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. *Revista Árvore*, 29: 517-524.
- Rimando, A. M., Perkins-Veazie, P. M. (2005) Determination of citrulline in watermelon rind. *Journal of Chromatography A*, 1078: 196-200.
- Rocha, M., Licausi, F., Araujo, W., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A. R., Van Dongen, J. T. (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 152: 1501-1513.
- Rocha, S. C., Quorim, M., Ribas, L. L. F., Koehler, H. H. (2007) Micropropagação de *Cabralea canjerana*. *Revista Árvore*, 31: 43-50.
- Rock, C. D., Quatrano, R. S. (1995). The role of hormones during seed development. 671-697 p. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2 ed. Kluwer Academic Publishers.
- Rodriguez, C., Frias, J., Vidal-Valverde, C., Hernandez, A. (2008) Correlation between some nitrogen fractions, lysine, histidine, tyrosine, and ornithine contents during the germination of peas, beans, and lentils. *Food Chemistry*, 108: 245-252.
- Roitsch, T., Ehner, R. (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation*, 32: 359-367.
- Rojas-Aréchiga, M., Vásquez-Yanes, C. (2000) Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*, 44: 85-104.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved e novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 675-709.

Rozan, P., Kuo, Y., Lambein, F. (2000) Free amino acids present in commercially available seedlings sold for human consumption. A potential hazard for consumers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 716-723.

Sá, M. E. L. (2001) Propagação *in vitro* de Diferentes Genótipos de Abacaxizeiro por meio de seccionamento de plântulas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23: 17-20.

Saldanha, A. L. M. (2010) *Protocolo para propagação in vitro de cedro (Cedrela odorata L.)*. Tese (Dissertação de mestrado em agronomia) - Belém - PA, Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA, 56 p.

Sangwan, R. S., Sangwan-Norreel, B. S., Harada, H. (1997) In vitro techniques and plant morphogenesis: fundamental aspects and practical applications. *Plant Biotechnology*, 14, 93-100.

Santa-Catarina, C., Maciel, S. da C., Pedrotti, E. L. (2001). Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). *Revista Brasileira de Botânica*, 24: 501-510.

Santa-Catarina, C., Silveira, V., Balbuena, T. S., Viana, A, M., Maranhão, M. E. E., Handro, W., Floh, E. I. S. (2006) IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regulation*, 49: 237-247.

Santana, J. R. F., Crepaldi, I. C. (1998) Cultura de tecidos em espécies locais. Anais do XIII Encontro de Genética do Nordeste, Feira de Santana: Sociedade Brasileira de Genética, 19p.

Sasaki, R. M., Felipe, G. M. (1992) Remoção dos cotilédones e desenvolvimento inicial de *Dalbergiamiscolobium*. *Revista Brasileira de Botânica*, 15: 5-16.

Schottz, E. S., Filho, A. N. K. , Tracz, A. L., Koehler, H., Ribas, L. L. F., Quoirin, M. (2007) Multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) a partir de material juvenil. *Ciência Florestal*, 17: 109-117.

Shoeb, F., Yadav, J. S., Bajaj, S., Rajam, M. V. (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism indifferent genotypes of Indica rice. *Plant Science*, 160: 1229-1235.

Shutov, A. D., Vaintraub, I. A. (1987) The degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*, 26: 1557-1566.

Silva, P. P., Contim, L. A. S., Freitas, D. V., Aride, P. H. R., Santos, A. L. W. (2010) Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn). *Scientia Agraria*, 11: 437-443.

Silva, F. F. S (2010). *Qualidade de sementes e produção de mudas de Sideroxylon obtusifolium (SAPOTACEAE) de duas procedências*. Tese (mestrado em agronomia) - Areia - PB, Universidade Federal da Paraíba - UFPB, 120p

- Silveira, V., Balbuena, T. S., Santa-Catarina, C., Floh, E. I. S., Handro, W. (2004a) Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regulation*, 44: 147-156.
- Silveira, V., Floh, E. I. S., Handro, W., Guerra, M. P. (2004b). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69: 233-249.
- Silveira, V., Santa-Catarina, C., Tun, N. N., Scherer, G. F. E, Handro, W., Guerra, M. P., 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*, 171:91-98.
- Sinska, I., Lewandowska, U. (2006) Polyamines and ethylene in the removal of embryonal dormancy in apple seeds. *Physiologia Plantarum*, 81: 59-64.
- Smeeckens, S., Ma J., Hanson, J., Rolland, F. (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 274-279.
- Smeeckens, S. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 49-81.
- Snedden, W. A., Fromm, H. (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science*, 3: 299-304.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1995) *Biometry*. 3. ed. New York: Freeman and Co. 957p.
- Stoynova-Bakalova, E., Petrov, P. I. (2009) Modulating zucchini cotyledon plate meristem activity by interactions between the cycline-dependent kinase inhibitor roscovitine and cytokinins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97:263-269.
- Tabor, C. W, Tabor, H. (1984) Polyamines. *Annual Review of Biochemistry* 53: 749-790.
- Tahir, M., Vandenberg, A., Chibbar, R. N. (2011) Influence of environment on seed soluble carbohydrates in selected lentil cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 596-602.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2009) *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed , 848 p.
- Takahashi , T., Kakehi, J. I. (2010) Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of Botany*, 105: 1-6.
- Tegeder, M. (2012) Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current Opinion in Plant Biology*, 15: 1-7.
- Thomas, W. W., Carvalho, A. M. V., Amorim, A. M. A., Garrisson, J., Larbeláez, A. (1998) Plant endemism in two forest in southern Bahia, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 7: 311-322.

Thorpe, T. A. (1994) Morphogenesis and regeneration. In: Vasil, I. K., Thorpe, T. A (Ed). *Plant Cell, and Tissue Culture*. Dordrecht: Kluwer, 17-35 p.

Torres, A. C., Ferreira, A. T., Sá, F. G., Buso, J. A., Caldas, L.S., Nascimento, A.S., Brígido, M. M., Romano, E. (2000) *Glossário de Biotecnologia Vegetal*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 128 p.

Tzin, V., Galili, G. (2010) The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis book*, 8: 1-32.

Uzelac, B., Janošević, D., Stojičić, D., Budimir, S. (2012) Effect of cytokinins on shoot apical meristem in *nicotiana tabacum*. *Archives of Biological Sciences*, 64: 511-516.

Vila, S., Gonzalez, H., Rey, H., Mroginski, L. (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cedrela fissilis*. *Biologia Plantarum*, 53: 383-386.

Villela, D. M., Nascimento, M. T., De Aragão, L. E. O. C., Da Gama D. M. (2006) Effect of selective logging on forest structure and nutrient cycling in a seasonally dry Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 33: 506-516.

Voet, D., Voet, J., Patt, C. W. (2000) *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: ArtMed, 931 p.

Weitbrecht, K., Muller, K., Leubner-Metzger, G. (2011) First off the mark: early seed germination. *Journal of experimental botany*, 62: 3289-3309.

Xavier, A., Wendling, I., Da Silva, R. L. (2009) *Silvicultura clonal: princípios e técnicas*. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 272 p.

Yang, Z., Zhang, L., Diao, F., Huang, M., Wu, N. (2004) Sucrose regulates elongation of carrot somatic embryo radicles as a signal molecule. *Plant Molecular Biology*, 54: 441-459.

Zohra, F., Abdul, M., Samar, F., Anjum, A., Shahid, U. (2009) Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates. *Turkish Journal of Botany*, 33: 393-405.