

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS AO  
DESENVOLVIMENTO E GERMINAÇÃO DA SEMENTE E NA  
INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM *Paubrasilia  
echinata* Lam E. Gagnon, H. C. Lima & G. P. Lewis (FABACEAE)

**ROSANA GOBBI VETTORAZZI**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2021

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS AO  
DESENVOLVIMENTO E GERMINAÇÃO DA SEMENTE E NA  
INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM *Paubrasilia  
echinata* Lam E. Gagnon, H. C. Lima & G. P. Lewis (FABACEAE)

**ROSANA GOBBI VETTORAZZI**

“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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudete Santa Catarina

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2021

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

V592

Vettorazzi, Rosana Gobbi.

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO E GERMINAÇÃO DA SEMENTE E NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM *Paubrasilia echinata* Lam E. Gagnon, H. C. Lima & G. P. Lewis (FABACEAE) / Rosana Gobbi Vettorazzi. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

51 f. : il.

Bibliografia: 39 - 51.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.

Orientadora: Claudete Santa Catarina.

Coorientadora: Kariane Rodrigues de Sousa.

1. *Caesalpinia echinata* Lam. 2. Desenvolvimento de sementes. 3. Embriogênese. 4. Árvores nativas. 5. Pau-brasil. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

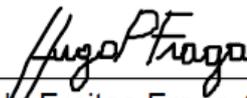
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS AO  
DESENVOLVIMENTO E GERMINAÇÃO DA SEMENTE E NA  
INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM *Paubrasilia  
echinata* Lam E. Gagnon, H. C. Lima & G. P. Lewis (FABACEAE)

**ROSANA GOBBI VETTORAZZI**

“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 26 de fevereiro de 2021.

Comissão Examinadora:



---

Prof. Dr. Hugo Pacheco de Freitas Fraga (D.Sc., Ciências) - UFPR



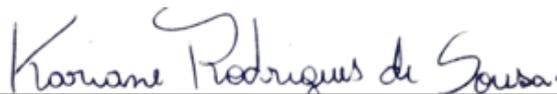
---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Virginia Silva carvalho (D.Sc., Fitotecnia) - UENF



---

Dr<sup>a</sup>. Ellen de Moura Vale (D.Sc., Genética e melhoramento de plantas) - UENF



---

Dr<sup>a</sup>. Kariane Rodrigues de Sousa (D.Sc., Produção vegetal) - UENF  
(Co-orientadora)



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudete Santa Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas graças e bênçãos concedidas;

A minha orientadora, Professora Dra. Claudete Santa Catarina, pela paciência, apoio, incentivo e confiança;

Ao Professor Vanildo Silveira pela colaboração na realização deste trabalho;

Aos meus pais Jorge e Maria da Penha pelo amor incondicional, pelo amparo nos momentos difíceis e pelas orações;

Ao meu irmão Renato pelo companheirismo, incentivo e momentos de descontração;

Aos amigos do grupo de pesquisa em Biotecnologia Vegetal, em especial à Kariane, Victor, Joviana e Renan pelos momentos de descontração, companheirismo, amizade e colaboração que foram essenciais para a realização deste trabalho;

A minha co-orientadora Dra. Kariane Rodrigues de Sousa por todo apoio durante a realização do trabalho, além dos momentos felizes e sorrisos compartilhados;

Aos amigos que conquistei durante a caminhada, por permitirem que a jornada fosse mais leve. Desejo todo sucesso a vocês;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de realização desta pós-graduação e pela concessão da bolsa;

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

A todos os funcionários da UENF;

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

## Sumário

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Mata Atlântica .....	4
2.2. Espécie de estudo .....	6
2.3. Desenvolvimento da semente e germinação.....	8
2.4. Embriogênese somática.....	10
2.5. Poliaminas (PAs) .....	13
3. OBJETIVOS .....	15
3.1. Objetivo geral .....	15
3.2. Objetivos específicos .....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
4.1. Material vegetal .....	16
4.2. Determinação do comprimento, matéria fresca (MF) e seca (MS) e conteúdo de PAs durante o desenvolvimento das sementes .....	17
4.3. Efeito do desenvolvimento da semente na percentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), MF e MS e conteúdo de PAs .....	17
4.4. Germinação e determinação do IVG .....	18
4.5. Determinação da MF e MS .....	18
4.6. Determinação do conteúdo de PAs livres .....	19
4.7. Indução da embriogênese somática .....	19

4.8. Análises histomorfológicas.....	20
4.9. Análise estatística dos dados .....	21
5. RESULTADOS .....	22
5.1. Comprimento, MF e MS, e conteúdo de PAs durante o desenvolvimento das sementes de <i>P. echinata</i> .....	22
5.2. Efeito do desenvolvimento da semente na percentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), MF e MS e conteúdo de PAs .....	25
5.3. Indução da embriogênese somática .....	29
6. DISCUSSÃO .....	33
7. CONCLUSÕES .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## RESUMO

VETTORAZZI, Rosana Gobbi. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2021. Aspectos morfológicos e bioquímicos associados ao desenvolvimento da semente e germinação e na indução da embriogênese somática direta em *Paubrasilia echinata* Lam. E. Gagnon, H. C. Lima e G. P. Lewis (FABACEAE). Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudete Santa Catarina. Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Kariane Rodrigues de Sousa.

*Paubrasilia echinata*, conhecida popularmente como pau-brasil, é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae. Nativa da Mata Atlântica, esta espécie foi intensamente explorada devido ao seu valor econômico e, atualmente, encontra-se ameaçada de extinção. Nesse sentido, o uso de técnicas biotecnológicas, como a embriogênese somática, pode ser uma alternativa para a propagação desta espécie. Desta forma, conhecer os aspectos bioquímicos associados ao desenvolvimento da embriogênese zigótica e germinação de sementes desta espécie são importantes, e podem fornecer informações relevantes para relacionar com o desenvolvimento da embriogênese somática. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos associados ao desenvolvimento da semente e germinação, e na indução da embriogênese somática em *P. echinata*. Sementes de *P. echinata* coletadas com quatro, seis e oito semanas após a floração (SAF) foram utilizadas para avaliar o comprimento, matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) e conteúdo de poliaminas (PAs) durante os diferentes tempos de coleta

(SAF), bem como o efeito do desenvolvimento da semente na germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), MF e MS, e alterações no conteúdo de PAs durante o processo germinativo. Para a indução da embriogênese somática, foram utilizadas sementes imaturas de *P. echinata* coletadas com 3 SAF. As sementes foram então inoculadas em meio de cultura MS com duas concentrações (0 e 10  $\mu\text{M}$ ) de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Após 120 dias de inoculação foi avaliada a taxa de indução de calos (via indireta) e a indução de embriões somáticos (via direta), que foram coletados para análises histomorfológicas. Os resultados obtidos sugerem um papel relevante da putrescina no início do desenvolvimento das sementes e de espermidina (Spd) e espermina (Spm) nas etapas finais do desenvolvimento das sementes. Além disso, as PAs Spd e Spm podem estar relacionadas com o processo germinativo, ocorrendo em maior conteúdo nas sementes imaturas coletadas com 6 SAF e maduras com 8 SAF, as quais germinaram. A indução da embriogênese somática pela via direta foi obtida em meio de cultura sem a presença de 2,4-D, obtendo-se embriões somáticos em estágio cotiledonar. No entanto, a baixa porcentagem de indução torna necessário aprimorar esta etapa do processo. Os resultados obtidos para o desenvolvimento da semente, germinação e indução da embriogênese somática são inéditos para esta espécie e possibilitaram o conhecimento inicial da indução da embriogênese somática, que poderá ser aprimorado em estudos futuros.

## ABSTRACT

VETTORAZZI, Rosana Gobbi. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February 2021. Morphological and biochemical aspects associated with seed development and germination and in the induction of direct somatic embryogenesis in *Paubrasilia echinata* Lam. E. Gagnon, H. C. Lima e G. P. Lewis (FABACEAE). Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudete Santa Catarina. Co-advisor: Dr<sup>a</sup>. Kariane Rodrigues de Sousa.

*Paubrasilia echinata*, known as pau-brasil, is a tree species belonging to the Fabaceae family. Native to the Atlantic Forest, this species has been intensively explored due to its economic value and is currently threatened with extinction. In this sense, the use of biotechnological techniques, such as somatic embryogenesis, can be an alternative for the propagation of this species. Thus, knowing the biochemical aspects associated with the development of zygotic embryogenesis and seed germination of this species are important, and can be related to the development of somatic embryogenesis. Thus, this study aimed to study the morphological, physiological and biochemical aspects associated with seed development and germination, and in the induction of somatic embryogenesis in *P. echinata*. Seeds collected at 4, 6 and 8 weeks after flowering (WAF) were used to evaluate the length, fresh matter (FM) and dry matter (DM) and polyamine content (PAs) during the different (WAF), as well as, they were used to evaluate the effect of seed development on germination, germination speed index (IVG), FM and DM and changes in PA content during the germination.

For the induction of somatic embryogenesis, immature seeds collected after 3 WAF were used. The seeds were then inoculated in MS culture medium with two concentrations (0 and 10  $\mu$ M) of 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D). After 120 days of inoculation, the callus induction rate (indirect route) and somatic embryo induction (direct route) were evaluated, and samples were collected for histomorphological analysis. The results obtained suggest a relevant role of putrescine in the beginning of seed development and spermidine (Spd) and spermine (Spm) in the final stages of seed development. In addition, PAs Spd and Spm may be related to the germination process, occurring in greater content in immature seed collected at 6 WAF and mature seeds at 8 WAF, which germinated. Induction of somatic embryogenesis by the direct route was obtained in a culture medium without the presence of 2,4-D, obtaining somatic embryos in cotyledonary stage. However, the low percentage of induction makes it necessary to improve this stage of the process. The results obtained for the development of the seed, germination and induction of somatic embryogenesis are relevant for this species and made possible the initial knowledge of the induction of somatic embryogenesis, which may be improved in future studies.

## 1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é considerada uma das florestas mais ricas em biodiversidade do planeta e abrange cerca de 15% do território brasileiro. Este bioma estende-se pelos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Sergipe (Fundação SOS Mata Atlântica, 2020). Atualmente, restam apenas 12,4% dos remanescentes florestais acima de 3 ha, e destes remanescentes, mais da metade se concentra em áreas privadas (Fundação SOS Mata Atlântica, 2020).

Dentre os fatores que favoreceram a sua devastação, destacam-se as atividades antrópicas, como a expansão da agricultura e da pecuária, a urbanização e a exploração madeireira (Dean, 1996). Segundo Pavan-Fruehauf (2000), o extrativismo vegetal teve início com a exploração do pau-brasil, o qual foi quase extinto da costa brasileira nos primeiros 100 anos de colonização, e posteriormente de forma mais intensiva, outras espécies passaram a ser exploradas (Young, 2005). Além disso, no decorrer da história, a Mata Atlântica foi sendo substituída primeiramente pela cana-de-açúcar na região Nordeste e posteriormente, por plantações de café, pecuária, cacau e eucalipto nas demais regiões (Colombo e Joly, 2010).

Neste sentido, programas de conservação e a realização de estudos relacionados à propagação de espécies arbóreas, como a *Paubrasilia echinata*, com o uso de metodologias alternativas, como a embriogênese somática, podem

ser uma alternativa importante para a propagação destas espécies e apresentam potencial de aplicação na conservação e restauração de áreas degradadas. Adicionalmente, estudos relacionados a biologia reprodutiva, desenvolvimento de sementes e germinação são importantes para conhecer as alterações bioquímicas e morfológicas que permitam melhor conservação das sementes como fonte de propágulos em arbóreas. Estes estudos se destacam para as espécies arbóreas nativas e que se encontram ameaçadas de extinção, e ainda possuem sementes com reduzida percentagem de germinação durante o armazenamento.

Estudos morfológicos, bioquímicos e moleculares relacionados com a embriogênese zigótica e desenvolvimento das sementes, assim como durante a germinação, vêm sendo realizados para várias espécies arbóreas (Santa-Catarina et al., 2006; Aragão et al., 2015; de Oliveira et al., 2017; Goh et al., 2019). Estes estudos são importantes, pois muitos mecanismos que controlam o desenvolvimento do embrião zigótico estão envolvidos na subsequente diferenciação do tecido na planta adulta. Além disso, a investigação das alterações bioquímicas e moleculares que ocorrem na embriogênese zigótica é de interesse biotecnológico para a busca de novos estimuladores da embriogênese somática e outros meios de reprodução vegetal *in vitro* (Tvorogova e Lutova, 2018).

A embriogênese somática possibilita a obtenção de embriões somáticos e tem sido descrita em várias espécies (Isah, 2016), incluindo arbóreas nativas ameaçadas de extinção (Becwar et al., 1990; Guerra et al., 2001; Santa-Catarina et al., 2001; Carvalho, 2003; Prakash e Gorumurthi, 2010). A embriogênese somática é um processo pelo qual células somáticas se diferenciam em embriões somáticos por meio de estádios de desenvolvimento semelhantes aos de embriões zigóticos (Tautorius et al., 1991). Denomina-se embrião somático aquele derivado de células somáticas já diferenciadas (Termignoni, 2005). Este processo pode ocorrer de forma direta ou indireta, sendo que na via indireta ocorre a formação de calos antes da diferenciação de embriões somáticos (Zimmerman, 1993).

Alguns estudos iniciais visando a obtenção de culturas embriogênicas foram desenvolvidos para *P. echinata*, porém não foram obtidos embriões somáticos (Chu et al., 2008; Werner et al., 2009; Werner et al., 2010). Em trabalhos recentes do grupo, a indução da embriogênese somática a partir de

embriões zigóticos imaturos e a obtenção de embriões somáticos em estádios iniciais de desenvolvimento foram obtidos para esta espécie (Rangel, 2018). Entretanto, a obtenção de embriões somáticos no estágio cotiledonar e a conversão destes em plantas ainda precisa ser melhor estudada. Estes resultados foram fundamentais para o presente trabalho, permitindo a realização de novos estudos para melhor compreender os fatores relacionados à embriogênese somática nesta espécie, fundamentais para entender como as células somáticas se tornam competentes para formar embriões somáticos e, posteriormente, a regeneração em uma planta completa.

Dentre os fatores que controlam a embriogênese somática destaca-se o efeito de reguladores de crescimento vegetal, como as poliaminas (PAs). As PAs são moléculas alifáticas de baixo peso molecular e atuam em vários processos nas plantas, incluindo a embriogênese somática, modulando as respostas morfogênicas *in vitro* (Walden et al., 1997; Bais e Ravishankar, 2002; Kuznetsov et al., 2006; Silveira et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2007; Alcázar et al., 2010; Reis et al., 2016). Ademais, estudos relacionados com alterações no perfil de PAs durante o desenvolvimento da semente e germinação são relevantes para entender o papel destes compostos no desenvolvimento da embriogênese em *P. echinata*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Mata Atlântica

A Mata Atlântica é considerada uma das florestas mais ricas em biodiversidade do planeta e estende-se por 17 Estados da costa brasileira, desde o Nordeste até a Região Sul (Fundação SOS Mata Atlântica, 2020). O bioma é composto por um conjunto de formações florestais caracterizadas como Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Decidual e Floresta Estacional Semidecidual. Além disso, também abriga ecossistemas como Restingas, Manguezais e Campos de Altitude (Fundação SOS Mata Atlântica, 2020).

Originalmente a área ocupada pela Mata Atlântica correspondia a 1.315.460 km<sup>2</sup>. No entanto, atualmente restam apenas 12,4% dos remanescentes florestais acima de 3 ha, sendo um dos biomas brasileiros mais devastados e com alta fragmentação florestal (Ribeiro et al., 2009; Fundação SOS Mata Atlântica, 2020). Dentre os fatores que favoreceram a sua devastação destacam-se as atividades antrópicas, como a expansão da agricultura e da pecuária, a exploração madeireira e a urbanização, uma vez que a Mata Atlântica compreende a maior concentração urbana do país (mais de 60% da população brasileira), o que resulta no excessivo uso do solo, perda da vegetação e fragmentação de áreas de floresta (Dean, 1996; Scarano e Ceotto, 2015).

A Mata Atlântica brasileira tem um longo histórico de devastação e começou antes mesmo da chegada dos colonizadores em 1500, quando os nativos usavam os recursos florestais para sua subsistência, porém se intensificou na época do descobrimento com a exploração do pau-brasil, o qual foi quase extinto da costa brasileira nos primeiros 100 anos de colonização. Posteriormente de forma mais extensiva, outras espécies passaram também a ser exploradas (Pavan-Fruehauf, 2000; Young, 2005; Gaspar et al., 2008). Além disso, no decorrer da história, a Mata Atlântica foi sendo substituída por plantações de cana-de-açúcar na região Nordeste e posteriormente por lavouras de café, pastagens, cacau e plantações de eucalipto nas demais regiões (Colombo e Joly, 2010). Atualmente, cerca de 60% da lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção é constituída por espécies da Mata Atlântica (Martinelli e Moraes, 2013).

Embora tenha ocorrido a destruição de boa parte de sua cobertura original, a Mata Atlântica ainda abriga mais de 20.000 espécies de plantas vasculares, e destas, cerca de 8.000 são endêmicas. A elevada biodiversidade, o alto grau de endemismo e também o acelerado processo de fragmentação e perda de cobertura vegetal do bioma, fizeram com que a Mata Atlântica passasse a ser considerada um dos principais *hotspots* mundiais para a conservação da biodiversidade (Myers et al., 2000; Mittermeier et al., 2005; Fundação SOS Mata Atlântica, 2020).

No entanto, a conservação da Mata Atlântica bem como sua recuperação, representam um grande desafio, uma vez que as estratégias e intervenções necessárias deparam-se com dificuldades, entre elas a fragmentação do bioma, o pouco conhecimento a respeito da biologia das espécies, a perda de viabilidade das sementes de algumas espécies nativas após pouco tempo de armazenamento e a baixa disponibilidade de mudas (Hellmann et al., 2006; Pinto et al., 2006; Rodrigues et al., 2009; Walker et al., 2015).

Portanto, programas de conservação e estudos relacionados à propagação de espécies arbóreas, como o uso de metodologias alternativas de propagação, em especial de espécies ameaçadas de extinção, são importantes para a propagação e conservação da biodiversidade e restauração de áreas degradadas.

## 2.2. Espécie de estudo

Conhecida popularmente como pau-brasil, a espécie *P. echinata*, nativa da Mata Atlântica, pertence à família Fabaceae e possui ocorrência nos Estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte (Martinelli e Moraes, 2013).

A espécie possui uma importância biológica, histórica e cultural tão grande que renomeou o território brasileiro e passou a ser considerada Árvore Nacional pela lei nº 6.607 de 7 de dezembro de 1978 (Bueno, 2002; Rocha, 2011). A espécie foi originalmente descrita por Lamarck em 1785 como *Caesalpinia echinata*, porém, recentemente, o grupo *Caesalpinia* foi revisado e a espécie passou por uma alteração taxonômica baseada em evidências morfológicas e filogenéticas passando a integrar o novo gênero monoespecífico *Paubrasilia* (Gagnon et al., 2016).

*P. echinata* é classificada como uma espécie semidecídua, heliófita ou esciófita, característica da floresta pluvial atlântica. Os espécimes são de fácil identificação e apresentam características marcantes. As inflorescências possuem flores em cacho de coloração amarela com uma mancha vermelho-púrpura em uma das pétalas (Lorenzi, 1992; CNCFlora, 2012). Floresce entre o final do mês de setembro a outubro e a maturação de seus frutos ocorre entre novembro e janeiro (Lorenzi, 1992). Possui frutos do tipo vagem, cobertos por espinhos, e apresenta dispersão autocórica e a deiscência ocorre de forma explosiva, liberando 1-2 sementes por fruto. Além disso, o tronco possui coloração castanha e cerne vermelho, exsudando uma seiva vermelha quando ferido (Gagnon et al., 2016).

Esta espécie foi intensamente explorada desde a época da colonização, e um dos principais motivos foi a sua utilização na produção do princípio colorante brasileína, extraído de seu tronco e muito utilizado para tingir tecidos e na fabricação de tinta (Martinelli e Moraes, 2013). Em meados de 1800 quase todos os corantes naturais foram substituídos por produtos sintéticos, o que diminuiu momentaneamente a exploração do pau-brasil. No entanto, devido ao fato de sua madeira combinar uma série de propriedades como ressonância, densidade e durabilidade, a espécie foi identificada como a mais adequada para fabricação de

arcos de violino (Bueno, 2002; Pierce e Thorner, 2002; Bucur e Declercq, 2006; Alves et al., 2008a; Alves et al., 2008b; Longui et al., 2010; Martinelli e Moraes, 2013).

Devido ao seu histórico de exploração a espécie é considerada ameaçada de extinção, e está incluída na lista vermelha da International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2021) na categoria em perigo, no Livro Vermelho da Flora do Brasil (Martinelli e Moraes, 2013) e na Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2014). A retirada desta espécie de florestas naturais e sua exportação é proibida desde 2007, uma vez que resta cerca de 8% de sua extensão original (IUCN e TRAFFIC, 2007). Neste sentido, torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas referentes à sua propagação e a aplicação de estratégias de sua conservação, como a criação de unidades de conservação (Martinelli e Moraes, 2013).

Alguns estudos foram realizados com esta espécie durante o desenvolvimento da semente e na morfogênese *in vitro*. Recentemente, Araújo e Barbedo (2017) analisaram a tolerância a dessecação natural de sementes imaturas em diferentes estádios de desenvolvimento, concluindo que a tolerância à dessecação aumenta com o avanço da maturação. Adicionalmente, estudos mostram que as sementes de pau-brasil são tolerantes ao armazenamento em baixa temperatura (-18 °C), desde que o conteúdo de água não seja superior a 12,7% (Hellmann et al., 2006). Mello et al. (2013) demonstraram que sementes de pau-brasil conseguem se manter viáveis após cinco anos de armazenamento a -18 °C. Também foram realizados estudos para determinar o ponto de maturação fisiológica das sementes, concluindo que o estágio ideal para coleta das sementes ocorre entre a 8ª e 9ª semana após a antese (Barbedo et al., 2002; Aguiar et al., 2007). No entanto, até o momento não há estudos mostrando alterações bioquímicas referentes ao conteúdo de PAs durante o desenvolvimento da semente e germinação para esta espécie.

Estudos realizados até o momento sobre a embriogênese somática de pau-brasil mostram que não houve a indução de embriões somáticos, sendo obtida apenas indução de calos a partir de folíolos jovens (Werner et al., 2009; Werner et al., 2010). Culturas embriogênicas foram induzidas a partir de sementes imaturas, e o tratamento de maturação com ácido abscísico possibilitou a evolução de embriões somáticos em estádios iniciais de desenvolvimento

(Rangel, 2018). Adicionalmente, não há estudos mostrando a obtenção de embriões somáticos em estádios avançados (cotiledonar) de desenvolvimento. Neste sentido, é importante a realização de estudos morfológicos e bioquímicos durante o desenvolvimento da semente e germinação e aprimorar a indução de culturas embriogênicas para esta espécie.

### 2.3. Desenvolvimento da semente e germinação

A embriogênese zigótica em plantas superiores corresponde ao período de desenvolvimento a partir da fertilização, em que o zigoto é submetido a uma série de divisões celulares e eventos bioquímicos, resultando na formação de um embrião maduro durante o desenvolvimento da semente (De Smet et al., 2010; Harada et al., 2010). Este processo envolve diversas vias de desenvolvimento coordenadas por hormônios e fornece um sistema modelo para analisar padrões de organização celular, alterações no conteúdo de proteínas, hormônios e na expressão de genes (Hilhorst, 1995; Jürgens, 1998; Tvorogova e Lutova, 2018).

A embriogênese zigótica pode ser dividida em duas fases principais: (1) a fase de histodiferenciação, em que ocorrem divisões celulares para o estabelecimento e diferenciação do eixo embrionário; (2) e a fase de maturação em que ocorrem os processos celulares associados com a preparação do embrião e da semente para dessecação, quiescência metabólica e germinação (Sallandrouze et al., 2002; Harada et al., 2010).

A fase de histodiferenciação tem início com uma divisão assimétrica do zigoto. Essa divisão é acompanhada pela formação da parede celular, pela determinação dos três eixos embrionários (longitudinal, lateral e radial), e por alterações na morfologia do embrião, passando pelos estádios: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar em magnoliopsidas (Bewley et al., 2012; Floh et al., 2015). No estágio globular, ocorre uma série de divisões celulares formando um embrião esférico com simetria radial. Esse estágio é seguido por um estágio cordiforme, que sinaliza a mudança do crescimento isodiamétrico para a simetria bilateral, coincidindo com o início da formação das células que darão origem ao primórdio radicular. Em seguida ocorre o estágio torpedo, com o alongamento celular ao longo do eixo embrionário, ocorrendo a formação dos meristemas radicular e caulinar; e subsequente desenvolvimento dos cotilédones, dando

origem ao embrião cotiledonar (Zimmerman, 1993; Dodeman et al., 1997; Von Arnold et al., 2002).

Na fase de maturação, o embrião no estágio cotiledonar reduz os processos de divisão celular, dando início ao processo de acúmulo de substâncias de reserva (proteínas, lipídios e carboidratos), seguido pela diminuição da atividade metabólica e aquisição da tolerância à dessecação, antes da liberação da semente (Bewley, 1994; Dos Santos et al., 2006; Ikeda et al., 2006). Ocorrendo a embriogênese zigótica de forma correta, o resultado é a formação de uma semente viável, pronta para germinar desde que esteja em condições ambientais favoráveis (Bewley, 1994).

As sementes geralmente adquirem a capacidade de germinar no final da embriogênese (Kermode, 1990). No entanto, quando a semente intacta é removida da planta mãe durante o estágio inicial ou intermediário do desenvolvimento, a germinação não acontece. O desenvolvimento embriogênico termina durante a maturação, que é a fase final do desenvolvimento de sementes em angiospermas. Durante esta fase, as sementes dessecam e entram em um período de desenvolvimento interrompido até que condições ambientais adequadas sejam fornecidas (Hilhorst, 1995).

A maior parte do que se sabe a respeito dos aspectos moleculares do desenvolvimento embrionário se dá através do uso de sistemas modelos como *Arabidopsis thaliana* ou *Medicago truncatula* (Karami e Saidi, 2010; Elhiti et al., 2013; Radoeva e Weijers, 2014; Fehér, 2015). No entanto, o desenvolvimento embrionário de espécies arbóreas apresenta particularidades que podem não ser encontradas nos sistemas modelos (Ballester et al., 2016).

Apesar de haver diversos estudos a respeito da ocorrência, forma, metabolismo e função das PAs em algumas fases do desenvolvimento da planta, como nos processos de floração, frutificação, senescência e resposta a estresse (Galston e Kaur-Sawhney, 1995), as suas implicações no desenvolvimento de sementes precisam ser melhor estudadas. Entre os estudos realizados estão os trabalhos com espécies anuais, como *Oryza sativa* (Sen et al., 1981), *Gossypium hirsutum* (Davidonis, 1995), *Brassica rapa* (Puga-Hermida et al., 2003) e *Zea mays* (Cao et al., 2010) e em algumas arbóreas, como *Pinus radiata* (Minocha et al., 1999), *Araucaria angustifolia* (Astarita et al., 2003; de Oliveira et al., 2017), *Pinus taeda* (Silveira et al., 2004), *Ocotea catharinensis* (Santa-Catarina et al.,

2006), e *Theobroma cacao* (Niemenak et al., 2012). Porém em *P. echinata* ainda não há trabalhos relacionando as PAs com o desenvolvimento e germinação das sementes.

Muitos mecanismos e esquemas regulatórios que controlam o desenvolvimento do embrião zigótico estão envolvidos na subsequente diferenciação do tecido na planta adulta. Portanto, entender a regulação desse processo é de interesse biotecnológico, em particular, para a busca de novos estimuladores da embriogênese somática e outros meios de propagação *in vitro* (Tvorogova e Lutova, 2018). Ademais, estudos envolvendo aspectos moleculares em arbóreas são fundamentais para que o conhecimento básico relacionado ao desenvolvimento embrionário seja ampliado, assim como a sua potencial aplicação através de ferramentas biotecnológicas (Ballester et al., 2016). Estes estudos tem sido realizados para várias espécies, como *A. angustifolia* (Balbuena et al., 2011) e *Cariniana legalis* (Aragão et al., 2019).

#### 2.4. Embriogênese somática

A embriogênese somática pode ser definida como a formação de embriões a partir de uma ou mais células somáticas já diferenciadas, sem que haja fusão gamética (Shahzad et al., 2016). É um processo análogo à embriogênese zigótica, pelo qual as células somáticas se diferenciam em embriões somáticos através de estádios de desenvolvimento semelhantes aos de embriões zigóticos, ou seja, ocorre a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar em magnoliopsidas (Tautorius et al., 1991).

O processo de embriogênese somática pode ser obtido pela via direta ou via indireta (Guerra et al., 1999; Von Arnold et al., 2002). Na embriogênese somática direta, os embriões somáticos podem ser induzidos diretamente de células do explante, sem a formação de calo. Por outro lado, na embriogênese indireta ocorre inicialmente a indução de calos e a partir das células deste calo que possuem competência embriogênica ocorre o desenvolvimento de embriões somáticos, sendo observada na maioria das espécies (Cuenca et al., 1999; Ikeda-Iwai et al., 2002; Gaj, 2004; Montalbán et al., 2012; Corredoira et al., 2013; Corredoira et al., 2015).

A embriogênese somática para espécies arbóreas pode ser realizada em um sistema tecnológico de dois ciclos, sendo o primeiro denominado de ciclo de indução e proliferação e o segundo, ciclo de maturação (Santa-Catarina et al., 2012). Esses ciclos podem ainda ser divididos em quatro fases: (1) indução, que começa após a inoculação dos explantes em meio de cultura suplementado ou não com reguladores de crescimento (geralmente auxinas e citocininas); (2) a multiplicação, que é caracterizada por subculturas das culturas embriogênicas; (3) a maturação, em que é promovida a formação de embriões somáticos em meio de cultura contendo agentes promotores da maturação, como ABA e/ou agentes osmóticos [p.ex., polietileno glicol (PEG) e maltose]; (4) e conversão dos embriões somáticos e estabelecimento das plântulas somáticas, promovido pela transferência das culturas embriogênicas para um meio de cultura isento de reguladores de crescimento (Attree e Fowke, 1993; Stasolla et al., 2002; Von Arnold et al., 2002; Stasolla e Yeung, 2003; Fehér, 2015; Floh et al., 2015).

Em geral a aquisição da competência embriogênica depende da interação de fatores internos, como genótipo, idade de explante, condições fisiológicas e fatores externos como luz, temperatura, reguladores de crescimento e presença de compostos antioxidantes (Jiménez, 2005). Esta aquisição é considerada um fator crítico no processo de embriogênese somática e é altamente dependente da divisão e desdiferenciação celular seguido da diferenciação destas, devido a totipotencialidade das células vegetais (Fehér, 2015).

O tipo e a idade do explante a ser utilizado são fatores essenciais para o sucesso da resposta morfogenética, uma vez que os vários tecidos da mesma planta, e até mesmo os diferentes estádios de desenvolvimento do mesmo tecido, podem diferir em sua resposta quando cultivados *in vitro* (Tautorius et al., 1991). Vários tipos de explantes como folhas, raízes, meristemas de brotações, sementes, embriões zigóticos, etc., têm sido utilizados para a obtenção da embriogênese somática. No entanto, embriões zigóticos imaturos são os mais utilizados para a obtenção da embriogênese somática em plantas lenhosas (Correia et al., 2016; Isah, 2016), como é o caso de *Eucalyptus* (Prakash e Gurumurthi, 2010) e *A. angustifolia* (Steiner et al., 2008). Este tipo de explante, por ser um tecido jovem contendo células meristemáticas pouco diferenciadas, apresenta um maior potencial responsivo à sinalização celular, e com isso, apresenta maior capacidade para induzir embriões somáticos (Benson, 2000;

Isah, 2016). As espécies arbóreas, de uma forma geral, são caracterizadas por um ciclo de vida longo, com tecidos somáticos maduros contendo células diferenciadas que dificultam a resposta morfogênética comparativamente ao embrião zigótico imaturo (Steiner et al., 2008; Guan et al., 2016).

Além do tipo de explante, os reguladores de crescimento vegetal são importantes para a indução da resposta morfogênética e seu envolvimento na modulação da capacidade embriogênica ainda não está completamente compreendido, sendo espécie-específico (Jiménez, 2001). Dentre eles, as auxinas e citocininas são as mais utilizadas por estarem envolvidas na regulação do ciclo celular e promoverem divisões celulares (Fehér, 2015). A auxina mais utilizada na fase de indução é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) devido à sua eficácia no estabelecimento e proliferação das culturas embriogênicas, sendo geralmente metabolizado de forma mais lenta pelas células em relação às outras auxinas (Von Arnold et al., 2002; Avilés et al., 2013; Fehér, 2015). Para espécies arbóreas, a indução de culturas embriogênicas geralmente ocorre de forma indireta, com uso de auxinas, porém, a indução pode ser obtida de forma direta (de Rezende et al., 2008; Mahendran e Bai, 2012). A compreensão dos eventos iniciais de desenvolvimento durante a indução de culturas embriogênicas e a transição de células embriogênicas à embriões somáticos é de grande importância para regulação do processo de regeneração de plantas por meio da embriogênese somática (Sharma et al., 2008). Estes estudos permitem entender os mecanismos moleculares e bioquímicos associados com a aquisição da competência das células somáticas para desenvolver uma planta completa.

A embriogênese somática oferece algumas vantagens como a produção clonal em larga escala que pode ser automatizada pelo uso de biorreatores, estabilidade genética das plantas regeneradas e a possibilidade de ganho genético (Steinmacher et al., 2007). Além disso, desempenha um papel significativo na conservação de germoplasma e melhoramento genético de plantas lenhosas (Merkle e Dean, 2000; Chiancone e Germanà, 2012; Ozudogru e Lambardi, 2016).

A embriogênese somática tem sido descrita em diversas espécies, incluindo arbóreas nativas ameaçadas de extinção (Santa-Catarina et al., 2001; Isah, 2016). Embora a embriogênese somática seja uma alternativa para a propagação de plantas lenhosas, mais pesquisas relacionadas com os aspectos

bioquímicos e moleculares durante as diferentes etapas do processo são necessárias para aumentar a eficácia e a eficiência deste processo morfogênético nestas espécies (Thompson, 2014).

Alguns estudos visando a indução da embriogênese somática em *P. echinata* foram desenvolvidos, obtendo-se a formação de calos na presença de diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes, porém sem formação de embriões somáticos (Chu et al., 2008; Werner et al., 2009; Werner et al., 2010; Rangel, 2018).

## 2.5. Poliaminas (PAs)

As PAs são moléculas policatiônicas alifáticas, carregadas positivamente presentes tanto em plantas, como em animais e microrganismos, essa característica facilita sua interação com macromoléculas como DNA e RNA, fosfolipídios, componentes da parede celular e proteínas (Bouchereau et al., 1999; Baron e Stasolla, 2008; Alcázar et al., 2010; Michael, 2016). As principais PAs encontradas em células vegetais são a putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm). Essas aminas estão presentes em todos os compartimentos da célula vegetal e atuam em diversos processos fundamentais na célula, como a regulação da expressão gênica, a modulação de sinal, a proliferação celular e a estabilização de membranas (Kuznetsov et al., 2006; Alcazar et al., 2010).

Em plantas, especificamente, as PAs estão ligadas a processos de crescimento e desenvolvimento, como a divisão celular, resposta a estresse biótico e abiótico, morte celular programada, formação de raízes, iniciação e desenvolvimento floral, desenvolvimento dos frutos, e embriogênese zigótica e somática (Walden et al., 1997; Bais e Ravishankar, 2002; Silveira et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2007; Kusano et al., 2008; Akhtar, 2013). A concentração total e a razão entre as PAs variam dependendo da espécie, órgão, tecido vegetal e do estágio de desenvolvimento, e podem servir como um importante biomarcador da regeneração em plantas (Shoeb et al., 2001; Kuznetsov et al., 2006).

A síntese de PAs nos vegetais envolve a ação das enzimas arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC) que convertem, respectivamente, arginina e ornitina à Put. Em seguida, a conversão de Put em

Spd, e desta em Spm, ocorre por adições sucessivas de grupos aminopropil oriundos a partir da S-adenosil-metionina (SAM) pela reação da SAM descarboxilase (SAMDC), com ação das enzimas Spd sintase e Spm sintase, respectivamente. O catabolismo da diamina Put, e da tri- e tetramina Spd e Spm, é realizado pela ação das enzimas diamina oxidase (DAO) e PA oxidase (PAO), respectivamente (Bais e Ravishankar 2002; Kusano et al., 2008; Lasanajak et al. 2014).

Estudos demonstraram alterações nos níveis de PAs durante a embriogênese e germinação de sementes, indicando a importância dessas biomoléculas nestes processos morfogenéticos (Santa Catarina et al., 2004; Santa-Catarina et al., 2006; Silveira et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2007; Steiner et al., 2007; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011). Em *Arabidopsis*, foi demonstrado que Put e Spd são essenciais para embriogênese, enquanto a Spm não é crucial para seu crescimento normal (Kusano et al., 2008). Em contrapartida, na embriogênese zigótica de *O. catharinensis* foi sugerida uma relação entre o decréscimo nos níveis de Put, acompanhado pelo aumento nos níveis de Spm durante o desenvolvimento do embrião (Santa-Catarina et al., 2006), sugerindo a importância destas alterações para o desenvolvimento da embriogênese somática nesta espécie.

Adicionalmente, foi demonstrado em *O. catharinensis* que a adição de Put mantêm os embriões somáticos em estádios de desenvolvimento iniciais por estimular a divisão celular, enquanto a adição de Spd e Spm promove um aumento do número de embriões somáticos no estágio cotiledonar, mostrando a importância destas PAs para a evolução dos embriões somáticos e atuação na maturação (Santa-Catarina et al., 2007).

Neste sentido, o estudo do conteúdo endógeno e o melhor entendimento do efeito das PAs durante a embriogênese zigótica e somática podem contribuir para aumentar a eficiência na obtenção de embriões somáticos em várias espécies econômica e ecologicamente importantes.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Estudar os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos associados ao desenvolvimento da semente e germinação, e na indução da embriogênese somática em *P. echinata*.

#### 3.2. Objetivos específicos

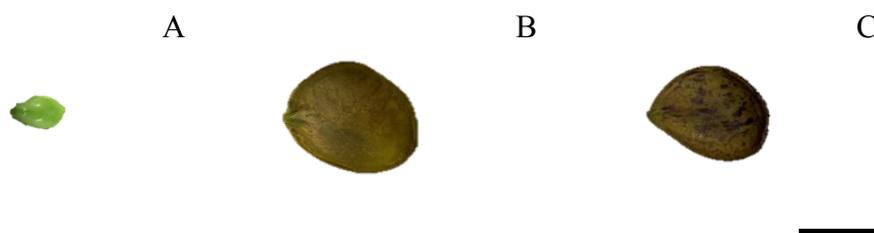
- Determinar a influência do tempo de desenvolvimento das sementes de *P. echinata* sobre o potencial germinativo e o índice de velocidade de germinação (IVG), matéria fresca e seca.
- Quantificar o conteúdo de PAs em sementes durante o desenvolvimento e durante a germinação.
- Avaliar o efeito da concentração de 2,4-D na indução da embriogênese somática em sementes imaturas de *P. echinata*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

Para os experimentos foram usados frutos imaturos e sementes dispersas de *P. echinata* coletados a partir de árvores localizadas na região de Campos dos Goytacazes – RJ.

Para os estudos relativos ao desenvolvimento da semente e germinação, as sementes foram coletadas em três períodos distintos após a floração plena: (1) sementes imaturas colhidas com quatro (Figura 1A) e (2) seis semanas após a floração (SAF) (Figura 1B) e (3) sementes maduras dispersas, colhidas com 8 SAF (Figura 1C).



**Figura 1:** Aspectos morfológicos das sementes de *P. echinata* imaturas com 4 (A) e 6 SAF (B) e sementes maduras dispersas com 8 SAF (C). Barra = 1 cm.

Para os estudos de embriogênese somática, as sementes imaturas (Figura 2) foram coletadas com 3 SAF.



**Figura 2:** Aspecto morfológico da semente imatura de *P. echinata* conectada à estrutura do fruto aberto, coletado com 3 SAF. Barra = 0,5 cm.

#### 4.2 Determinação do comprimento, matéria fresca (MF) e seca (MS) e conteúdo de PAs durante o desenvolvimento das sementes

Sementes de *P. echinata* coletadas com 4, 6 e 8 SAF foram utilizadas para avaliar o comprimento, MF e MS e conteúdo de PAs durante os diferentes tempos de coleta (SAF).

A determinação do comprimento, MF e MS foi realizada com o auxílio de uma régua a partir de cinco repetições, com cinco sementes por repetição. Para a análise do conteúdo de PAs, amostras em triplicatas biológicas (200 mg MF para cada amostra) das sementes nas três condições foram coletadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises.

#### 4.3. Efeito do desenvolvimento da semente na percentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), MF e MS e conteúdo de PAs

Foi analisado o efeito do desenvolvimento da semente na germinação, IVG, MF e MS, e alterações no conteúdo de PAs durante o processo germinativo. Para tanto, sementes coletadas com 4, 6 e 8 SAF foram submetidas a germinação durante oito dias, quando foram avaliados germinação (%), IVG, MF e MS.

Para a análise da germinação foram utilizadas quatro repetições, sendo cada repetição composta de 25 sementes.

Para a análise do conteúdo de PAs, amostras em triplicata (200 mg MF cada amostra) no tempo 0 (antes de iniciar o experimento) e após 6, 12, 24 e 96 h de germinação foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -20°C até a realização das análises.

#### 4.4. Germinação e determinação do IVG

Para a realização da germinação foi realizada a assepsia das sementes baseada na metodologia descrita por Santa-Catarina et al. (2001) com modificações. A assepsia consistiu na lavagem das sementes em água corrente com três gotas de detergente comercial, seguido de enxague por 10 vezes com água destilada. Em seguida, as sementes foram imersas em etanol 70% durante um minuto, seguido de imersão em água sanitária comercial 100% (Qboa<sup>®</sup>, Osasco - SP, Brasil) com 2-2,5% de cloro ativo por 10 minutos sob agitação. Posteriormente, as sementes foram submetidas a cinco lavagens com água destilada autoclavada.

Os testes de germinação foram realizados em rolos de papel de germinação conforme metodologia de Mello e Barbedo (2007), com quatro repetições de 25 sementes cada repetição. Após a assepsia, as sementes foram transferidas para papel Germitest<sup>®</sup> (J Prolab, Paraná, PR, Brazil) e umedecidos em água destilada autoclavada em uma relação de 2,5 vezes a massa do substrato seco. Os rolos de papel foram embalados em sacos de polietileno e colocados em câmaras de germinação do tipo BOD (Eletrolab, São Paulo, SP, Brasil), e mantidos a 25 °C sob luz contínua de intensidade luminosa de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Foram realizadas contagens diárias do número de sementes germinadas durante 8 dias para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG). O IVG foi calculado de acordo com Maguire (1962). Os resultados foram expressos em porcentagem, considerando as mudas normais obtidas.

#### 4.5. Determinação da MF e MS

A MF foi calculada através da MF das sementes no tempo 0 e das plântulas obtidas após 8 dias de germinação. Em seguida, as amostras foram

colocadas em sacos de papel e secas a 70 °C por 72 h em estufa com circulação forçada de ar, para determinação da MS.

#### 4.6. Determinação do conteúdo de PAs livres

As PAs livres foram determinadas de acordo com Santa-Catarina et al., (2006). As amostras (em triplicata, com 200 mg MF cada amostra) foram maceradas em 1,2 mL de ácido perclórico a 5% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após 1 h de incubação a 4 °C, as amostras foram centrifugadas durante 20 min a 20.000 x g, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, e as PAs livres analisadas do sobrenadante por dansilação com cloreto de dansil (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Em seguida, as PAs foram identificadas e quantificadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC; Shimadzu, Kyoto, Japão) usando uma coluna de fase reversa C18 de 5 µm (Shimadzu Shin-pack CLC ODS). O gradiente da coluna HPLC foi criado adicionando volumes crescentes de acetonitrila absoluta (Merck, Darmstadt, Alemanha) a uma solução aquosa a 10% de acetonitrila (pH 3,5) ajustada com ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha). O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65% nos primeiros 10 min, aumentando de 65 para 100% entre 10 e 13 min e mantido a 100% entre 13 e 21 min a um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, a 40 °C. Foi utilizado um detector de fluorescência a 340 nm (excitação) e 510 nm (emissão) para detecção dos picos de PAs. As áreas dos picos e os tempos de retenção das PAs foram medidas por comparação com as PAs padrão Put, Spd e Spm (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Foi usado como padrão interno o 1,7-diaminoheptano (DAH).

#### 4.7. Indução da embriogênese somática

A indução de culturas embriogênicas foi realizada utilizando frutos imaturos de *P. echinata* com 3 SAF. Os frutos foram submetidos a assepsia de acordo com Costa (2018). Primeiramente foi feita uma lavagem com água contendo três gotas de detergente comercial neutro. Em seguida, os frutos foram enxaguados por 10 vezes com água destilada, seguida de imersão por um minuto em álcool 70% e 60 minutos em água sanitária comercial 100% contendo 1,8% a

2,5% de cloro ativo com 2,5 g L<sup>-1</sup> de fungicida Cercobin<sup>®</sup> (Sorocaba, São Paulo, SP, Brasil). Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os frutos foram submetidos a cinco lavagens com água destilada autoclavada.

Após a assepsia, as sementes imaturas foram isoladas dos frutos em câmara de fluxo laminar, e inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) (Vetec<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Phytigel<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e duas concentrações de 2,4-D (0 e 10 µM). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, e em seguida foi adicionado o Phytigel<sup>®</sup>. Após a autoclavagem por 15 min a 121 °C, 1,5 atm o meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio (10 mL) em câmara de fluxo laminar.

Após a inoculação, as sementes foram incubadas em câmaras do tipo BOD (Eletrolab, São Paulo, SP, Brasil), e mantidas a 25 °C na ausência de luz. Após 120 dias de inoculação foi avaliada a taxa de indução de calos (via indireta) e a indução de embriões somáticos (via direta), e foram coletadas amostras para análises histomorfológicas.

#### 4.8. Análises histomorfológicas

Amostras obtidas durante a indução da embriogênese somática obtida de forma direta foram coletadas e fixadas em solução aquosa contendo glutaraldeído (Sigma-Aldrich; 2,5%) e formaldeído (Sigma-Aldrich; 4,0%) em tampão fosfato 0,1 M (Sigma-Aldrich; pH 7,2), sob temperatura ambiente, durante 24 h. Em seguida, as amostras foram submetidas à desidratação em séries etanólicas crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), infiltradas em metacrilato (historesina; Leica, Wetzlar, Alemanha) e etanol 100% (1:1; v/v) por 12 h, seguido de resina 100% por 24 h. Em seguida, as amostras foram emblocadas em historesina. Secções (5 a 7 µm) foram obtidas em micrótomo (Leica, Wetzlar, Alemanha), montadas em lâminas (Sail Brand, Zhejiang, China), coradas com solução de azul de toluidina (Synth; 1%), e observadas em microscópio óptico (Carl Zeiss<sup>®</sup>, Jena, Alemanha). As secções foram observadas em microscópio Axiomager M2 (Carl Zeiss<sup>®</sup>, Jena, Alemanha) com o programa AxioVision 4.8 (Carl Zeiss<sup>®</sup>, Jena, Alemanha) e fotografados com câmera AxioCam MR3 (Carl Zeiss<sup>®</sup>, Jena, Alemanha) acoplada ao equipamento.

#### 4.9 Análise estatística dos dados

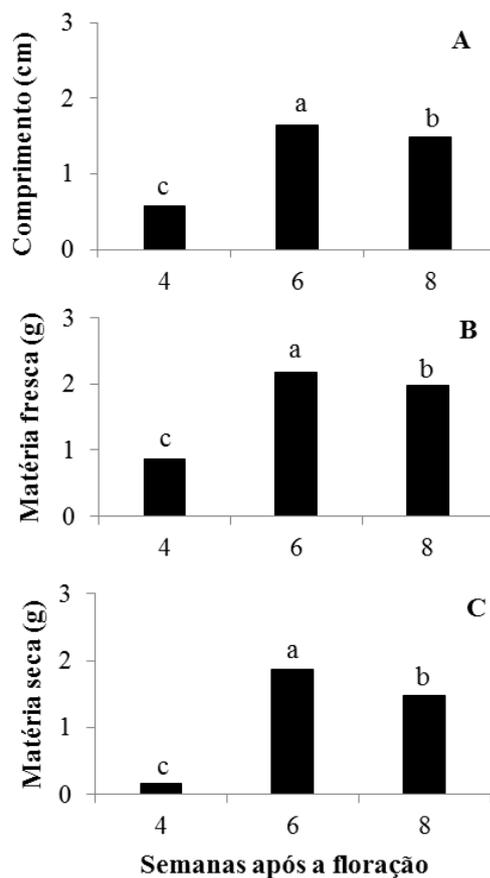
Para a análise dos dados, primeiramente foram verificadas as pressuposições de normalidade e homogeneidade de variâncias dos tratamentos pelos testes de Shapiro Wilk e Bartlet, respectivamente. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e à separação de médias pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) a 5% de probabilidade. Os parâmetros foram analisados com o auxílio do programa R<sup>®</sup> versão 3.4.4 (R Development Core Team, 2018) e o pacote *easynova* (Arnhold, 2003).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Comprimento, MF e MS, e conteúdo de PAs durante o desenvolvimento das sementes de *P. echinata*

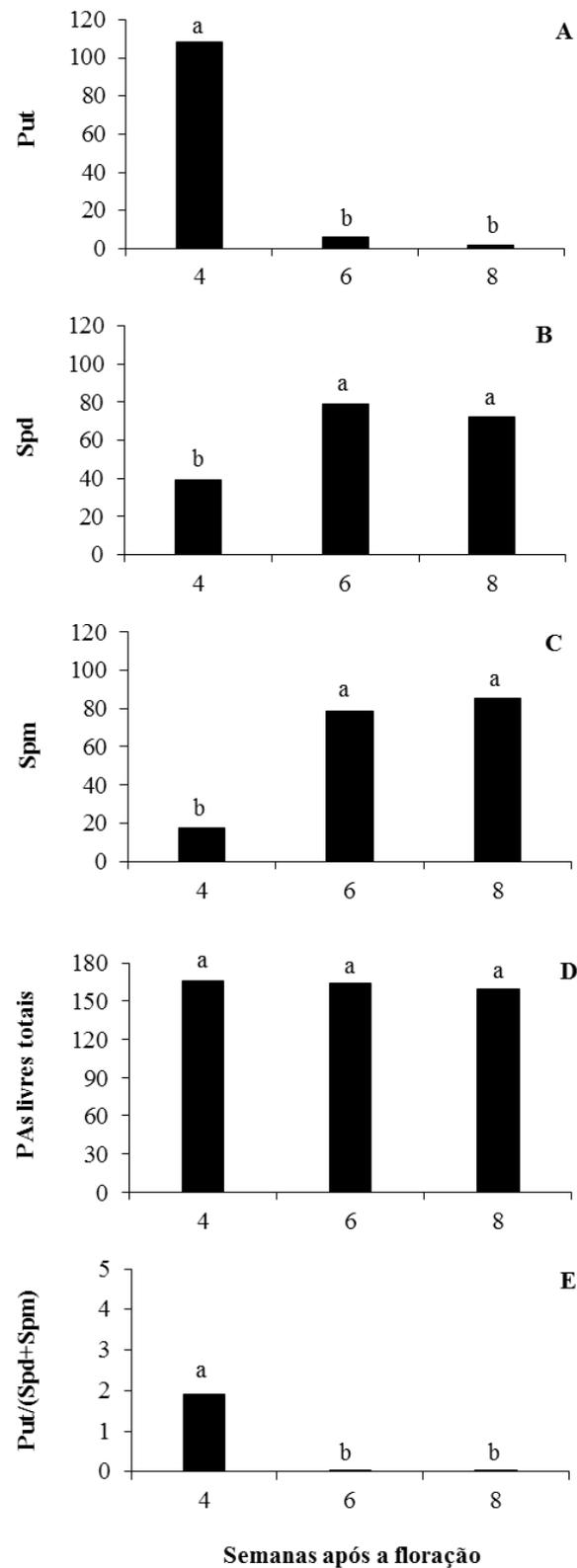
As sementes coletadas com 4 SAF foram as que apresentaram menor comprimento comparativamente às de 6 e 8 SAF. As sementes imaturas coletadas com 6 SAF tiveram maior comprimento, seguido das sementes coletadas com 8 SAF (Figura 3A).

As sementes imaturas com 4 SAF apresentaram menor MF e MS, comparativamente as sementes imaturas com 6 SAF e as sementes com 8 SAF, maduras dispersas (Figuras 3B e 3C). Já as sementes imaturas coletadas com 6 SAF apresentaram os maiores valores de MF e MS (Figuras 3B e 3C).



**Figura 3:** Comprimento (A), matéria fresca (B) e matéria seca (C) das sementes imaturas com 4 e 6 SAF e sementes maduras dispersas com 8 SAF de *P. echinata*. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas entre si de acordo com o teste SNK ( $P < 0,05$ ). CV = coeficiente de variação ( $n = 5$ ; CV comprimento = 3,54%; CV matéria fresca = 4,75%; CV matéria seca = 22,62%).

O conteúdo de Put foi maior na semente imatura com 4 SAF, e significativamente menor nas sementes imaturas com 6 SAF e madura dispersas com 8 SAF (Figura 4A). Por outro lado, o conteúdo de Spd e Spm livres foi significativamente maior nas sementes com maior tempo de desenvolvimento, ou seja, imaturas com 6 SAF e maduras com 8 SAF, comparativamente com a semente mais imatura, com 4 SAF (Figura 4A). No entanto, o conteúdo de PAs livres totais não apresentou diferença significativa entre os diferentes estádios de desenvolvimento das sementes analisados (Figura 4B). A razão Put/(Spd+Spm) foi maior em sementes imaturas com 4 SAF, e significativamente menor nas sementes mais desenvolvidas, ou seja a imatura com 6 SAF e madura com 8 SAF (Figura 4C).

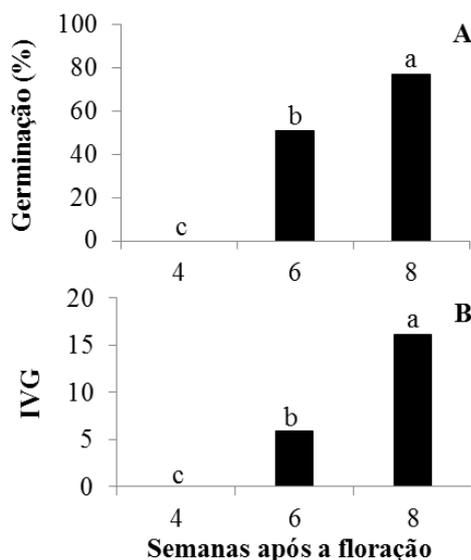


**Figura 4:** Conteúdo ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) de Put (A), Spd (Spd) e Spm (C), PAs livres totais (D) e razão Put/(Spd+Spm) das PAs (E) em sementes imaturas com 4 e 6 SAF e sementes maduras dispersas com 8 SAF de *P. echinata*. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas entre si de acordo com o teste SNK ( $P < 0,05$ ). CV = coeficiente de variação. MF = matéria fresca; CV = coeficiente de variação ( $n = 3$ ; CV Put = 13,76%, CV Spd = 12,29%, CV Spm = 12,64%, CV PAs livres totais = 7,92%, CV razão = 28,2%).

## 5.2. Efeito do desenvolvimento da semente na percentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), MF e MS e conteúdo de PAs

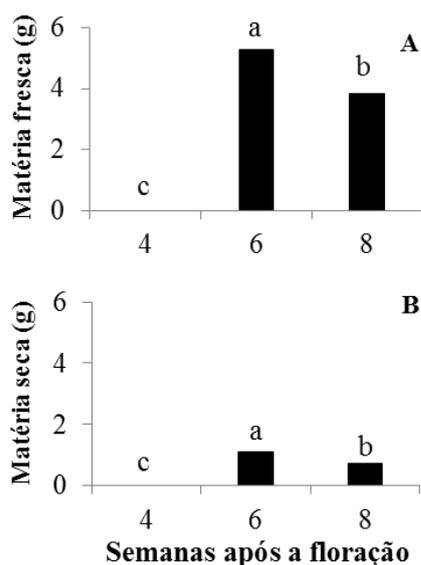
A germinação das sementes maduras colhidas após a dispersão com 8 SAF foi significativamente maior (77%) em comparação às sementes com 6 SAF. Não houve germinação nas sementes imaturas com 4 SAF e apenas 51% das sementes imaturas com 6 SAF germinaram (Figura 5A).

Similarmente, o IVG foi significativamente maior nas sementes maduras com 8 SAF comparativamente às sementes imaturas com 4 e 6 SAF (Figura 5B).



**Figura 5:** Percentagem de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) de sementes imaturas com 4 e 6 SAF e sementes maduras dispersas com 8 SAF de *P. echinata*. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas entre si de acordo com o teste SNK ( $P < 0,05$ ). CV = coeficiente de variação ( $n = 4$ ; CV germinação = 16,97%; CV IVG = 15,15%).

As sementes imaturas não germinaram, portanto aos 8 dias a MF e MS foi zero. As plântulas germinadas a partir de sementes imaturas com 6 SAF apresentaram maior MF e MS em relação as maduras dispersas com 8 SAF. Isso mostra que a redução da MF e MS sofrida pela semente no período de desidratação tem influência também na MF e MS da plântula germinada (Figura 6).



**Figura 6:** Matéria fresca (A) e matéria seca (g; B) das plântulas de *P. echinata* após 8 dias de incubação das sementes imaturas com 4 e 6 SAF e sementes maduras dispersas com 8 SAF. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas entre si de acordo com o teste SNK ( $P < 0,05$ ). CV = coeficiente de variação ( $n = 5$ ; CV matéria fresca = 7,47%, CV matéria seca = 7,64%).

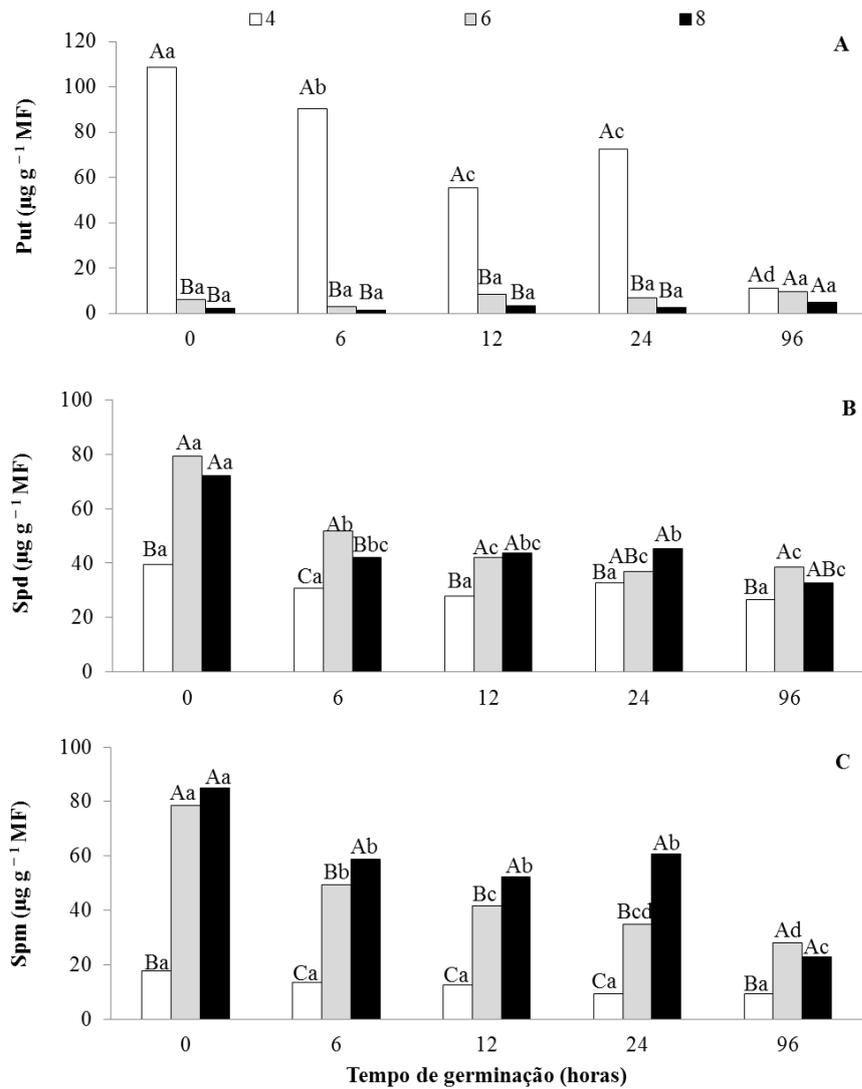
O conteúdo de PAs foi analisado durante o processo germinativo das sementes de *P. echinata*, considerando horas após a incubação para a germinação. O conteúdo de Put foi significativamente superior nas sementes imaturas com 4 SAF no tempo 0 (antes de iniciar a indução da germinação), seguido de redução significativa até as 24 h de germinação, atingindo conteúdos similares com as demais sementes após 96 h de germinação (Figura 7A). Por outro lado, o conteúdo de Put não variou significativamente entre as sementes imaturas com 6 SAF e maduras com 8 SAF durante as 96 h de germinação, sendo muito baixo (Figura 7A).

O conteúdo de Spd livre foi significativamente maior em sementes imaturas com 6 SAF e maduras com 8 SAF no tempo 0, os quais reduziram significativamente até 96 h de germinação (Figura 7B). Por outro lado, sementes imaturas com 4 SAF apresentaram conteúdos similares de Spd livre durante as 96 h de germinação, não diferindo significativamente entre si comparando o tempo de germinação para esta semente (Figura 7B). Resultados semelhantes foram observados em relação ao conteúdo de Spm livre, que foi significativamente menor nas sementes imaturas com 4 SAF e não houve alteração significativa com o decorrer do tempo de germinação. Por outro lado, nas sementes imaturas com 6 SAF e maduras dispersas foi observada uma redução significativa no conteúdo de Spm livre a partir de 6 h de germinação (Figura 7C).

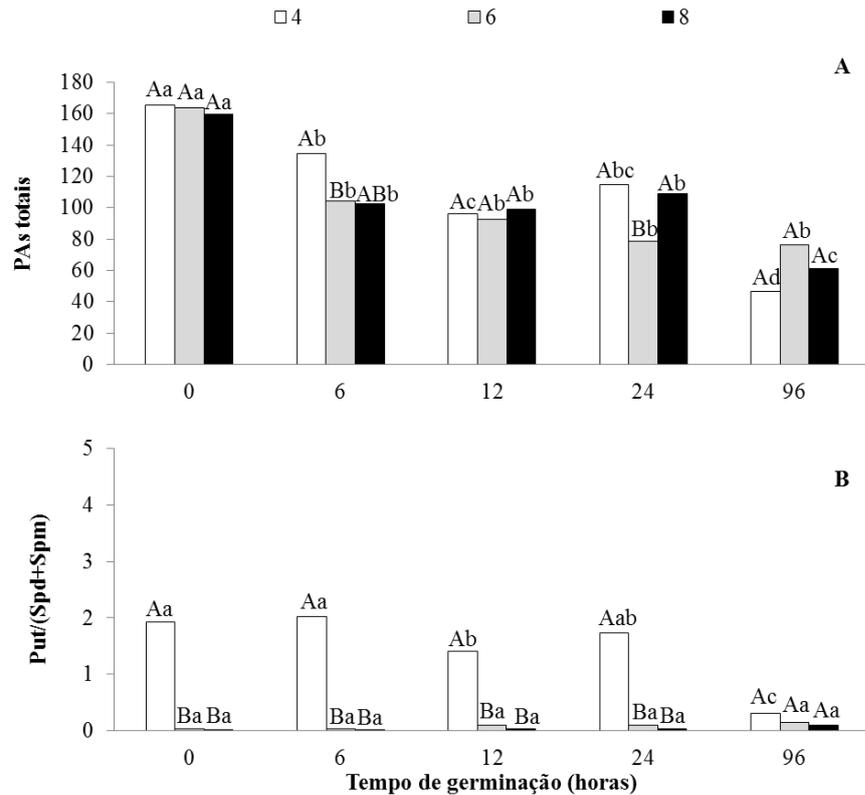
O fato de não ter ocorrido germinação nas sementes imaturas com 4 SAF pode ser um indicativo de que Spd e Spm foram importantes no processo germinativo nas sementes com 6 SAF, que possui maior maturidade fisiológica que as coletadas com 4 SAF, e nas sementes maduras com 8 SAF.

Reduções significativas nos níveis de PAs livres totais foram verificadas nas sementes nas três condições de coleta (SAF) nas primeiras 6 h de germinação até às 96 h (Figura 8A).

A razão  $\text{Put}/(\text{Spd}+\text{Spm})$  foi maior em sementes imaturas com 4 SAF, uma vez que estas apresentaram conteúdo de Put superior as sementes coletadas com 6 e 8 SAF. Assim como observado para o conteúdo de Put, houve uma redução dessa razão após 24 horas de germinação (Figura 8B). Por outro lado, não foi observada diferença estatística significativa na razão  $\text{Put}/(\text{Spd}+\text{Spm})$  entre as sementes coletadas após 6 e 8 SAF (Figura 8B).



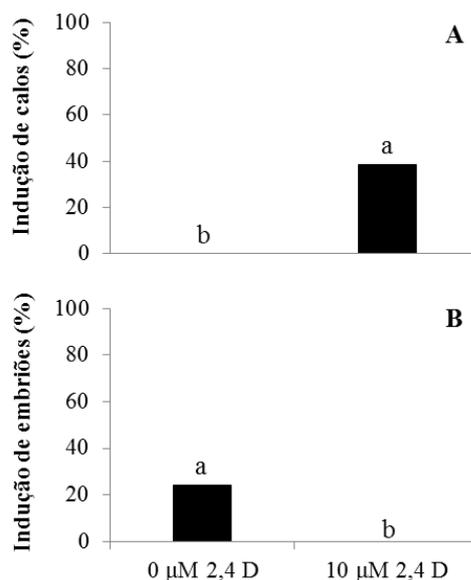
**Figura 7:** Conteúdo ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) de Put (A), Spd (B) e Spm (C) em sementes imaturas com 4 e 6 SAF e sementes maduras dispersas com 8 SAF de *P. echinata* antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 96 h de germinação. Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas significativas entre as diferentes sementes coletadas em diferentes SAFs no mesmo tempo de germinação (horas). Letras minúsculas representam diferenças estatísticas significativas considerando a semente coletada em cada SAF entre os diferentes tempos de inoculação. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas entre si de acordo com o teste SNK ( $P < 0,05$ ). MF = matéria fresca; CV = coeficiente de variação ( $n = 3$ ; CV Put = 40,71%, CV Spd = 13,18%, CV Spm = 14,14%)



**Figura 8:** Conteúdo ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) de PAs livres totais (A) e razão Put/(Spd+Spm) das PAs (B) em sementes imaturas com 4 e 6 SAF e sementes maduras dispersas com 8 SAF de *P. echinata* antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 96 h de germinação. Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas significativas entre as diferentes sementes coletadas em diferentes SAFs no mesmo tempo de germinação (horas). Letras minúsculas representam diferenças estatísticas significativas considerando a semente coletada em cada SAF entre os diferentes tempos de inoculação. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas entre si de acordo com o teste SNK ( $P < 0,05$ ). MF = matéria fresca; CV = coeficiente de variação ( $n = 3$ ; CV PAs livres totais = 15,44%, CV razão = 30,17%)

### 5.3. Indução da embriogênese somática

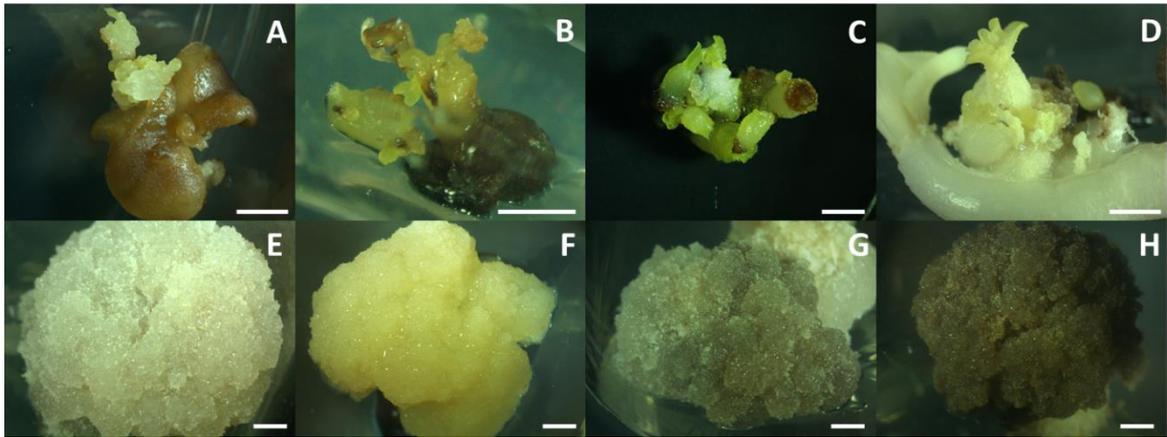
A presença de 2,4 D no meio de cultura possibilitou a indução de calos nas sementes imaturas de *P. echinata*, não sendo identificado o desenvolvimento de calos a partir de sementes inoculadas em meio de cultura sem 2,4 D (Figura 9A). Além disso, nas sementes sem a presença de 2,4 D foi observada a indução da embriogênese somática direta, sem formação de calos (Figura 9B).



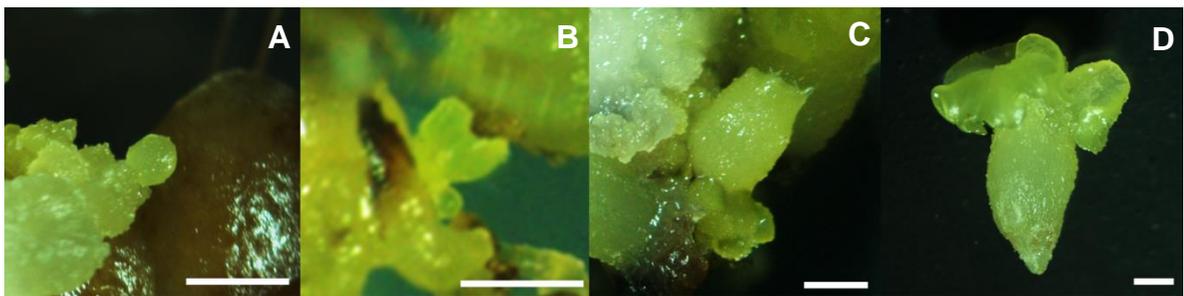
**Figura 9:** Porcentagem de indução de calos (A) e embriogênese somática direta (B) a partir de sementes imaturas de *P. echinata* após 120 dias de inoculação em meio de cultura MS com 0 e 10 µM de 2,4 D. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas entre si de acordo com o teste SNK ( $P < 0,05$ ). CV = coeficiente de variação ( $n = 5$ ; CV indução de calos = 13,91%; CV indução de embriogênese somática direta = 16,42%)

O uso de meio de cultura sem a adição de 2,4-D possibilitou a indução da embriogênese somática sem a formação de calo evidente (Figuras 10A a 10D), e sugere que a indução tenha ocorrido de forma direta, permitindo a observação de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (Figuras 10A a 10D) formados diretamente sobre o explante utilizado. Por outro lado, a adição de 2,4-D promoveu a formação de calos, os quais apresentam diferente friabilidade e coloração, como branca (Figura 10E), bege (Figura 10F), marrom (Figura 10G) e marrom-escuro (Figura 10H).

Os embriões formados desenvolveram-se em embriões somáticos globulares, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figuras 11A a 11D).

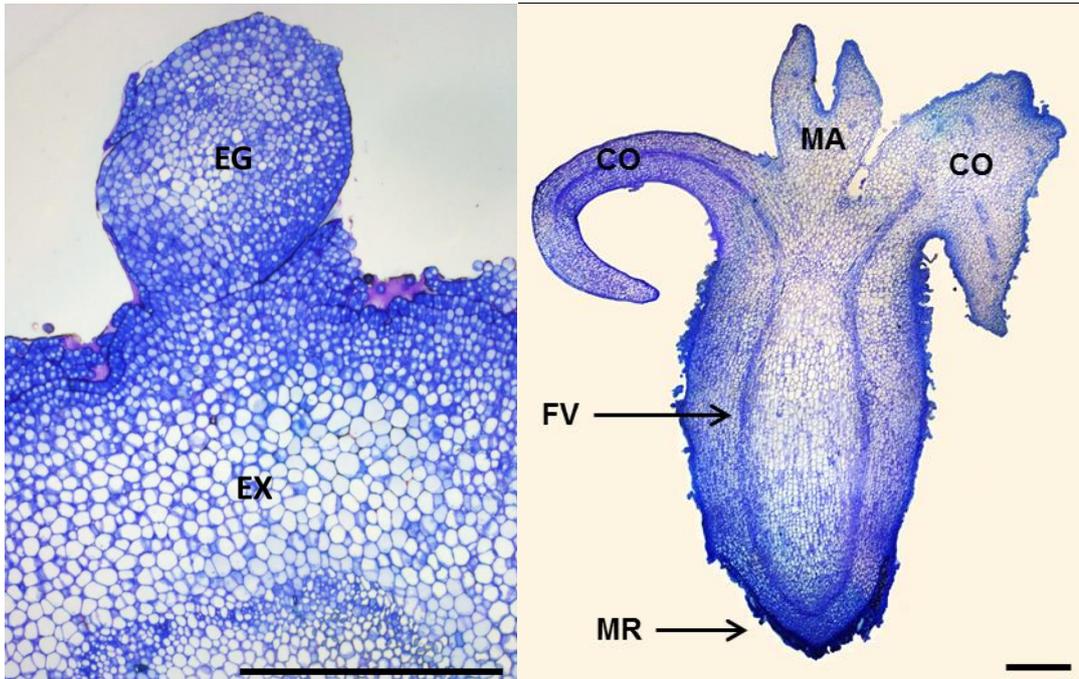


**Figura 10:** Aspectos morfológicos da indução de embriogênese somática direta (A a D) e de calos (E a H) obtidos a partir de sementes imaturas. Escala = 1 mm



**Figura 11:** Aspectos morfológicos de embriões somáticos no estágio globular (A), cordiforme (B), torpedo (C) e cotiledonar (D) obtidos pela embriogênese somática direta. Escala = 0,5 mm

A análise histológica dos embriões nos estádios globular e cotiledonar revelou a formação dos embriões a partir das células da epiderme do explante, e sem ligação vascular com o explante. Os embriões somáticos no estágio globular apresentaram-se bem definidos e com uma estreita conexão basal com o explante. A análise histológica revelou que embriões somáticos no estágio cotiledonar apresentam meristemas apical e radicular, cotilédones, e feixes vasculares (Figura 12).



**Figura 12:** Aspectos histológicos de embriões somáticos no estágio globular (A) e cotiledonar (B) obtidos via embriogênese somática direta em *P. echinata*. EG – Embrião globular, EX – Explante, CO – Cotilédone, FV – Feixes vasculares, MA – Meristema apical, MR – Meristema radicular. Barra: 500 µm.

## 6. DISCUSSÃO

Os maiores valores de comprimento, MF e MS foram observados nas sementes de *P. echinata* coletadas com 6 SAF, as quais possuem maior maturidade comparativamente as sementes com 4 SAF. De acordo com o padrão de crescimento descrito por Carvalho e Nakagawa (2000) e Marcos Filho (2005), de maneira geral, as sementes aumentam de tamanho rapidamente, atingindo o máximo em um período de tempo curto, resultado da multiplicação e desenvolvimento das células constituintes do eixo embrionário e dos tecidos de reserva. O tamanho máximo atingido pelas sementes é mantido por certo tempo, e no final do desenvolvimento pode haver uma redução do tamanho, devido ao processo de desidratação. Essa redução no tamanho pode ser observada em *P. echinata*, cujo comprimento foi menor em sementes maduras e dispersas (com 8 SAF) comparativamente com sementes imaturas com 6 SAF. De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000) e Marcos Filho (2005) resposta similar ao do tamanho pode ocorrer em relação a MF e MS, cujos valores máximos são mantidos por um tempo, podendo no final desse período sofrer um decréscimo, devido às perdas por meio do processo de desidratação e respiração das sementes. Em *P. echinata* foi possível verificar este decréscimo na MF e MS em sementes maduras dispersas (8 SAF) comparativamente às sementes imaturas com 6 SAF. Resultados semelhantes relativos ao tamanho da semente e da MS foram obtidos também em sementes de *Mimosa caesalpinifolia* (Alves et al., 2005) e *Luehea grandiflora* (Marini et al., 2012). No entanto, essa redução do

tamanho das sementes depende da espécie e do grau de desidratação encontrado no final do desenvolvimento das sementes (Marcos Filho, 2005). Em *Luehea divaricata*, por exemplo, foram mostradas diferenças significativas no tamanho entre as sementes coletadas em diferentes estádios de maturação (Schulz et al., 2017).

Em plantas as PAs regulam diversos processos de desenvolvimento, incluindo a divisão, crescimento e diferenciação celular, estando relacionadas ao desenvolvimento embrionário zigótico (Minocha et al., 1999). O presente estudo identificou que a Put foi a PA livre predominante nas sementes imaturas com 4 SAF, enquanto nas sementes mais desenvolvidas, com 6 e 8 SAF houve um aumento no conteúdo de Spd e Spm e uma diminuição no conteúdo de Put, sugerindo que a Put tenha sido convertida em Spd e Spm durante o período de desenvolvimento e maturação das sementes de *P. echinata*. A Put é um produto central das vias de biossíntese de PAs na planta, sendo a precursora para a produção de Spd e Spm (Bouchereau et al., 1999). Os resultados obtidos também sugerem um papel relevante da Put no início do desenvolvimento das sementes, quando ocorre alta taxa de divisão celular. A Put é uma PA importante para a transição das fases G1/S e G2/M do ciclo celular (Maki et al., 1991). Por outro lado, conteúdos maiores de Spd e Spm foram observados no final do desenvolvimento das sementes, quando o crescimento se dá em grande parte devido ao alongamento celular e acúmulo de reservas decorrentes da maturação da semente sugerindo um papel relevante destas PAs nas etapas da maturação e dessecação. Resultados semelhantes para o conteúdo de Spd e Spm observados para *P. echinata* foram relatados para outras espécies, como *A. angustifolia* (Astarita et al., 2003), *Z. mays* (Cao et al., 2010), *O. catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2006) e *O. sativa* (Van den Broeck et al., 1994).

Os maiores valores da razão Put/(Spd + Spm) foram encontrados nas sementes imaturas com 4 SAF devido ao alto teor de Put em relação a Spd e Spm. Este resultado está de acordo com relatos observados em outras espécies arbóreas, como em *A. angustifolia* (de Oliveira et al., 2017), *P. radiata* (Minocha et al., 1999), *P. taeda* (Silveira et al., 2004) e *P. sylvestris* (Vuosku et al., 2006). Essa razão das PAs pode ser considerada um marcador bioquímico do estágio de desenvolvimento (Astarita et al., 2003; Silveira et al., 2004). Os altos conteúdos de Spd e Spm nas sementes mais desenvolvidas também foram

refletidos em uma redução na razão Put/(Spd + Spm), com relevância nas etapas finais do desenvolvimento de sementes (Astarita et al., 2003; Santa-Catarina et al., 2006), possivelmente associadas com a tolerância a desidratação e na manutenção das sementes viáveis para a germinação.

No presente estudo não houve germinação nas sementes imaturas com 4 SAF, uma vez que as sementes ainda estavam pouco desenvolvidas, sendo necessário a ocorrência da maturação das sementes e com isso, possam germinar. Resultado similar foi relatado por Araujo e Barbedo (2017) trabalhando com a mesma espécie. Além disso, houve um aumento progressivo na porcentagem de germinação e IVG com o avanço da maturação da semente em *P. echinata*, ou seja, nas sementes imaturas com 6 SAF, e os maiores valores ocorreram nas sementes maduras dispersas (com 8 SAF). Resultados semelhantes foram encontrados em *Nicotiana tabacum* (Andrade et al., 2018) e *Solanum melongena* (Passam et al., 2010).

Durante o processo germinativo tem sido avaliado o perfil de PAs em algumas espécies, incluindo arbóreas como *C. fissilis* (Aragão et al., 2015), *A. angustifolia* e *O. odorifera* (Pieruzzi et al., 2011), *Plathymenia foliosa* e *Dalbergia nigra* (Rios et al., 2015). No presente estudo foi observado que o conteúdo de PAs totais é maior no início da germinação, reduzindo ao longo do processo germinativo. Resultados similares foram observados em *Brassica rapa*, sendo mostrado que o conteúdo de PAs livres totais é maior no início da germinação, durante o período de embebição, e há uma redução desse conteúdo após a protusão da radícula (Puga-Hermida et al., 2006). Verificou-se conteúdo significativamente maior de Put nas sementes imaturas com 4 SAF quando comparado às outras sementes, sugerindo que esta PA, embora esteja relacionada ao desenvolvimento inicial das sementes de *P. echinata*, não está diretamente relacionada ao processo germinativo, uma vez que as sementes nesse período de coleta (4 SAF) não germinaram. Por outro lado, as PAs Spd e Spm, observadas em maior conteúdo na fase final do desenvolvimento das sementes, podem ser determinantes para o processo germinativo, uma vez que as sementes imaturas com 6 SAF e maduras com 8 SAF apresentaram germinação. Resultados similares também foram observados durante a germinação de outras espécies, como *C. fissilis* (Aragão et al., 2015).

O meio de cultura exerce forte efeito na embriogênese somática, e o uso de reguladores de crescimento, especialmente as auxinas, são fatores-chave para a aquisição de competência embriogênica devido ao seu papel na regulação do ciclo celular e na divisão celular (Francis e Sorrell, 2001; Fehér et al., 2003; Gaj, 2004). Dentre as auxinas, o 2,4-D é a mais amplamente utilizada devido à sua eficácia na promoção do estabelecimento e da proliferação de culturas embriogênicas, sendo geralmente metabolizado mais lentamente pelas células quando comparado a outras auxinas (von Arnold et al., 2002; Fehér, 2015). Em algumas espécies de plantas, 2,4-D foi considerado a auxina mais eficaz para a embriogênese somática como em *Brassica campestris* (Choi et al., 1998) e *Arabidopsis thaliana* (Gaj, 2001; Pillon et al., 1996).

No presente estudo verificou-se que a adição de 2,4-D promoveu a indução de calos com diferentes texturas e colorações. Estes resultados são similares aos observados anteriormente por Rangel (2018). Estudos iniciais realizados por Rangel (2018) mostraram que a adição de 2,4-D é fundamental para a indução de calos em *P. echinata*. Dentre os calos obtidos, os de coloração marrom apresentavam células com características meristemáticas, ou seja, citoplasma denso, regiões predominantemente heterocromáticas e núcleo evidente (Rangel, 2018), sendo a presença destas células importante para que ocorra a evolução morfológica durante o processo da embriogênese somática. Este tipo de calo quando submetido ao tratamento com ABA (25  $\mu$ M), possibilitou a obtenção de embriões somáticos em estádios iniciais de desenvolvimento aos 180 dias de indução de maturação em *P. echinata* (Rangel, 2018).

Em algumas espécies lenhosas, a embriogênese direta tem sido relatada usando tecidos juvenis e imaturos como explantes. Esse tipo de embriogênese ocorre a partir de células determinadas pré-embriogênicas (PEDCs), nas quais o explante está próximo ao estado embrionário e pode ser facilmente induzido a seguir a via embriogênica (Williams e Maheshwaran, 1986). No presente estudo verificou-se que sementes imaturas coletadas com 3 SAF possibilitou a obtenção de embriões somáticos de forma direta, em vários estádios de desenvolvimento, do globular ao cotiledonar, sem o uso de 2,4-D. A embriogênese somática em meio livre de reguladores de crescimento vegetal não é muito comum, considerando que os reguladores são utilizados para indução da embriogênese somática na maior parte dos protocolos publicados (Gaj, 2004). No entanto, em

algumas espécies arbóreas, como *Araucaria angustifolia*, também foi possível induzir e estabelecer as culturas embriogênicas em meio de cultura livre de reguladores de crescimento (Santos et al., 2002).

Estes resultados são inéditos para esta espécie. No entanto, a percentagem de indução da embriogênese somática em meio de cultura sem 2,4-D é baixa, sendo necessário aprimorar esta etapa do processo.

## 7. CONCLUSÕES

- Os maiores valores de comprimento, MF e MS foram observados nas sementes de *P. echinata* coletadas com 6 SAF, as quais possuem maior maturidade comparativamente às de 4 SAF. No final do desenvolvimento das sementes (8 SAF) ocorre uma redução do tamanho, devido ao período de desidratação.
- A Put foi a PA livre predominante nas sementes imaturas com 4 SAF, enquanto nas sementes mais desenvolvidas, com 6 e 8 SAF, houve um aumento no conteúdo de Spd e Spm e uma diminuição no conteúdo de Put. Além disso, foi observado que o conteúdo de PAs totais é maior no início da germinação, principalmente devido ao maior conteúdo de Put nas sementes imaturas com 4 SAF quando comparados as outras sementes. As PAs Spd e Spm podem estar relacionadas com o processo germinativo, uma vez que estão presentes em maior quantidade nas sementes imaturas com 6 SAF e maduras com 8 SAF, quando há germinação.
- A indução da embriogênese somática direta foi possível em meio de cultura sem a presença de 2,4-D, sendo necessário aumentar a taxa de indução. A adição de 2,4-D promoveu a formação de calos com diferente friabilidade e coloração, entretanto, sem formar embriões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, F. F. A., Pinto, M. M., Tavares, A. R., Kanashiro, S. (2007) Maturation of fruits of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brasil wood). *Revista Árvore*, 31(1): 1-6.
- Akhtar, N. (2013) Endogenous polyamines: a temporal cellular modulator of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda. *Research in Plant Sciences*, 1(2): 4-14.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., Tiburcio, A. F. (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6): 1237-1249.
- Alves, E. S., Angyalossy, V., Longui, E. L., Lombardi, D. R., Amano, E., Vargas, A. (2008a) O arco: arte e ciência. in: *Pau-Brasil, da semente à madeira: conhecer para conservar*. Instituto de Botânica/ SMA, São Paulo, 170-183.
- Alves, E. S., Longui, E. L., Amano, E. (2008b) Pernambuco wood (*Caesalpinia echinata*) used in the manufacture of bows for string instruments. *Iawa Journal*, 29(3): 323-335.
- Alves, E. U., Sader, R., Bruno, R. D. L. A., Alves, A. U. (2005) Maturação fisiológica de sementes de sabiá. *Revista Brasileira de Sementes*, 27(1): 1-8.
- Andrade, D. B., Silva, H. P., Carvalho, M. L. M., Oliveira, A. S., Santos, H. O., Silva Neta, I. C. (2018) Morphological, physiological, and biochemical indicators of quality in tobacco fruits and seeds. *Genetics and Molecular Research*, 17(4): 1-16.
- Aragão, V. P. M., Navarro, B. V., Passamani, L. Z., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., Silveira, V., Santa-Catarina, C. (2015) Free amino acids, polyamines, soluble sugars and proteins during seed germination and early seedling growth of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), an endangered hardwood species from the Atlantic Forest in Brazil. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27(2): 157-169.

- Aragão, V. P. M., Trindade, B. M. C., Reis, R. S., Silveira, V., Santa-Catarina, C. (2019) Storage time affects the germination and proteomic profile of seeds of *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze (Lecythidaceae), an endangered tree species native to the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Botany*, 42(3): 407-419.
- Araujo, A. C. F. B., Barbedo, C. J. (2017) Changes in desiccation tolerance and respiratory rates of immature *Caesalpinia echinata* Lam. seeds. *Journal of Seed Science*, 39(2): 123-132.
- Arnhold E (2013) Pacote em ambiente R para análise de variância e análises complementares. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50(6): 488-492.
- Astarita, L. V., Handro, W., Floh, E. I. (2003) Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Brazilian Journal of Botany*, 26(2): 163-168.
- Attree, S. e Fowke, L. (1993) Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35(1): 1-35.
- Avilés, S. A. V., Lecona, C. A. G., Canto, A. F., López, S. E., Santana, N. B. (2013) Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3): 277-286.
- Bais, H. P., Ravishankar, G. (2002) Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(1): 1-34.
- Balbuena, T. S., Jo, L., Pieruzzi, F. P., Dias, L. L., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Floh, E. I. (2011) Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*, 72(4-5): 302-311.
- Ballester, A., Corredoira, E., Viéitez Martín, A. M. (2016) Limitations of somatic embryogenesis in hardwoods trees. In: Park Y-S, Bonga JM, Moon H-K (eds) *Vegetative propagation of forest trees*. National Institute of Forest Science (Nifos), Seoul, 56–74.
- Barbedo, C. J., Bilia, D. A., Figuraueiredo-Ribeiro, R. D. C. L. (2002) Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.(pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Brazilian Journal of Botany*, 25(4): 431-439.
- Baron, K., Stasolla, C. (2008) The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 44(5): 384-395.

- Becwar, M. R., Nagmani, R., Wann, S. R. (1990) Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research*, 20(6): 810-817.
- Benson, E. E. (2000) *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cellular e Developmental Biology. Plant*, 36: 141-148.
- Bewley, J. D. (1994) Seeds: physiology of development and germination. *Plenum Press*, New York, 341p.
- Bewley, J. D., Bradford, K., Hilhorst, H. (2012) Seeds: physiology of development, germination and dormancy. *Springer Science e Business Media*, New York, 392p.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140(2): 103-125.
- Bucur, V., Declercq, N. F. (2006) The anisotropy of biological composites studied with ultrasonic technique. *Ultrasonics*, 44: 829-831.
- Bueno, E. (2002) Pau-brasil. *Axis Mundi*, 280p.
- Cao, D., Hu, J., Zhu, S., Hu, W., 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(3): 301-307.
- Carvalho, P. E. R. (2003) Espécies arbóreas brasileiras. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 1: 745-749.
- Carvalho, N. M., Nakagawa, J. (2000) Sementes: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: FUNEP, 98-118.
- Chiancone, B., Germanà, M. A. (2012) Micropropagation of *Citrus* spp. by organogenesis and somatic embryogenesis. In *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*, Humana Press, Totowa, NJ, 99-118.
- Choi, P. S., Min, S. R., Ahn, M. Y., Soh, W. Y., Liu, J. R. (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration in immature zygotic embryo, ovule, and anther filament cultures of *Chinese cabbage*. *Scientia Horticulturae*, 72(2): 151-155.
- Chu, E. P., Tavares, A. R., Pescador, R., Tonello, K. C., Yokota, E. S. (2008) Callus induction in *Caesalpinia echinata*, a Brazilian endangered tree. *Tree and Forest Science and Biotechnology*, 2(1): 50-53.
- CNCFlora. (2012) *Caesalpinia echinata* in Lista Vermelha da flora brasileira, Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Caesalpiniaechinata>> Acesso em 07 janeiro 2020.

- Colombo, A. F., Joly, C. (2010) Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity *hotspot*, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology*, 70(3): 697-708.
- Corredoira, E., Ballester, A., Ibarra, M., Vieitez, A. M. (2015) Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* x *E. maidenii* trees. *Tree Physiology*, 35(6): 678-690.
- Corredoira, E., Valladares, S., Martínez, M. T., Vieitez, A. M., San José, M. C. (2013) Somatic embryogenesis in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Trees*, 27(6): 1597-1608.
- Correia, S. I., Pinto, G., Canhoto, J. M. (2016) Molecular biology of somatic embryogenesis in hardwoods. *Vegetative propagation of forest trees*, 97-122.
- Cuenca, B., San-José, M. C., Martínez, M. T., Ballester, A., Vieitez, A. M. (1999) Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. *Plant Cell Reports*, 18(7): 538-543.
- Davidonis, G. (1995) Changes in Polyamine Distribution during Cotton Fiber and Seed Development. *Journal of Plant Physiology*, 145(1-2): 108-112.
- de Oliveira, L. F., Elbl, P., Navarro, B. V., Macedo, A. F., dos Santos, A. L., Floh, E. I., Cooke, J. (2017) Elucidation of the polyamine biosynthesis pathway during Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seed development. *Tree Physiology*, 37(1): 116-130.
- de Rezende, J. C., Ferreira, E. A., Pasqual, M., Villa, F., Botelho, C. E., de Carvalho, S. P. (2008) Development of *Coffea arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. *Coffee Science*, 3(1): 30-37.
- De Smet, I., Lau, S., Mayer, U., Jürgens, G. (2010) Embryogenesis—the humble beginnings of plant life. *The Plant Journal*, 61(6): 959-970.
- Dean, W. (1996) A Ferro e fogo a historia da devastação da Mata Atlântica brasileira. *Companhia das letras*: Rio de Janeiro.
- Dias, L. L. C., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Pieruzzi, F. P., Floh, E. I. S. (2009) Polyamines, amino acids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. *Seed Science and Technology*, 37(1): 42-51.
- Dodeman, V. L., Ducreux, G., Kreis, M. (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48(8): 1493-1509.
- Dos Santos, A. L. W., Wiethölter, N., El Gueddari, N. E., Moerschbacher, B. M. (2006) Protein expression during seed development in *Araucaria*

- angustifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. *Physiologia Plantarum*, 127(1): 138-148.
- Elhiti, M., Stasolla, C., Wang, A. (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 49(6): 631-642.
- Fehér, A. (2015) Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4): 385-402.
- Fehér, A., Pasternak, T. P., Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3): 201-228.
- Floh, E. I. S., dos Santos, A. L. W., Demarco, D. (2015) Embriogênese vegetal: abordagens básicas e biotecnológicas. *in: Biotecnologia aplicada à saúde-vol. 1: fundamentos e aplicações*, 1: 89-111.
- Francis, D., Sorrell, D. A. (2001) The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regulation*, 33(1): 1-12.
- Fundação SOS Mata Atlântica (2020) Atlas da Mata Atlântica. Disponível em <<https://www.sosma.org.br/iniciativa/atlas-da-mata-atlantica/>>. Acesso em 14 de fevereiro de 2021.
- Gagnon, E., Bruneau, A., Hughes, C. E., de Queiroz, L. P., Lewis, G. P. (2016) A new generic system for the pantropical *Caesalpinia* group (Leguminosae). *PhytoKeys*, 71: 1-160.
- Gaj, M. D. (2001) Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for in vitro regeneration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(1): 39-46.
- Gaj, M. D. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43(1): 27-47.
- Galston, A. W., Kaur-Sawhney, R. (1995) Polyamines as endogenous growth regulators. *Springer*, Dordrecht, 158-178.
- Gaspar, M. D., De Blasis, P., Fish, S. K., Fish, P. R. (2008) Sambaqui (shell mound) societies of coastal Brazil. In *The handbook of South American archaeology*. Springer, New York, 319-335.
- Goh, H. H., Bakar, S. A., Azlan, N. D. K., Zainal, Z., Noor, N. M. (2019) Transcriptional reprogramming during *Garcinia*-type recalcitrant seed germination of *Garcinia mangostana*. *Scientia Horticulturae*, 257: 108727.
- Guan, Y., Li, S. G., Fan, X. F., Su, Z. H. (2016) Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 7: 938.

- Guerra, M. P., Torres, A. C., Teixeira, J. B., Torres, A., Caldas, L., Buso, J. (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. *In*: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. (ed.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa, DF, (2): 533-568.
- Guerra, M. P., Vesco, L. L., Ducroquet, J. P. H., Nodari, R. O., Reis, M. S. (2001) Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(2): 117-128.
- Harada, J. J., Belmonte, M. F., Kwong, R. W. (2010) Plant embryogenesis (zygotic and somatic). *In Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, Chichester: John Wiley e Sons, Ltd.: 1-13.
- Hellmann, M. E., Mello, J. I., Figuraeiredo-Ribeiro, R. C., Barbedo, C. J. (2006) Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. *Brazilian Journal of Botany*, 29(1): 93-101.
- Hilhorst, H. W. (1995) A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5(2): 61-73.
- Ikeda, M., Satoh, S., Kamada, H. (2002) Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. *Journal of Experimental Botany*, 53(374): 1575-1580.
- Ikeda, M., Umehara, M., Kamada, H. (2006) Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 23(2): 153-161.
- Isah, T. (2016) Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(5): 118.
- IUCN. (2021) The IUCN Red List of threatened species. International Union for Conservation of Nature. Disponível em <<https://www.iucnredlist.org>>. Acesso em 14 de fevereiro de 2021.
- IUCN and TRAFFIC. (2007) IUCN/TRAFFIC Analyses of the proposals to amend the CITES Appendices. Prepared by IUCN species programme and TRAFFIC for the fourteenth meeting of the conference of the parties to CITES. IUCN-The World Conservation Union, Gland, Switzerland.
- Jiménez, V. M. (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(2): 196-223.
- Jiménez, V. M. (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47(2): 91-110.

- Jürgens, G. (1998) Phases during the life cycle of the flowering plant. In Westhoff, P., Jeske, H., Jürgens, G., Kloppstech, K., Link, G. (eds) *Molecular Plant Development*, 1: 163-175.
- Karami, O., Saidi, A. (2010) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports*, 37(5): 2493-2507.
- Kermode, A. R. (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9(2): 155-195.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3): 367-381.
- Kuznetsov, V. V., Radyukina, N., Shevyakova, N. (2006) Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(5): 583.
- Lasanajak, Y., Minocha, R., Minocha, S. C., Goyal, R., Fatima, T., Handa, A. K., Mattoo, A. K. (2014) Enhanced flux of substrates into polyamine biosynthesis but not ethylene in tomato fruit engineered with yeast S-adenosylmethionine decarboxylase gene. *Amino Acids*, 46(3): 729-742.
- Longui, E. L., Yojo, T., Lombardi, D. R., Alves, E. S. (2010) The potential of ipê (*Handroanthus* spp.) and maçaranduba (*Manilkara* spp.) woods in the manufacture of bows for string instruments. *Iawa Journal*, 31(2): 149-160.
- Lorenzi, H. (1992) Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil: árvores brasileiras. *Plantarum*, Nova Odessa, São Paulo.
- Maguire, J. D. (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2:176–177.
- Mahendran, G., Bai, V. N. (2012) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 135: 40-44.
- Maki, H., Ando, S., Kodama, H., Komamine, A. (1991) Polyamines and the cell cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. *Plant Physiology*, 96(4): 1008-1013.
- Marcos Filho, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas, Piracicaba: ESALQ/USP/FEALQ, 2005. 495p.
- Marini, D., Dartora, J., Sander, G., Malavasi, M. D. M. (2012) Maturação fisiológica de sementes de *Luehea grandiflora* Mart. *Zucc. Scientia Agraria Paranaensis*, 11(1): 65-73.
- Martinelli, G., Moraes, M. A. Livro vermelho da flora do Brasil, Centro Nacional de Conservação da Flora, Rio de Janeiro, 2013. 1100p.

- Mello, J. I. D. O., Barbedo, C. J. (2007) Temperatura, luz e substrato para germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Árvore*, 31(4): 645-655.
- Mello, J. I. D. O., Figuraeiredo-Ribeiro, R. D. C. L., Barbedo, C. J. (2013) Sub-zero temperature enables storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. *Journal of Seed Science*, 35(4): 519-523.
- Merkle, S. A., Dean, J. F. (2000) Forest tree biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3): 298-302.
- Michael, A. J. (2016) Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. *Journal of Biological Chemistry*, 291(29): 14896-14903.
- Ministério do Meio Ambiente. Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Portaria nº 43, de 31 de janeiro de 2014.
- Minocha, R., Smith, D. R., Reeves, C., Steele, K. D., Minocha, S. C. (1999) Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 105(1): 155-164.
- Mittermeier, R. A., Gil, P. R., Hoffman, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B. F. (2005) Hotspots revisited: Earth, biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions, (CEMEX: Chicago).
- Montalbán, I. A., De Diego, N., Moncaleán, P. (2012) Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(2): 451-460.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772): 853.
- Niemenak, N., Awah, T. M., Lieberei, R. (2012) Establishment of suspension culture in *Theobroma cacao* and polyamines associated with cacao embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 67(1): 1-8.
- Ozudogru, E. A., Lambardi, M. (2016) Cryotechniques for the long-term conservation of embryogenic cultures from woody plants. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, 537-550.
- Passam, H. C., Makrogianni, D., Gregoriou, F., Karapanos, I. C. (2010) The size and germination of eggplant seed in relation to fruit maturity at harvest, after-ripening and ethylene application. *Analele Universitatii din Oradea-Pasciulus Biologie*, 2: 225-229.

- Pavan-Fruehauf, S. (2000) Plantas medicinais de Mata Atlântica: manejo sustentado e amostragem: Annablume, FAPESP, 10-16.
- Pierce, R., Thorner, K. (2002) The big issue. *Strad*, 113(1348): 840-842.
- Pieruzzi, F. P., Dias, L. L., Balbuena, T. S., Santa-Catarina, C., Santos, A. L. d., Floh, E. I. (2011) Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Annals of Botany*, 108(2): 337-345.
- Pillon, E., Terzi, M., Baldan, B., Mariani, P., Schiavo, F. L. (1996) A protocol for obtaining embryogenic cell lines from *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 9(4): 573-577.
- Pinto, L. 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. *Biologia da conservação, essências*. São Carlos, RiMa, 91-118.
- Prakash, M., Gurumurthi, K. (2010) Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100(1): 13.
- Puga-Hermida, M. I., Gallardo, M., Matilla, A. J. (2003) The zygotic embryogenesis and ripening of *Brassica rapa* seeds provokes important alterations in the levels of free and conjugated abscisic acid and polyamines. *Physiologia Plantarum*, 117(2): 279-288.
- Radoeva, T., Weijers, D. (2014) A roadmap to embryo identity in plants. *Trends in Plant Science*, 19(11): 709-716.
- Rangel, P. C. (2018) *Aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos na propagação in vitro e no armazenamento de sementes em espécies arbóreas nativas da mata atlântica*. Tese Doutorado em Produção Vegetal - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 154p.
- Reis, R. S., de Moura Vale, E., Heringer, A. S., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2016) Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *Journal of Proteomics*, 130: 170-179.
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., Hirota, M. M. (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142(6): 1141-1153.
- Rios, A. P. S., Aragão, V. P. M., Passamani, L. Z., Macedo, A. F., Fulgêncio, L. A. P., Floh, E. I. S., Santa-Catarina, C. (2015) High level of sucrose, spermine and spermidine are related with the early germination in

*Plathymenia foliolosa* compared to *Dalbergia nigra*. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27(3-4): 237-249.

- Rocha, Y. T. (2011) Distribuição geográfica e época de florescimento do Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata* LAM.–LEGUMINOSAE). *Revista do Departamento de Geografia*, 20: 23-36.
- Rodrigues, R. R., Lima, R. A., Gandolfi, S., Nave, A. G. (2009) On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 142(6): 1242-1251.
- Sallandrouze, A., Faurobert, M., El Maâtaoui, M. (2002) Characterization of the developmental stages of cypress zygotic embryos by two-dimensional electrophoresis and by cytochemistry. *Physiologia Plantarum*, 114(4): 608-618.
- Santa-Catarina, C., Maciel, S. d. C., Pedrotti, E. L. (2001) Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). *Brazilian Journal of Botany*, 24(4): 501-510.
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Balbuena, T. S., Viana, A. M., Estelita, M. E. M., Handro, W., Floh, E. I. (2006) IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regulation*, 49(2-3): 237-247.
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Guerra, M. P., Steiner, N., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., dos Santos, A. L. W. (2012) The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. *Currents Topics in Plant Biology*, 13: 103-119.
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Scherer, G. F., Floh, E. I. S. (2007) Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(1): 93-101.
- Santa-Catarina, C., Olmedo, A. d. S., Meyer, G. d. A., Macedo, J., De Amorim, W., Viana, A. M. (2004) Repetitive somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae): effect of somatic embryo developmental stage and dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78(1): 55-62.
- Santos, A. L. W. D., Silveira, V., Steiner, N., Vidor, M., Guerra, M. P. (2002) Somatic embryogenesis in parana pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(1): 97-106.
- Scarano, F. R., Ceotto, P. (2015) Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. *Biodiversity and Conservation*, 24(9): 2319-2331.
- Schulz, D. G., Schneider, C. F., Gusatto, F. C., Ignácio, V. L., de Matos Malavasi, M., Malavasi, U. C. (2017) Physiological and enzymatic changes during

- seed maturation and germination of *Luehea divaricata*. *Floresta*, 47(1): 105-112.
- Sen, K., Choudhuri, M., Ghosh, B. (1981) Changes in polyamine contents during development and germination of rice seeds. *Phytochemistry*, 20(4): 631-633.
- Shahzad, A., Sharma, S., Siddiqui, S. A. (2016) Somatic embryogenesis: a valuable strategy for phyto-climbing diversity conservation. In: Shahzad, A., Sharma, S., Siddiqui, S. A. (eds) *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*. Springer. Cham, 195-216.
- Sharma, Y., Singh, B., Upadhyay, S. (2008) Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel*, 87(12): 2355-2373.
- Shoeb, F., Yadav, J., Bajaj, S., Rajam, M. (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Science*, 160(6): 1229-1235.
- Silveira, V., Balbuena, T. S., Santa-Catarina, C., Floh, E. I., Guerra, M. P., Handro, W. (2004) Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regulation*, 44(2): 147-156.
- Silveira, V., Santa-Catarina, C., Tun, N. N., Scherer, G. F., Handro, W., Guerra, M. P., Floh, E. I. (2006) Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant Science*, 171(1): 91-98.
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E. C., Thorpe, T. A. (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 38(2): 93-105.
- Stasolla, C., Yeung, E. C. (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(1): 15-35.
- Steiner, N., Santa-Catarina, C., Andrade, J. B., Balbuena, T. S., Guerra, M. P., Handro, W., Floh, E. I., Silveira, V. (2008) *Araucaria angustifolia* biotechnology. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 2: 20-28.
- Steiner, N., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Floh, E. I., Guerra, M. P. (2007) Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(1): 55-62.

- Steinmacher, D. A., Clement, C. R., Guerra, M. P. (2007) Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(1): 15-22.
- Tautorus, T., Fowke, L., Dunstan, D. (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany*, 69(9): 1873-1899.
- Termignoni, R. R. (2005) Cultura de tecidos vegetais. *UFRGS*, 182p.
- Thompson, D. (2014) Challenges for the large-scale propagation of forest trees by somatic embryogenesis - a review. In *Proceedings of the Third International Conference of the IUFRO unit*, 2(2): 81-91.
- Tvorogova, V. E., Lutova, L. A. (2018) Genetic regulation of zygotic embryogenesis in angiosperm plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(1): 1-14.
- Van den Broeck, D., Van Der Straeten, D., Van Montagu, M., Caplan, A. (1994) A group of chromosomal proteins is specifically released by spermine and loses DNA-binding activity upon phosphorylation. *Plant Physiology*, 106(2): 559-566.
- Von Arnold, S. (2008) Somatic embryogenesis. In: George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. J. (eds) *Plant propagation by tissue culture*. Springer, 1(3): 335-354.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3): 233-249.
- Vuosku, J., Jokela, A., Läärä, E., Sääskilähti, M., Muilu, R., Sutela, S., Häggman, H. (2006) Consistency of polyamine profiles and expression of arginine decarboxylase in mitosis during zygotic embryogenesis of Scots pine. *Plant Physiology*, 142(3): 1027-1038.
- Walden, R., Cordeiro, A., Tiburcio, A. F. (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiology*, 113(4): 1009.
- Walker, C., Mezzomo, R., Maciel, C. G., Muniz, M. F. B., Araujo, M. M. (2015) Physiological and sanitary quality of *Cordia americana* seeds collected in plant and soil. *Revista Verde*, 10(1): 259-262.
- Werner, E. T., Cuzzuol, G., Pessotti, K. V., Lopes, F. P., Roger, J. d. A. (2009) *In vitro* callogenesis control of pau-brasil. *Revista Árvore*, 33(6): 987-996.
- Werner, E. T., Milanez, C., Mengarda, L., Vendrame, W. A., Cuzzuol, G. (2010) Culture media, growth regulators and nitrogen sources in callus formation regulation of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Acta Botanica Brasilica*, 24(4): 1046-1051.

- Williams, E. G., Maheswaran, G. (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57(4): 443-462.
- Young, C. E. (2005) Causas socioeconômicas do desmatamento da Mata Atlântica brasileira. Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. *Fundação SOS Mata Atlântica and Conservação Internacional*, Belo Horizonte, 103-118.
- Zimmerman, J. L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5(10): 1411.