

**Fernanda Piccolo Pieruzzi**

**Quantificação de aminoácidos, poliaminas, AIA e  
ABA e marcadores protéicos na germinação de  
sementes de *Ocotea odorifera* Vell. (Lauraceae)**

**São Paulo**

**2009**

**Fernanda Piccolo Pieruzzi**

**Quantificação de aminoácidos, poliaminas, AIA e ABA e marcadores protéicos na germinação de sementes de *Ocotea odorifera* Vell. (Lauraceae)**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.**

**Orientadora : Eny lochevet Segal Floh**

**São Paulo**

**2009**

Pieruzzi, Fernanda Piccolo  
P 624q      Quantidade de aminoácidos, poliaminas, AIA, ABA e  
                 marcadores protéicos na germinação de sementes de  
                 *Ocotea odorifera* / Fernanda Piccolo Pieruzzi. --  
                 São Paulo : F. P. P., 2009.  
                 69 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica,  
2009.

1. *Ocotea odorifera* 2. Aminoácidos 3. Poliaminas  
4. Ácido indol-3-acético 5. Ácido abscísico 6. Proteínas  
7. Sementes recalcitrante – Germinação I.Universidade de  
São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de  
Botânica II. Título

**LC    QK 495.L375**

Candidata : Fernanda Piccolo Pieruzzi

Título da Dissertação : Quantificação de aminoácidos, poliaminas, AIA e ABA e marcadores protéicos na germinação de sementes de *Ocotea odorifera* Mez. (Lauraceae)

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa da dissertação de mestrado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou :

Aprovada ( ) Reprovada ( )

**Comissão Julgadora:**

---

Prof. Dr. André L. W. dos Santos

---

Prof. Dr. José Cláudio Barbedo

---

Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eny lochevet Segal Floh  
Orientadora

À Iracema Pereira Esteves (*in memoriam*), que tanto dedicou sua vida à minha educação, dedico este trabalho.

*“Tenho apenas duas mãos e todo o sentimento do mundo...”*

Carlos Drummond de Andrade

## AGRADECIMENTOS

Sou eternamente agradecida a todos aqueles que direta, indiretamente (ou em intenções) apoiaram a realização deste trabalho e proporcionaram um rico período de aprendizagem e convivência.

Aos meus pais, Cleide e Elio Pieruzzi, meu noivo, Fábio Cruz, minha irmã, Paula Pieruzzi, e meu avós Renato e Iracema Esteves (*in memoriam*) e Adélia Pieruzzi, para sempre meus melhores amigos e companheiros, pelo carinho, compreensão, apoio de toda a ordem, vibração em cada conquista e suporte nos momentos menos fáceis.

À minha nova família Cruz, especialmente o Sr. Fábio, Celina, Fagner, Fabiana, Márcio Teixeira e Bianca e às amigas Bruna Sousa e Camila Goto pelo carinho, apoio e compreensão.

A Prof. Eny I. S. Floh, pela confiança e credibilidade, orientação, compreensão e disposição para a resolução dos obstáculos enfrentados durante toda a execução deste trabalho.

Aos amigos do BIOCEL, pelo excelente convívio e amizade, especialmente a Tiago Balbuena, Leonardo Dias, André Santos e Julia Andrade (e Guilherme Cruz) pelo companheirismo, discussões, orientações, auxílio na confecção da dissertação, caronas e hospedagem nos dias de trabalho mais longos, Claudete Santa-Catarina e Vanido Silveira, pelas primeiras orientações e incentivo, Amanda Macedo e Carmen Freitas, sempre prontas a resolver nossos problemas, e aos mais novos integrantes do grupo Yve Silva, Leonardo Jo e Ana Lúcia Peluzzo, pelo apoio.

Aos funcionários do IB-USP pela viabilização na realização do projeto, especialmente à Suzi silva, pela amizade e o café que nos mantém ativos.

Ao Hugo Pereira (Instituto Florestal), Eraldo Vieira e demais funcionários do Parque Estadual Carlos Botelho pelo auxílio na coleta dos frutos de *O. odorifera*.

Aos professores Cláudio José Barbedo (Instituto de Botânica), Fanly Fungyi Chow Ho (IB-USP) e Verônica Angyalossy (IB-USP) pelas sugestões durante a execução do trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida, condição imprescindível para a dedicação demandada neste trabalho.

À Universidade de São Paulo pela oportunidade, estrutura e pelos diferentes canais de aprendizagem oferecidos.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Eventos e alterações fisiológicas durante o desenvolvimento e germinação de três tipos de sementes: ortodoxas, recalcitrantes e altamente recalcitrantes (segundo Faria, 2006).
- Figura 2.** Área de ocorrência de *O. odorifera* (Salomão et al., 1992).
- Figura 3.** Aspecto da planta (A) e (B) ramo de *Ocotea odorifera* com frutos. C) Estrutura molecular de safrol.
- Figura 4.** Aspectos morfológicos dos frutos e sementes de *Ocotea odorifera*: A) fruto com hipanto (h.), B) fruto sem hipanto, C) semente escarificada.
- Figura 5.** Aspectos morfológicos das sementes de *O. odorifera* em diferentes períodos após a semeadura em vermiculita. Semente madura (A); após a semeadura: 15 dias (B), 30 dias, com o eixo embrionário (e. e.) evidente; (C); 45 dias (D) com a radícula (r.) emitida após a semeadura. Barra = 0,1 cm.
- Figura 6.** Géis 2-DE representativos de *O. odorifera*, corados em prata, em gradiente de pH 3-10, a partir de 40 µg de proteínas, na semente madura e após 15, 30 e 45 dias de semeadura.
- Figura 6.** Proporção das massas de aminoácidos (µg/g de massa fresca) na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura.
- Figura 7.** Géis 2-DE representativos de *O. odorifera*, corados em prata, em gradiente de pH 4-7, a partir de 40 µg de proteínas, na semente madura e após 15, 30 e 45 dias de semeadura.
- Figura 8.** Géis 2-DE representativos de *O. odorifera*, corados em prata, em gradiente de pH 4-7, a partir de 40 µg de proteínas, na semente madura e após 15, 30 e 45 dias de semeadura.
- Figura 9.** Conteúdo de aminoácidos (µg/g de MF), na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. MF = massa fresca.
- Figura 10.** Conteúdo de aminoácidos livres totais e de asparagina (ASN) na semente madura e aos 15, 30 e 45 após semeadura de *O. odorifera*. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.
- Figura 11.** Conteúdo dos aminoácidos livres (µg/g de MF ± DV), participantes da via de biossíntese de poliaminas ornitina (ORN), arginina (ARG) e metionina (MET) na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.
- Figura 12.** Conteúdo dos aminoácidos aromáticos livres (µg/g de MF ± DV) (TIR) tirosina (PHE) fenilalanina (TRP) triptofano na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.
- Figura 13.** Conteúdo de poliaminas (PAs) totais (livres + conjugadas) (µg/g de MF ± DV) e relação Put (Spm+Spd), na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.

- Figura 14.** Poliaminas (PAs) livres e conjugadas ( $\mu\text{g/g}$  de MF  $\pm$  DV) na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. Put = putrescina, Spd = espermidina, Spm = espermina.
- Figura 15.** Conteúdos de ácido indol-3-acético (AIA) e ácido abscísico (ABA) na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30, e 45 dias de semeadura ( $\mu\text{g/g}$  ou  $\text{ng/g}$  de MF  $\pm$  DV). Letras diferentes representam diferenças estatísticas.
- Figura 16.** Conteúdo proteínas totais ( $\text{mg/g}$  de MF  $\pm$  DV) na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias após a semeadura. Letras iguais representam ausência de diferenças estatísticas.
- Figura 17.** Géis 2-D representativos, corados em prata, em gradiente de pH 4-7, a partir de 40  $\mu\text{g}$  de proteínas, na semente madura de *O. odorifera* e após 15 dias de semeadura.
- Figura 18.** Géis 2-D representativos, corados em prata, em gradiente de pH 4-7, a partir de 40  $\mu\text{g}$  de proteínas de *O. odorifera* após 30 e 45 dias de semeadura.
- Figura 19.** Número de *spots* na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. As letras iguais representam ausência de diferenças estatísticas.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Aminoácidos livres na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura ( $\mu\text{g/g}$  de MF  $\pm$  DP).

**Tabela 2.** Proteínas com variação de abundância na semente madura e após 15, 30 e 45 dias de semeadura de *O. odorifera*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-DE: eletroforese bidimensional

ABA: ácido abscísico

AIA: ácido indol-3-acético

Ala: alanina

Arg: arginina

Asn: asparagina,

Asp: ácido aspártico

BSA: albumina de soro bovino

CHAPS: 3-[3-(cholamidopropil)-dimetil-amonio]-1-propanesulfonato

DAH: 1,7-diaminoheptano

DAP: diâmetro à altura do peito

DNA: ácido desoxirribonucléico

DP: desvio padrão

DTT: ditioneitol

ES: embriogênese somática

GA: giberelina

Gaba: ácido  $\gamma$ -aminobutírico

Gln: glutamina

Glu: ácido glutâmico

Gly: glicina

His: histidina

IEF: focalização isoelétrica

Ile: isoleucina

IPG: gel de gradiente imobilizado de pH

IPP: isopentenildifosfato

LEA: *late embryogenesis abundant*

Leu: leucina

Lis: lisina

Met: metionina

MF: massa fresca

MS: espectrometria de massas

N: nitrogênio

OPA: o-ftaldialdeído

Orn: ornitina

PA: poliamina

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

Phe: fenilalanina

pl: ponto isoelétrico

Put: putrescina

RNA: ácido ribonucléico

SAM: S-adenosil metionina

SDS: dodecil sulfato de sódio

Ser: serina

Spd: espermidina

Spm: espermina

TCA: ácido tricloroacético

Tir: tirosina

Tre: treonina

Trp: triptofano

Val: valina

**Resumo:** *Ocotea odorifera* é uma espécie nativa da Mata Atlântica, com características recalcitrantes, que se encontra em risco de extinção devido a sua exploração econômica. Técnicas baseadas na biotecnologia podem ser utilizadas para o processo de conservação e reintrodução no seu ambiente natural de espécies ameaçadas de extinção. Dentre as técnicas biotecnológicas, a embriogênese somática (ES) vem sendo utilizada com bastante sucesso em programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma de espécies arbóreas. Contudo, para o estabelecimento de protocolos eficientes de ES são necessários estudos básicos de fisiologia e bioquímica do desenvolvimento da semente e da germinação, para que as condições *in vivo* possam ser recriadas de forma eficiente *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar as variações no conteúdo endógeno de aminoácidos, PAs, AIA, ABA e estabelecer marcadores protéicos durante a germinação de sementes de *O. odorifera*. As sementes foram germinadas em substrato de vermiculita em fotoperíodo de 16h a 27°C. A seguir, coletadas após 0, 15, 30 e 45 dias de semeadura. Foi observado que: a) o conteúdo de aminoácidos aumentou durante o processo germinativo. A asparagina foi observada em maior quantidade e predominou durante todo o período analisado. A metionina e a ornitina, precursores das PAs, e o triptofano, precursor do AIA, aumentaram ao longo do processo germinativo; b) o conteúdo total de PAs decresceu nos últimos 15 dias de avaliação. Neste período, as poliaminas conjugadas apresentaram aumento indicando possível relação entre conjugação e disponibilidade de PAs nas células; c) a relação Put/(Spm+Spd) diminuiu ao final do período analisado enquanto no mesmo período a Spm foi a PA livre mais abundante indicando relação entre Spm e alongamento celular; d) O AIA apresentou aumento ao longo do processo germinativo, ao mesmo tempo em que a queda no conteúdo de ABA pode ser observada; e) o conteúdo de proteínas decresceu ao longo do processo germinativo. Os perfis protéicos diferiram pouco entre os estádios analisados. Entretanto, foi observada variação significativa na abundância (% de volume) em 39 *spots*, que foram definidos como marcadores do processo germinativo. Dentre esses *spots* incluem-se 26 que reduziram e 2 *spots* que aumentaram suas abundâncias ao longo do processo germinativo, 10 que apresentaram tanto aumento quanto diminuição durante o período observado e apenas 1 exclusivo da semente madura. Estes resultados abrem perspectivas para a avaliação de parâmetros fundamentais para a otimização de protocolos de ES e permitiram uma maior compreensão das variações endógenas dos diferentes compostos citados no processo germinativo das sementes de *O. odorifera*.

**Palavras-chave:** *Ocotea odorifera*, germinação, sementes recalcitrantes, AIA, ABA, PAs, aminoácidos, proteínas.

**Abstract:** *Ocotea odorifera* is a native tree from the Atlantic Forest with recalcitrant features that is in risk of extinction because its economical exploration. Techniques based on biotechnology can be used for the conservation and reintroduction process of species in risk of extinction in their natural environment. Between these biotechnological techniques, the somatic embryogenesis (SE) have been used successfully in programs of genetic breeding and tree germoplasm conservation. However, basic studies of physiology and biochemical of the seed development and germination are necessary for the establishment of efficient protocols of SE. Thus, these conditions *in vivo* can be recreated *in vitro*. The aim of this work was to evaluate the variations in the endogenous content of amino acids, polyamines, IAA, ABA and protein markers throughout the seed germination of *O. odorifera* seeds. The seeds were germinated on vermiculite substrate at 27°C and 16h of photoperiod and collected after 0, 15, 30 e 45 days of sowing. It was observed that: a) the amino acids content increased throughout the germination process. Asparagine was the highest content sighted and prevailed during the period studied. Methionine and ornithine, polyamines precursors, and tryptophan, IAA precursor, increased throughout germination process; b) the total PAs content decreased in the last 15 days of evaluation. At the same period, conjugated PAs showed an increase, indicating a relation between conjugation and availability of polyamines inside the cells; c) the Put/(Spm+Spd) relation decreased while the Spm was the most abundant free PA observed at the end of the period analyzed indicating a relation between Spm and cellular elongation; d) IAA increased during all the process while a decrease of ABA was sighted; e) protein content decreased throughout the period observed. The proteic profile didn't change a lot between the stages. Os perfis protéicos diferiram pouco entre os estádios analisados. Entretanto, foi observada variação significativa na abundância (% de volume) em 39 spots, que foram definidos como marcadores do processo germinativo. Among them, could be include 26 that decreased and 2 that decreased its abundances throughout the germinative process, 10 that both increased and decreased throughout the period analyzed and just 1 exclusive from mature seed. These results open perspectives to evaluation of fundamentals parameters to optimization of ES protocols and allow a better comprehension about the endogenous variation of the different compounds cited in the process of *O. Odorifera* seeds germination.

**Keywords:** *Ocotea odorifera*, germination, recalcitrant seeds, IAA, ABA, PAs, amino acids, proteins.

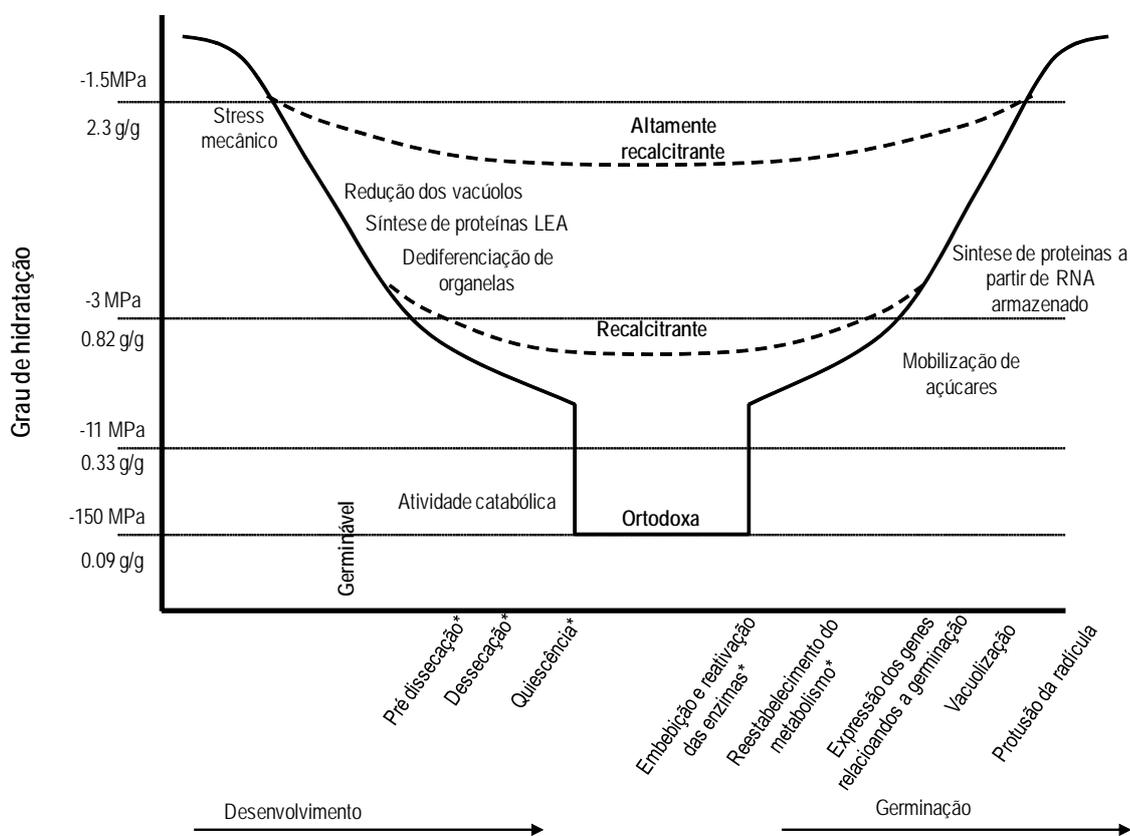
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1. A germinação em sementes.....	16
1.1.2. Aspectos fisiológicos e bioquímicos durante a germinação das sementes.....	17
1.2. <i>Ocotea odorifera</i> como sistema de estudo.....	20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Materiais vegetais.....	27
3.2. Germinação das sementes.....	27
3.3. Análises bioquímicas.....	28
3.3.1. PAs.....	28
3.3.2. Aminoácidos.....	29
3.3.3. AIA e ABA.....	29
3.3.4. Proteínas.....	30
3.3.4.1. Extração.....	30
3.3.4.2. Determinação de conteúdo.....	31
3.3.4.3. Eletroforese bidimensional (2-DE) .....	31
3.3.4.4. Análise de imagens.....	34
3.4. Amostragem e análise estatística .....	35
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
4.1. Aminoácidos.....	36
2.5.3. Poliaminas.....	41
2.5.4. AIA e ABA.....	43
2.5.5. Proteínas.....	45
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>59</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A germinação em sementes

A germinação é um processo de desenvolvimento que pode ser dividido em três fases: a) embebição; b) reativação da atividade metabólica e c) início do crescimento da plântula (Bewley e Black 1994). Morfologicamente, o início do crescimento da plântula corresponde à emergência da radícula, sendo a fase subsequente geralmente definida como estabelecimento da plântula (Gallardo et al. 2002). Entretanto, para as sementes recalcitrantes, a fase de embebição, quando existe, se apresenta de forma mais tênue comparada com as sementes ortodoxas, como proposto por Faria (2006) na Figura 1.



**Figura 1.** Eventos e alterações fisiológicas durante o desenvolvimento e germinação de três tipos de sementes: ortodoxas, recalcitrantes e altamente recalcitrantes (segundo Faria, 2006).

Ao contrário das sementes recalcitrantes, as sementes ortodoxas são liberadas com baixo conteúdo de umidade e, portanto, com menor potencial osmótico, devido a desidratação sofrida durante a maturação (Figura 1). Para estas sementes, a desidratação é um evento pré-programado que ocorre ao final de seu desenvolvimento (Kermode 1997). Desidratadas, as sementes podem alcançar umidade abaixo de 0,3 g H<sub>2</sub>O/g de matéria seca (Hoesktra et al. 2001) ou um decréscimo de água total entre 90 e 95% (Kermode e Finch-Savage, 2002). Neste estado, as sementes podem resistir à ambientes desfavoráveis e, quando não dormentes, podem

restabelecer a atividade metabólica e crescer em condições adequadas para a germinação (Han et al. 1997).

De acordo com Oliver et al (2000), a tolerância à dessecação em plantas é um fenômeno comum nas estruturas reprodutivas das plantas verdes (pólen, esporos e sementes) e pode ser definida como a capacidade de recuperar quase toda água protoplasmática perdida (80-90%). Segundo Bewley e Oliver (1992) tal tolerância pode ocorrer tanto por mecanismos baseados no reparo de danos resultantes da desidratação (ou reidratação), quanto por mecanismos baseados na proteção da integridade celular. Neste caso, a proteção ocorre pela produção de substâncias protetoras como proteínas do tipo deidrininas (Han et al. 1997) e oligossacarídeos (Koster e Leopold 1988, Obendorf et al. 2009).

Em contraste, as sementes recalcitrantes apresentam-se metabolicamente ativas quando dispersas, variando o tipo e intensidade de metabolismo de acordo com a espécie, com o estado de desenvolvimento, e a concentração de água ao dispersar (Berjak et al. 1989). Tais sementes permanecem sensíveis à desidratação, desde o desenvolvimento até a liberação da planta mãe (Berjak e Pammenter 2008) permanecendo metabolicamente ativas. Dessa forma, o desenvolvimento das sementes progride, culminando na germinação, ou seja, na emissão da radícula, sem a necessidade de suprimento exógeno de água (Berjak et al. 1989).

Este padrão de metabolismo germinativo é um dos fatores que impede a curto ou médio prazo, o armazenamento de sementes recalcitrantes (Berjak e Pammenter 2008). Estas sementes, caracterizadas por apresentar viabilidade entre dias e meses, ou, para espécies de clima temperado, talvez um ou dois anos (Chin and Roberts, 1980), e são propensas à injúrias também por resfriamento.

### **1.1.2. Aspectos fisiológicos e bioquímicos durante a germinação das sementes**

A germinação é um processo de desenvolvimento que resulta de um complexo controle espacial e temporal, onde vários reguladores de crescimento atuam na expressão de múltiplos genes (Barendse e Peeters 1995).

Dentre os hormônios, destacam-se o ácido abscísico (ABA), e as auxinas (Bewley e Black 1994). O ABA é um hormônio vegetal encontrado em todas as plantas vasculares e musgos, e transportado pelo tecido vascular, preferencialmente pelo floema. A concentração do hormônio livre varia nos tecidos de acordo com a síntese, degradação, compartimentalização, conjugação e transporte. A síntese tem início nos plastídeos e é concluída no citosol a partir de carotenóides como precursores. Estes, por sua vez, são formados a partir do isopentenildifosfato (IPP) (Seo e Koshiba 2002). A ação do hormônio livre é principalmente inativada por oxidação ou conjugação com monossacarídeos. A conjugação não só inativa o hormônio, mas também pode ser uma forma de armazenamento já que a forma livre ocorre no citosol e a conjugação, nos vacúolos (Taiz e Zeiger 2009).

O ABA atua em diferentes etapas ao longo da formação e amadurecimento da semente. Nas fase inicial da embriogênese, o ABA produzido pelo tecido materno evita a viviparidade, promovendo o crescimento e o desenvolvimento do embrião (Chen et al. 2002, Frey et al, 2004). Durante a maturação, este hormônio é produzido pelos tecidos do embrião, permitindo a síntese de proteínas e lipídeos de reserva (Kermode 1990, Gutierrez et al. 2007). O conteúdo endógeno na semente sofre redução considerável após o acúmulo de substâncias de reserva e o início da desidratação da semente (Rock e Quatrano 1995, Bewley e Black 1994). O ABA controla a transição da dormência para a germinação nas sementes, sendo a germinação precedida pelo decréscimo de seu conteúdo endógeno (Kermode, 2005), e a dormência pela manutenção de seu acúmulo nas sementes maduras (Rock e Quatrano, 1995). Aplicações de ABA exógeno, em sementes de *Arabidopsis* não dormentes, revelaram que o hormônio inibe a germinação, por restringir a disponibilidade de energia e nitrogênio para a semente. Entretanto, seu efeito é dependente da concentração, sendo a semente capaz de retomar o processo germinativo, pela adição de aminoácidos e açúcares ao meio de cultivo (Garcarrubio et al. 1997).

As auxinas influenciam vários eventos relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal, podendo-se destacar o ácido indol-3-acético (AIA), e que apresenta como principal precursor o aminoácido triptofano (Gaspar et al. 1996). O AIA é uma das principais substâncias envolvidas no controle do desenvolvimento da semente, determinando a orientação do eixo embrionário nas fases iniciais da embriogênese (Rock e Quatrano 1995, Kong et al. 1997, Santa-Catarina et al, 2006, Casson e Lindsey 2006). O principal fator na regulação de auxinas livres nas plantas é a conjugação, além da degradação por oxidação. Distante dos locais de síntese, tecidos vegetais podem apresentar auxinas conjugadas, que funcionam como hormônios inativos, e que podem atuar tanto como fonte reversível de AIA, bem como intermediários do processo de degradação do hormônio. Os conjugados de alto peso molecular como o AIA-glicoproteínas, nas sementes parecem apresentar função de estocagem do hormônio (Taiz e Zeiger, 2009).

Existem poucos estudos que relacionam as auxinas ao processo germinativo. Dias et al., (2009) relataram a diminuição de seu conteúdo no mesmo período em que o conteúdo de ABA diminuía no processo germinativo das sementes de *Ocotea catatharinensis*. De forma inversa, durante a maturação da mesma semente, Santa-Catarina et al. (2006) observaram o aumento da concentração de ABA, concomitantemente à diminuição dos níveis de AIA. Juntos, esses eventos indicam uma possível relação entre balanço hormonal entre AIA e ABA e os processos fisiológicos do desenvolvimento das sementes e germinação.

Além dos reguladores relatados acima, outros compostos podem estar envolvidos no processo germinativo das sementes, como as poliaminas e os aminoácidos.

As poliaminas (PAs) são moléculas alifáticas de baixo peso molecular presente em todos os organismos vivos. As principais PAs encontradas nas plantas superiores são a Put (putrescina), a Spd (espermidina) e a Spm (espermina), ocorrendo na forma livre ou conjugada com ácidos

fenólicos e moléculas de baixo peso molecular (Bouchereau et al. 1999, Kuznetsov et al. 2006). Além da biossíntese e conjugação, a degradação por oxidação é uma forma de regulação dos níveis de PAs (Kusano et al. 2008). Nas plantas, localizam-se não apenas no citosol, mas também nas organelas, como mitocôndrias, cloroplastos e vacúolos (Kumar et al. 1997). Sua síntese inicia-se por duas diferentes vias: a putrescina é formada diretamente a partir da ornitina ou indiretamente pela arginina (precursor dos intermediários agmatina e ornitina). A formação da Spm ocorre pela adição de um grupo S-adenosil metionina (SAM) descarboxilado adicionado à putrescina. A formação da espermina ocorre pela adição de outro SAM descarboxilado (Buchanan 2000).

A presença das cargas positivas nas moléculas de PAs permitem a ligação eletrostática das mesmas à macromoléculas celulares, incluindo DNA, RNA, cromatina e proteínas, podendo causar a estabilização ou desestabilização destas macromoléculas (Kusano et al. 2008). Dessa forma, estão envolvidas em processos celulares fundamentais incluindo a regulação da expressão gênica, modulação do sinal e proliferação celular e estabilização de membranas (Tabor e Tabor 1984, Cohen 1998, Igarashi e Kashiwagi 2000). Sugere-se também o envolvimento das PAs na divisão e diferenciação celular, organogênese, embriogênese e tolerância ao estresse abiótico e biótico (Bouchereau et al. 1999, Minocha et al. 1999, Silveira et al. 2004a,b, Silveira et al. 2006, Santa-Catarina et al. 2006, Groppa e Benavides, 2007). Entretanto, estudos da participação das PAs no processo germinativo são praticamente inexistentes na literatura (Kuznetsov et al. 2006).

Os aminoácidos apresentam níveis alterados ao longo da embriogênese, refletindo as alterações entre a produção e a utilização destas moléculas. Destaca-se que pequenas alterações na taxa da síntese protéica podem causar grandes flutuações nos níveis dos aminoácidos (Macnicol 1983, Silveira et al. 2004b, Santa-Catarina et al. 2006). Os aminoácidos armazenados durante o desenvolvimento da semente são utilizados no processo de germinação, servindo como nutrientes e substrato para o desenvolvimento inicial da plântula (Rock e Quatrano 1995, Dias et al 2009).

Durante o desenvolvimento das sementes, ocorre um grande acúmulo de proteínas de reserva, as quais são utilizadas como fonte primária de nitrogênio durante a germinação (Job et al. 2005), e como de substrato para o desenvolvimento inicial da plântula, até a sua autotrofia (Merkle et al. 1995). Durante a embriogênese, o aumento no conteúdo de proteínas, ocorre como resultado da síntese de proteínas de reserva e proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*), as quais atuam na proteção contra a desidratação da semente (Wise e Tunnacliffe, 2004). No processo germinativo as proteínas armazenadas são degradadas, e os aminoácidos hidrolisados, liberam grandes quantidades de amônio, que, por sua vez, são reassimilados, sintetizando moléculas nitrogenadas para o crescimento da plântula (Cantón et al. 2005).

Recentemente, o uso de proteínas como marcadores moleculares para o desenvolvimento do embrião e no processo de germinação têm sido descrito para várias espécies (Bak-Jensen et

al. 2004, Vensel et al. 2005, Natarajan et al. 2005, Silveira et al. 2008). Durante o desenvolvimento de embriões zigóticos de *O. catharinensis* foi observado que a maior concentração de proteínas totais ocorre no embrião maduro (Santa-Catarina et al. 2006). Vários estudos têm sido realizados, em especial para *Arabidopsis*, durante a germinação de sementes, visando à identificação de proteínas diferencialmente expressas neste processo (Gallardo et al. 2001, Kucera et al. 2005, Chibani et al. 2006). Entretanto, para as sementes recalcitrantes, como é o caso de, *O. odorifera*, esses tipos de estudos ainda são escassos.

Em geral, o estudo das proteínas em plantas ao longo de um processo biológico são realizados por proteômica comparativa. Esta metodologia consiste na separação de proteínas através de eletroforese bidimensional (2-DE) em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), com posterior identificação da proteína por espectrometria de massas (MS/MS) (Dias et al. 2007). A 2-DE separa as proteínas em dimensões distintas, em que na primeira dimensão, as proteínas são separadas por pontos isoelétricos, e na segunda dimensão são separadas de acordo com suas massas moleculares. Mesmo com as limitações inerentes à técnica, em estudos de proteômica comparativa, quando o objetivo é a identificação de diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a 2-DE é normalmente o método de escolha, gerando dados em um formato que possibilita uma fácil avaliação visual e fornece comparação físicoquímicos e quantitativos (Cánovas et al. 2004). Este é o caso do processo germinativo em que a proteômica permite obter informações simultâneas sobre esse múltiplo processo (Cahill et al. 2001).

## **1.2. *Ocotea odorifera* como sistema de estudo**

A espécie *O. odorifera* (Vell.) Rowher, anteriormente conhecida como *Ocotea pretiosa* (Nees) Mez., pertence a família Lauraceae, a qual constitui uma das mais importantes famílias da flora dendrológica brasileira, reunindo 19 gêneros e cerca de 390 espécies (Marchiori 1997). Popularmente, é conhecida canela-sassafrás (PR, SC), sassafrás (PR), canela-cheirosa, canela-funcho (SP), canela-parda, sassafrás brasileiro e louro-cheiroso (Carvalho 1994, Santos 1987).

Segundo Reitz et al. (1978), as plantas de *O. odorifera* normalmente têm entre 20 m a 25 m de altura e 70 cm de DAP (diâmetro à altura do peito). O tronco geralmente tortuoso, casca grossa cinzento-escura ou marrom, ramificações irregulares, ascendentes, formando copa alongada. As folhas são alternas, simples, agrupadas nas pontas dos ramos, finamente coriáceas, geralmente com 13 cm de comprimento por 4 cm de largura. As flores são alvas e perfumadas. O fruto é uma baga elíptica ou elipsóide, com cerca de 2 cm de comprimento por 10 – 15 mm de diâmetro, envolvido por uma cúpula (hipanto) até cerca da metade de sua altura. As sementes possuem 1,2 cm de comprimento por 0,9 cm de largura, cotilédones grossos, superfície quase lisa, encerrando uma pequena plúmula e radícula.

A espécie ocorre na Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica), nas formações Baixo-Montana, Sub-Montana, Montana e Alto-Montana, Floresta Ombrófila Mista (Floresta com

Araucária), Floresta Estacional Semidecidual (Aluvial e Montana) e Decidual, além dos campos rupestres da Serra da Mantiqueira (Carvalho, 1994).

Segundo Salomão et al. (1992), *O. odorifera* ocorre no Brasil, em áreas onde a latitude varia de 8°45' a 31°12' S, e longitude entre 33°52' a 59°09'W (Figura 2), desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Inoue et al. 1984, Carvalho 1994, Lorenzi 1992, Rizzini 1971).



**Figura 2.** Área de ocorrência de *O. odorifera* (Salomão et al. 1992).

Segundo Rizzini (1971), a madeira de *O. odorifera* (Figura 3) apresenta superfície brilhante e lisa, com forte odor. O cerne, que pode chegar a ser quase negro, é moderadamente duro a macio e seca sem rachar, podendo ser utilizada para fabricação de móveis e construção civil, além de embarcações. Segundo Inoue et al. (1984), o uso da madeira foi muito difundido na confecção de peças artesanais, principalmente de garrafas e barricas para armazenamento de cachaça, para a qual transfere o seu odor característico.

As células parenquimáticas da madeira contêm óleo essencial que, além de aumentar seu peso, permite o uso para medicina e perfumaria (Burger e Richter 1991). A exceção do Sul do Brasil onde o óleo essencial encerra safrol (Figura 3 C), nas demais localidades o óleo essencial produzido contém metileugenol (Rizzini 1971), podendo ser extraído do tronco, da casca, folhas e raízes (Carvalho 1994).

Existe uma grande demanda internacional por óleos essenciais contendo safrol, utilizados como matéria-prima para obtenção de piperonal (ou heliotropina) e butóxido de piperonila. O piperonal é usado na indústria de fragrâncias e cosméticos. O butóxido de piperonila atua como agente sinérgico junto ao piretrium, constituindo-se em importante inseticida de origem natural verde e biodegradável, sendo a única formulação autorizada na Europa, Japão e Estados Unidos. É utilizado para controles de pragas no armazenamento, na indústria de processamento de alimentos e em uso doméstico (Maia e Zoghbi 1998). Além disso, pode ser utilizado como combustíveis em naves espaciais (Carvalho 1994).

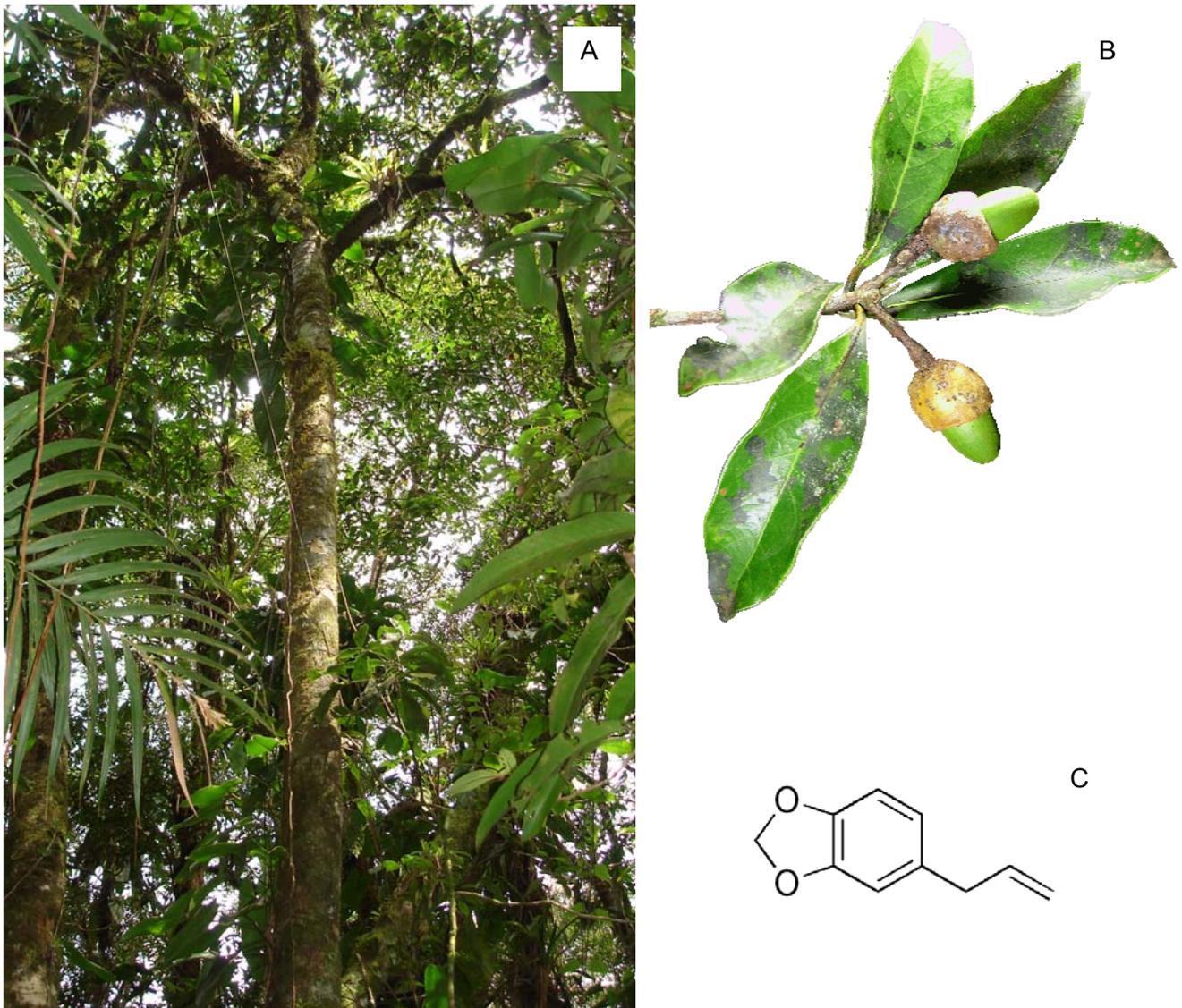
Devido a seu aroma característico, já foi usado como aromatizante de alimentos, porém o seu uso para este fim está proibido devido a sua toxicidade. Como matéria-prima na preparação de fármacos de natureza catecólica (Wermuth 1996), como a dopamina, a dopa, a a-metil dopa, o isoproterenol, entre outros, é o principal fator responsável pelo grande volume de transações comerciais envolvendo o safrol (Costa 2000).

Em busca de tal substância, os indivíduos de *O. Odorifera* foram largamente explorados nas décadas de 40-70, reconhecidamente no Alto Vale do Itajaí (Reitz et al. 1978) tornando o Brasil o maior exportador desta substância, cujo valor no mercado internacional é de US\$ 15,00 o quilo<sup>1</sup>.

Devido à exploração de seus recursos com conseqüente redução dos indivíduos de *O. odorifera* e em seus locais de ocorrência, atualmente a espécie é classificada na categoria de vulnerável, ou seja, corre alto risco de extinção na natureza em médio prazo, de acordo com a Lista de Espécies da Flora ameaçada de extinção (IUCN) (2009).

---

<sup>1</sup> do Amaral WAN, Matos J, Blair C, Morais LR. Projeto Biocomércio – Biotrade – UNCTAD – OCTA. Análise sobre a viabilidade de criação de um Programa de biocomercio regional – Contribuição do Brasil (2006). Piracicaba.



**Figura 3.** Aspecto da planta (A) e (B) ramo de *Ocotea odorifera* com frutos. C) Estrutura molecular do safrol.

Segundo Duarte da Silva et al. (2001) o tempo necessário para a produção das primeiras sementes é variável entre plantas matrizes e entre regiões, contudo, o início do período reprodutivo ocorre, em média, entre os 25 e 40 anos. A quantidade de material seminífero produzido é baixo, em média 2.000 diásporos/ano/planta em matriz de 100 anos de idade.

A formação e o desenvolvimento completo do embrião ocorre num período de aproximadamente 360 dias após a fecundação (Santa-Catarina et al. 2001), um período relativamente longo quando comparado aos embriões de outras angiospermas. Segundo Inoue et al, (1984) a espécie apresenta frutificação irregular, ocorrendo possivelmente em anos alternados, e raramente é abundante, pois no longo período de maturação os frutos caem precocemente. Ao se dispersar, os frutos apresentam alto teor de umidade (51,6%). As sementes perdem a capacidade de germinar após o processo de secagem a 20% de umidade, mesmo quando armazenadas a baixas temperaturas como 5°C ou -18°C (Davide et al. 2003). Esta situação evidencia suas características recalcitrantes. A taxa de germinação é baixa e prejudicada pelo o

frequente ataque de fungos e insetos. Adicionalmente, quando maduras, sofrem oxidação devido ao alto teor de óleo contido na semente (Carvalho 1994).

A dificuldade sementes viáveis associadas à redução das plantas adultas (Carvalho, 1994), alta mortalidade de plântulas (Cetnarski Filho 2003), e o insucesso através da estaquia (Högberg et al. 1998) dificultam a propagação convencional desta espécie.

A embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica no qual uma única célula ou um grupo de células vegetativas são precursores de embriões somáticos (Tautorus et al. 1991, Zimmerman 1993). A seqüência de eventos durante o desenvolvimento assemelham-se aos eventos observados na embriogênese zigótica quanto aos aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares (Hakman 1993, Hvoslef-Eide e Corke 1997, Sghaier et al. 2008).

A produção de embriões somáticos de *O. odorifera* foi realizada com sucesso pela primeira vez por Santa-Catarina et al (2001), a partir de eixos embrionários de embriões zigóticos maduros . Neste trabalho, os autores definem o tempo ideal de maturidade da semente a ser coletada, bem como a formulação de meio de cultura mais eficiente para a indução dos embriões somáticos. Dessa forma, foram capazes de manter um sistema de manutenção desses embriões por embriogênese repetitiva.

No sistema de embriogênese somática, as mudas podem ser produzidas em qualquer período do ano e não apenas no período de produção das matrizes, como é realizado nos métodos convencionais. Genótipos selecionados e/ou melhorados poderiam ser recuperados pelo método da embriogênese somática produzindo em escala massal clones de interesse em programas de melhoramento genético ou de conservação de germoplasma. Entretanto, a utilização destes embriões somáticos é limitada pelo baixo índice de conversão destes embriões em plântulas Santa-Catarina et al. (2001). De forma geral, atribui-se a baixa taxa de germinação de embriões somáticos, como conseqüência de uma falha no processo de maturação, que leva a deficiência no acúmulo de substâncias de reserva, danos durante a desidratação/reidratação, ou ainda uma insuficiente tolerância a desidratação (Moon e Hildebrand, 2003).

*Devido à importância da espécie estudada, seu risco de desaparecer de seu hábitat natural e a dificuldade de propagá-la de forma convencional, tornam-se necessárias medidas alternativas que visem à conservação dos remanescentes. As técnicas da embriogênese somática e da germinação in vitro (conversão dos embriões em plântulas) podem ser utilizadas para a multiplicação e conservação dessa espécie, à semelhança do que se tem verificado com outras lenhosas (Jain & Ishii 1998). Nos últimos anos, grande parte dos avanços obtidos no aperfeiçoamento dos protocolos de embriogênese somática vêm sendo obtido através do maior conhecimento dos aspectos moleculares, fisiológicos e bioquímicos da embriogênese zigótica.*

*Nesse sentido, estudos dos aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação das sementes de *O odorifera* mostram-se úteis não somente para o entendimento da germinação de espécies recalcitrantes, mas também na otimização de protocolos da conversão de embriões somáticos em plântulas. A caracterização da semente madura e o monitoramento do processo germinativo fornecem informações que podem ser utilizadas para tratamentos de células embriogênicas e embriões somáticos, adequando a maturação destes últimos de forma a mimetizar o sistema da semente natural, aumentando a porcentagem de germinação dos embriões somáticos. Estes embriões poderão ser utilizados para programas de recuperação de espécies ameaçadas de extinção com a produção em massa de indivíduos de tais espécies, complementando estudos realizados pelo Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL – IB/USP).*

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Estudo de diferentes aspectos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na germinação de sementes de *O. odorifera*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- a) Avaliação do conteúdo endógeno de ácido indol 3-acético (AIA) e ácido abscísico (ABA) poliaminas (PAs) e aminoácidos durante a germinação das sementes de *O. odorifera*;
- b) Avaliação da dinâmica de mobilização de proteínas durante a germinação de sementes de *O. odorifera*;

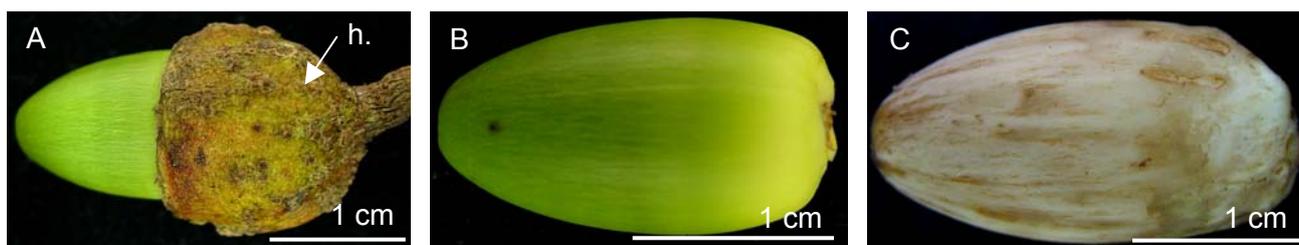
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais vegetais

Foram utilizadas sementes *O. odorifera* obtidas a partir de frutos coletados no Parque Estadual Carlos Botelho em São Miguel Arcanjo (SP), em junho de 2007. A área utilizada para a coleta dos frutos para o presente trabalho está localizado na região sudeste do estado de São Paulo, e ocupa uma área de 37.644, 36 ha. Esta região é uma das maiores e mais bem preservadas manchas remanescentes de Mata Atlântica, sendo um local bastante representativo de ocorrência natural desta espécie.

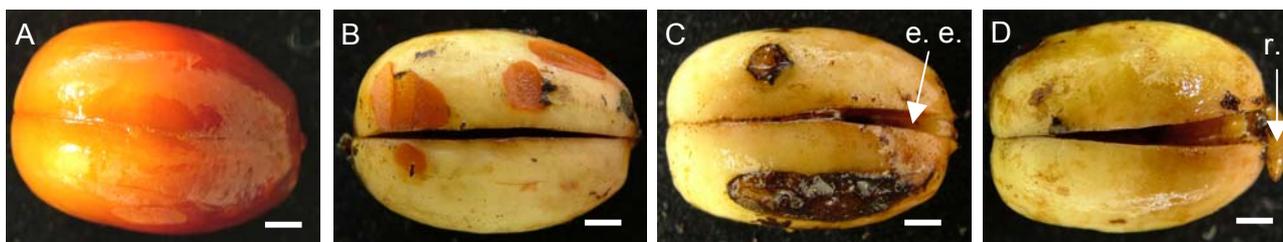
#### 3.2. Germinação das sementes

Os frutos coletados tiveram o hipanto e pericarpo retirados (Figura 4 A e B) As sementes isoladas, e com a testa escarificada (Figura 3C), foram colocadas para germinar em substrato de vermiculita esterilizada. O material foi mantido em sala de germinação em condições fotoperiódicas de 16 h de luz, e temperatura de  $27 \pm 4^\circ \text{C}$ .



**Figura 4.** Aspectos morfológicos dos frutos e sementes de *Ocotea odorifera*: A) fruto com hipanto (h.), B) fruto sem hipanto, C) semente escarificada.

A coleta dos materiais para as análises bioquímicas foram realizadas a cada 15 dias após a semeadura, resultando nos seguintes tratamentos: semente madura (tempo zero), 15, 30 e 45 dias após a semeadura (Figura 5). Observa-se que o eixo embrionário encontra-se intumescido aos 30 dias, e a germinação *sensu stricto* (emergência da radícula), ocorreu aos 45 dias após a semeadura. O material coletado foi lavado com água destilada, congelado em nitrogênio líquido e armazenado à temperatura de  $-80^\circ \text{C}$  para as determinações dos conteúdos endógenos de ABA, AIA, perfis de PAs, aminoácidos e proteínas.



**Figura 5.** Aspectos morfológicos das sementes de *O. odorifera* em diferentes períodos após a sementeira em vermiculita. Semente madura (A), após a sementeira: 15 dias (B), 30 dias, com o eixo embrionário (e. e.) evidente; (C) 45 dias (D) com a radícula (r.) emitida após a sementeira. Barra = 0,1 cm.

### 3.3. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas que envolvemos padrões e conteúdos de PAs, aminoácidos e os conteúdos de ABA e AIA foram realizados nas amostras coletadas conforme descrito no item 2.2.

#### 3.3.1. PAs

A metodologia para a determinação do padrão e conteúdo de PAs livres e conjugadas foi baseada naquela descrita por Silveira et al. (2004b). Amostras de 200 mg de massa fresca (MF) foram maceradas com 1,6 mL de ácido perclórico 5% (v/v), e mantidas no gelo por 1 h. Posteriormente, foram centrifugadas a 20.000 g por 20 min, a 4 °C, obtendo-se o sobrenadante que contém as PAs livres e conjugadas solúveis. As PAs conjugadas foram extraídas destas amostras por hidrólise ácida de 200 µL do sobrenadante em igual volume de HCl 12 N, por 18 h a 110 °C. Em seguida, as amostras foram secas a 40 °C sob jato de nitrogênio e ressuspensas em 200 µL de ácido perclórico 5%.

As PAs livres e conjugadas foram derivatizadas, misturando-se 40 µL da amostra contendo PAs, 100 µL de cloreto de dansil (5 mg.mL<sup>-1</sup> em acetona), 50 µL de solução saturada de carbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e 20 µL de 1,7-diaminoheptano (DAH), utilizado como padrão interno. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min, a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 µL de prolina (100 mg.mL<sup>-1</sup>) com posterior incubação por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, as PAs derivatizadas foram particionadas com 200 µL de tolueno, e a fase apolar (tolueno), que contém as PAs, foi coletada (175 µL), seca sob jato de nitrogênio, e ressuspensa em 175 µL de acetonitrila.

A identificação e quantificação das PAs foram realizadas utilizando-se HPLC, com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Acetonitrila absoluta e acetonitrila 10% em água (pH 3,5 ajustado com HCl 1N) foram utilizadas como solventes. A mudança na proporção de acetonitrila absoluta em relação à acetonitrila 10% definiu o gradiente de corrida. O gradiente de

acetonitrila absoluta foi programado para 65%, durante os primeiros 11 min, de 65 a 100% entre 11 e 25 min, e 100% até 35 min com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 340 nm e emissão de 510 nm. Foram injetados 20 µL da amostra derivatizada com cloreto de dansil. As áreas e tempos de retenção de cada PA foram avaliados por comparação com as PAs com concentrações conhecidas: Put, Spd, Spm e DAH.

### 3.3.2. Aminoácidos

A metodologia para a determinação do padrão e conteúdo de aminoácidos foi baseada naquela descrita por Astarita et al. (2004). Amostras de 200 mg de MF foram maceradas com 6 mL de etanol 80% (v/v) e concentradas em “speed vac” até eliminar o etanol. Os volumes das amostras foram ajustados para 2 mL com água e centrifugadas a 20.000 g, por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de nitrocelulose de 20 µm e em seguida utilizado para determinação dos aminoácidos. Alíquotas de 20 µL do filtrado e 60 µL da solução OPA-borato, utilizadas para a derivatização dos aminoácidos à temperatura ambiente, foram homogeneizadas por 2 min e a seguir analisadas por HPLC.

A identificação e quantificação dos aminoácidos por HPLC foram realizadas utilizando-se uma coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Foram utilizados como solventes metanol 65% e uma solução de acetato de sódio 50 mM, fosfato de sódio 50 mM, metanol (20 mL.L<sup>-1</sup>) e tetrahidrofurano (20 mL.L<sup>-1</sup>), com pH 8,6 ajustado com ácido acético glacial. A mudança na proporção de metanol 65% em relação ao outro solvente definiu o gradiente de corrida, sendo o gradiente de metanol 65% programado para 15% durante os primeiros 34 min, de 15 a 35% entre 34 e 55 min, de 35 a 85% entre 55 e 75 min, de 85 a 100% entre 75 e 85 min e 100% até 100 min, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, a 40° C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 250 nm e emissão de 480 nm. Foram injetados 20 µL da solução derivatizada com OPA. As áreas e tempos de retenção de cada aminoácido foram avaliados por comparação com aminoácidos padrão em concentrações conhecidas: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), glutamina (Gln), histidina (His), glicina (Gly), arginina (Arg), treonina (Tre), alanina (Ala), ácido γ-aminobutírico (Gaba), tirosina (Tir), metionina (Met), triptofano (Trp), valina (Val), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu), ornitina (Orn) e lisina (Lis).

### 3.3.3. AIA e ABA

A metodologia para a extração e dosagem de AIA e ABA foi baseada naquela descrita por Silveira et al. (2004a). Amostras de 1g de matéria fresca (MF) foram maceradas com tampão de extração (etanol 80% contendo 1% polivinipirrolidona-40) e o [<sup>3</sup>H]AIA e [<sup>3</sup>H]ABA radioativos foram utilizados como padrão interno para a determinação do rendimento do processo. O extrato foi agitado por 90 min, no escuro a 4°C, e centrifugado a 15.500 g por 15 min, a 4 °C. O

sobrenadante foi concentrado em *speed vac* a 45 °C, até atingir 20% do volume inicial ( $\leq 1,0$  mL). O volume da amostra foi ajustado para 3 mL (v/v) com água tipo MilliQ, e o pH foi ajustado para 2,5 com a adição de HCl (1N). As amostras foram particionadas duas vezes, usando-se éter etílico como solvente orgânico. A fase orgânica, contendo o AIA e o ABA, foi coletada e seca em "speed vac", a 45 °C. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de metanol 100% e transferidas para tubos plásticos e armazenadas a -80° C, para análises posteriores em HPLC.

A quantificação do AIA e ABA foi realizada por HPLC em fase reversa, com coluna C18 (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Foram utilizados como solventes, metanol 100% e uma solução de água-metanol 10% e ácido acético 0,5%. A mudança na proporção de metanol em relação ao outro solvente definiu o gradiente de corrida, sendo o gradiente de metanol 100% ajustado para aumentar de 20% a 30% durante os primeiros 10 min, de 30 a 45% entre 10 e 22 min, de 45 a 54% entre 22 e 33 min, de 54 a 100% entre 33 e 34 min e 100% até 60 min, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, a 40 °C. Para a detecção do AIA, o detector de fluorescência foi ajustado para excitação em 280 nm, e emissão em 350 nm. Para a detecção do ABA, o detector de UV foi ajustado em 254 nm. Foram injetados 40  $\mu$ L de cada amostra. Frações contendo AIA e ABA foram coletadas e analisadas por cintilação líquida (Packard® Tri-carb 2100 TR) para a estimativa de perdas. As áreas e tempos de retenção do AIA e do ABA foram avaliadas por comparação com concentrações conhecidas destes hormônios.

### 3.3.4. Proteínas

#### 3.3.4.1. Extração

A metodologia utilizada para a extração foi baseada naquela descrita por Natarajan et al. (2005), utilizando-se o tampão uréia:tiouréia. As amostras foram ressuspensas em 1 mL de tampão de extração Ureia/Tiouréia (7/2). O tampão consistiu de 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 1% de dithiothreitol (DTT), 2% de triton 100, 0,5% de Pharmalyte® (GE Healthcare®), 1 mM de fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) e 5  $\mu$ M de pepstatina. O material foi vortexado por 15 min e posteriormente centrifugado por 5 min a 12000 g a 4°C.

Visando a eliminação de interferentes, os extratos protéicos foram precipitados com TCA (ácido tricloro-acético)10% de acordo com Silveira et al. (2008). Foram adicionados 0,111 mL de TCA 100% (p/v) em 1,0 mL de extrato protéico para atingir a concentração final de TCA 10% (v/v). Após a incubação por 30 min a -4 °C, a amostra foi centrifugada por 10 min a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de proteína foi lavado três vezes com acetona gelada intercaladas por centrifugações de 5 min a 12.000 g. Em seguida o *pellet* foi ressuspensado em 1 mL de tampão de extração uréia: tiouréia e foi vortexado durante 5 min, a 4 °C.

O sobrenadante, contendo a fração protéica, foi coletado e armazenado a -20 °C até a quantificação de proteínas e preparação dos géis bidimensionais.

### 3.3.4.2. Determinação de conteúdo

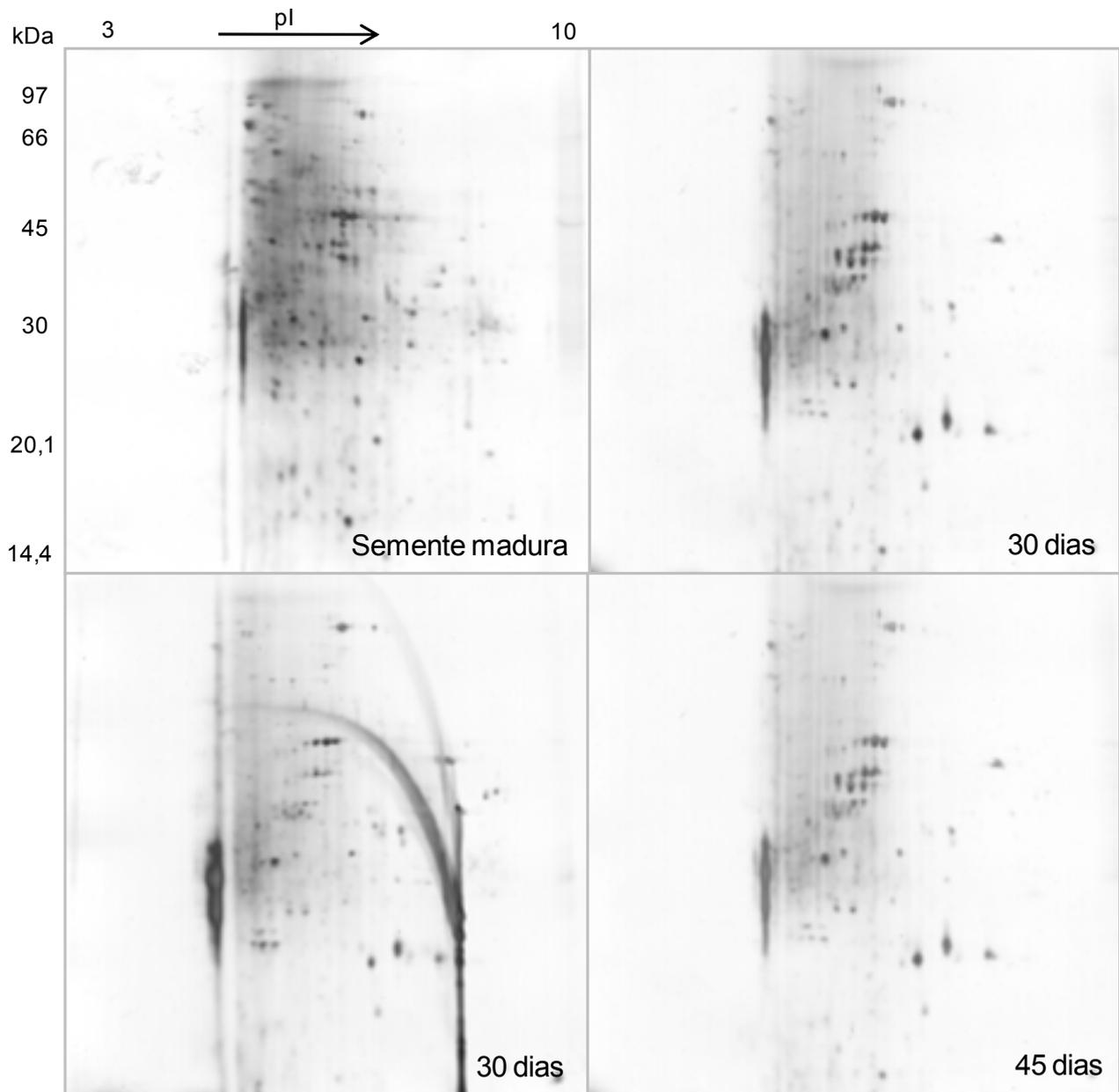
A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método do 2D-Quanti Kit (GE-Healthcare<sup>®</sup>) usando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Balbuena et al. 2009).

### 3.3.4.3. Eletroforese bidimensional (2-DE)

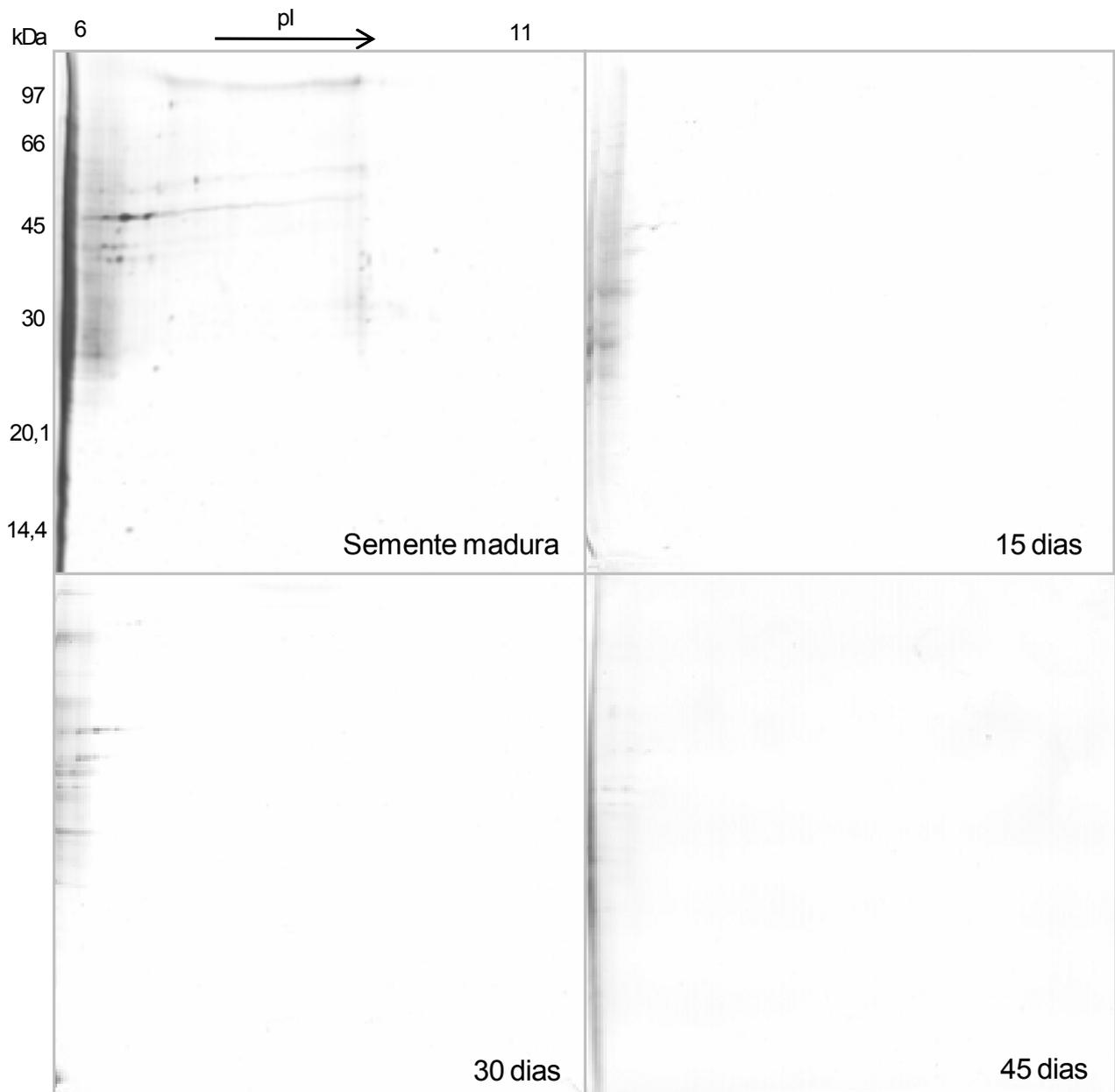
Os géis 2-DE foram feitos em triplicata biológica para cada estágio. A princípio, para a definição da faixa de pH mais adequada para a análise das proteínas, duas faixas foram utilizadas, a de pH 3-10 e pH 6-11. Para tanto, o volume de extrato contendo as 40 µg de proteínas foi completado para 375 µL de solução para 2-DE com tampão de amostra 2-DE (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 2% CHAPS, 0,5% IPG Buffer (pH 3-11, pH 4-7 e pH 6-11, de acordo com o IPG utilizado), 1% de DTT, 0,002% de azul de bromofenol). A reidratação e carregamento da amostra na tira de gel gradiente imobilizado de pH (IPG) foram realizados simultaneamente, com a aplicação direta das amostras solubilizadas no tampão 2-DE sob a tira de gel IPG (Balbuena et al., 2009). Foram utilizados IPG de 18 cm com faixa linear de separação de pH 3-10, e pH 6-11. Após 12 h de reidratação, foi iniciada a focalização isoeletrica (IEF) em uma unidade IPGPhor (GE-Healthcare<sup>®</sup>), em condições de corrida específicas ao IPG utilizado. Antes de iniciar a segunda dimensão, as tiras de gel IPG foram reduzidas com solução de equilíbrio (50 mM Tris-HCl, 6M de uréia, 30% de glicerol, 2% de SDS, 0,002% de azul de bromofenol) adicionado de 125 mM de DTT e alquiladas (solução de equilíbrio adicionada de 125 mM de iodoacetamida). Na segunda dimensão, as tiras de gel foram dispostas horizontalmente na extremidade superior do gel de poliacrilamida 12%, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A separação eletroforética foi conduzida com corrente constante de 25 mA por gel em um sistema vertical Protean II (Bio-Rad<sup>®</sup>), conectado a um sistema de resfriamento a 15 °C em MultitempII (GE-Healthcare<sup>®</sup>). Foi utilizado um padrão de peso molecular (Bio-Rad<sup>®</sup>) com 6 bandas de proteína entre 14 e 97 kDa (Balbuena et al. 2009).

As proteínas foram visualizadas pela coloração com prata. Os géis foram fixados *overnight*, em solução de fixação contendo 50% de metanol, 12% de ácido acético e 0,05% de formaldeído. Após duas lavagens de 30 min em solução de 50% de etanol, os géis foram incubados por 2 min em solução de tiosulfato de sódio (0,02%) e na seqüência foram lavados três vezes em água. Em seguida os géis foram incubados por 20 min em solução 0,2% de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) e 0,075% de formaldeído e na seqüência foram lavados três vezes em água. A revelação foi realizada com a incubação dos géis em solução 6% de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), 0,16% de tiosulfato de sódio e 0,05% de formaldeído. Após a visualização dos polipeptídeos (*spots*), a reação de revelação foi interrompida com a incubação dos géis na solução de fixação descrita acima, e armazenados em solução 1% de ácido acético até a análise de imagens (Balbuena et al. 2009).

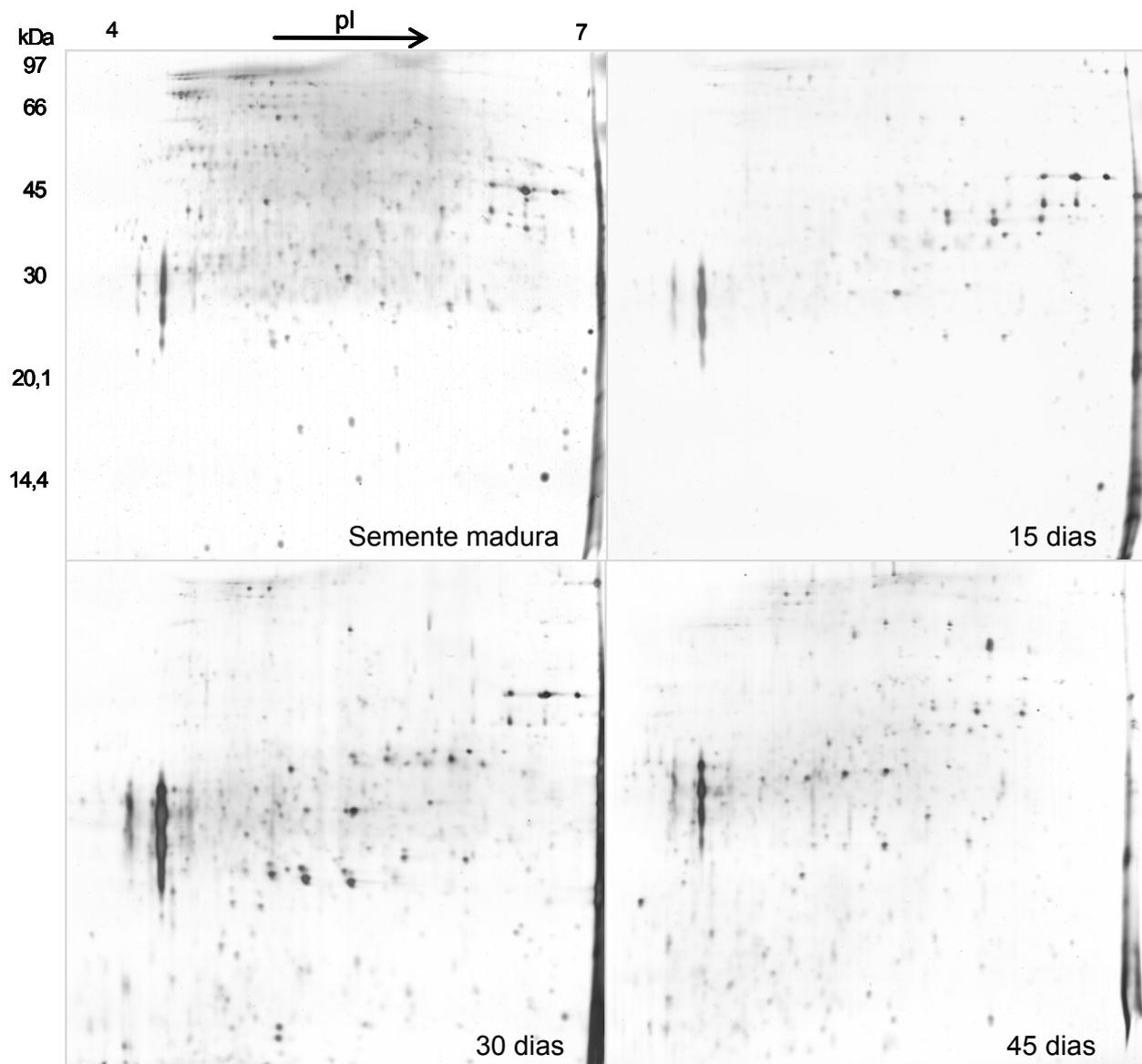
Devido a concentração de proteínas na faixa de pH 4-7 e a ausência das mesmas na faixa de pH 6-11 (Figuras 6 e 7), optou-se por realizar os géis em faixa de pH 4-7 (Figura 8). Dessa forma, foi obtida uma melhor resolução dos spots, como pode ser observado nas figuras 16 e 17, importante para o isolamento dos mesmos para futuras identificações em espectrometria de massas.



**Figura 6.** Géis 2-D representativos de *O. odorifera*, corados em prata, em gradiente de pH 3-10, a partir de 40 µg de proteínas, na semente madura e aos 15, 30 e 45 dias após semeadura.



**Figura 7.** Géis 2-D representativos de *O. odorifera*, corados em prata, em gradiente de pH 4-7, a partir de 40 µg de proteínas, na semente madura e após 15, 30 e 45 dias de semeadura.



**Figura 8.** Géis 2-D representativos de *O. odorifera*, corados em prata, em gradiente de pH 4-7, a partir de 40 µg de proteínas, na semente madura e após 15, 30 e 45 dias de semeadura.

#### 3.3.4.4. Análise de imagens

Os géis corados de pH 4-7 foram digitalizados e analisados no programa Image Master Platinum (Amersham Biosciences®). A autenticidade e o contorno de cada *spot* de proteína foram validados por inspeção visual, sendo removidos ou adicionados quando não detectados automaticamente. (Balbuena et al. 2009). O gel de cada estágio que apresentou maior número de spots foi selecionado como referência na análise comparativa. A alta fidelidade dos *spots* de cada estágio (correlação = 0,95), considerando a % de volume dos mesmos, permitiu a análise da expressão diferencial de proteínas. Assim, além o número de *spots* por estágio, forma analisados

a expressão diferencial de proteínas, baseada no volume médio dos *spots* e a distribuição diferencial das proteínas, de acordo com o peso molecular e ponto isoelétrico.

#### **3.4. Amostragem e análise estatística**

Todos os dados utilizados nos resultados foram obtidos em triplicata. Como estatística, os dados foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e ao Teste de Separação de Médias de Tukey ( $P < 0,05$ ). Os cálculos foram realizados com o auxílio do software estatístico Bioestat 5.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Aminoácidos

O conteúdo de aminoácidos livres nas sementes de *O. odorifera* ao longo do processo germinativo pode ser observado na tabela 1. Observou-se que:

a) na semente madura de *O. odorifera* foram identificadas os aminoácidos ácido aspártico, asparagina, glutamina, glutamato, e histidina em maior proporção em relação aos demais aminoácidos;

b) durante o processo germinativo, a proporção dos diferentes aminoácidos foi variável de acordo com o estágio observado.

**Tabela 1.** Aminoácidos livres ( $\mu\text{g/g}$  de MF  $\pm$  DP) na semente madura de *O. Odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura.

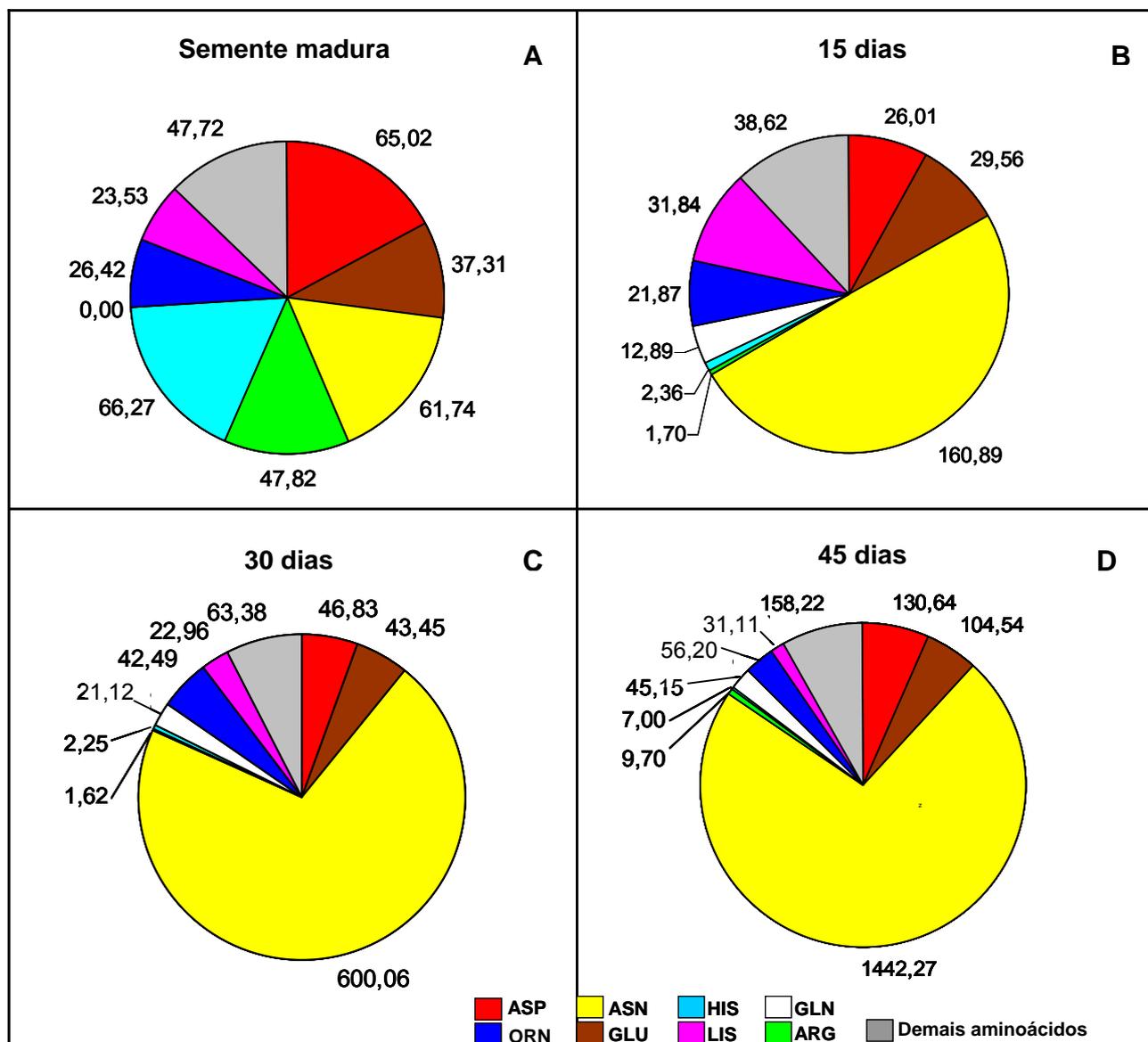
Aminoácido				
ASP	65,02 $\pm$ 8.74	26,01 $\pm$ 0.94	46,83 $\pm$ 11.70	130,64 $\pm$ 13.08
GLU	37,31 $\pm$ 3.50	29,56 $\pm$ 1.07	43,45 $\pm$ 0.45	104,54 $\pm$ 14.31
ASN	<b>61,74 <math>\pm</math> 11.49</b>	<b>160,89 <math>\pm</math> 13.14</b>	<b>600,06 <math>\pm</math> 51.03</b>	<b>2115,2 <math>\pm</math> 120.13</b>
SER	7,66 $\pm$ 1.25	6,25 $\pm$ 0.57	14,22 $\pm$ 3.19	48,98 $\pm$ 6.27
GLN	47,82 $\pm$ 5.65	1,70 $\pm$ 0.30	1,62 $\pm$ 1.44	7,00 $\pm$ 3.86
HIS	66,27 $\pm$ 7.83	2,36 $\pm$ 0.42	2,25 $\pm$ 2.00	9,70 $\pm$ 5.34
GLY	0.00	1,06 $\pm$ 1.37	7,50 $\pm$ 1.43	11,82 $\pm$ 2.26
ARG	0.00	12,89 $\pm$ 0.42	21,12 $\pm$ 3.44	58,77 $\pm$ 10.76
TRE	2,57 $\pm$ 0.93	2,54 $\pm$ 0.77	7,00 $\pm$ 1.84	28,56 $\pm$ 0.46
ALA	11,73 $\pm$ 1.99	4,29 $\pm$ 0.52	4,88 $\pm$ 1.35	10,16 $\pm$ 0.67
GABA	2,76 $\pm$ 0.92	2,24 $\pm$ 0.74	3,75 $\pm$ 0.68	19,73 $\pm$ 5.88
TIR	1,99 $\pm$ 0.27	3,18 $\pm$ 0.63	2,77 $\pm$ 0.43	9,33 $\pm$ 1.68
TRP	1,99 $\pm$ 0.37	0.00	2,38 $\pm$ 0.91	5,16 $\pm$ 0.07
MET	2,24 $\pm$ 0.13	1,73 $\pm$ 0.29	3,74 $\pm$ 1.07	5,75 $\pm$ 0.81
VAL	4,40 $\pm$ 0.98	5,32 $\pm$ 0.36	7,83 $\pm$ 1.73	26,69 $\pm$ 3.78
PHE	1,50 $\pm$ 0.33	3,52 $\pm$ 1.10	2,44 $\pm$ 0.76	8,81 $\pm$ 3.60
ILE	2,20 $\pm$ 0.46	2,83 $\pm$ 0.35	3,25 $\pm$ 0.21	10,20 $\pm$ 1.44
LEU	2,69 $\pm$ 0.52	4,93 $\pm$ 0.75	4,42 $\pm$ 0.20	11,98 $\pm$ 2.00
ORN	26,42 $\pm$ 10.59	21,87 $\pm$ 2.87	42,49 $\pm$ 8.88	68,73 $\pm$ 4.59
LIS	23,53 $\pm$ 5.64	24,90 $\pm$ 1.22	26,21 $\pm$ 4.48	31,11 $\pm$ 7.00
CIT	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Total</b>	<b>369,84 <math>\pm</math> 39.25</b>	<b>318,05 <math>\pm</math> 11.47</b>	<b>848,20 <math>\pm</math> 64.41</b>	<b>2722,9 <math>\pm</math> 71.83</b>

MF = massa fresca, DP = desvio padrão (triplicata)

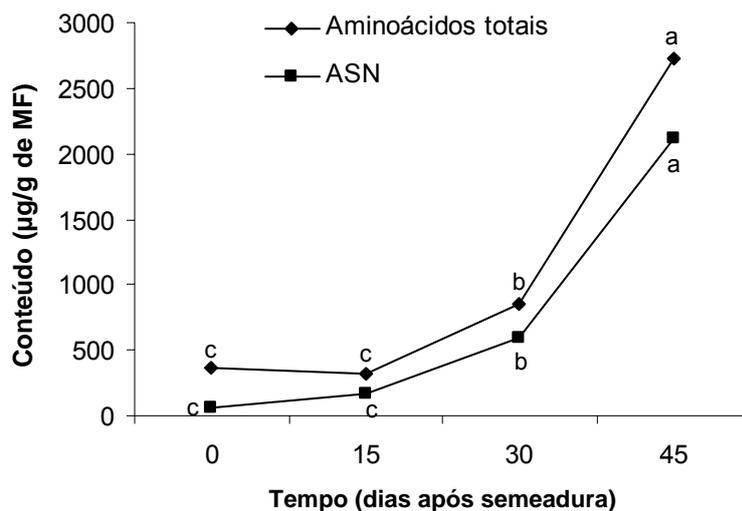
c) dentre os vários aminoácidos, a asparagina foi aquele que apresentou maior incremento, tanto em valor absoluto quanto em proporção (Figura 9). Este aminoácido foi predominante

durante todo o processo germinativo e, o principal responsável pelo aumento do conteúdo total dos aminoácidos livres;

d) o conteúdo total de aminoácidos livres e o de asparagina apresentaram um mesmo padrão de variação, com aumento a partir dos 30 dias de semeadura (Figura 10).



**Figura 9.** Conteúdo de aminoácidos ( $\mu\text{g/g}$  de MF), na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. MF = massa fresca.



**Figura 10.** Conteúdo de aminoácidos livres totais e de asparagina (ASN) na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 de semeadura. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.

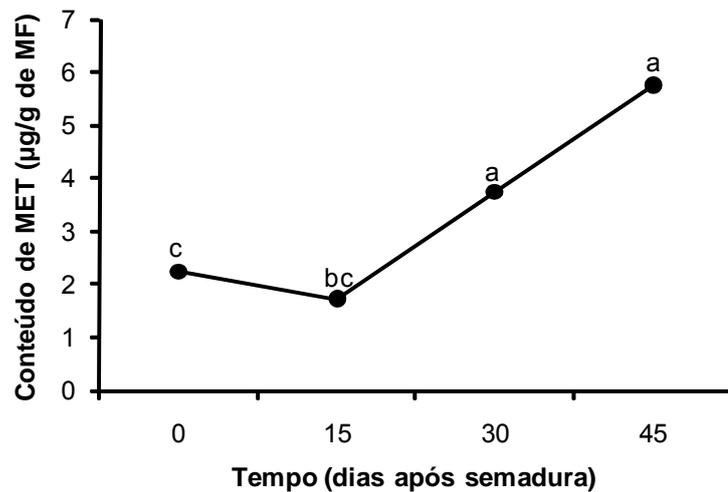
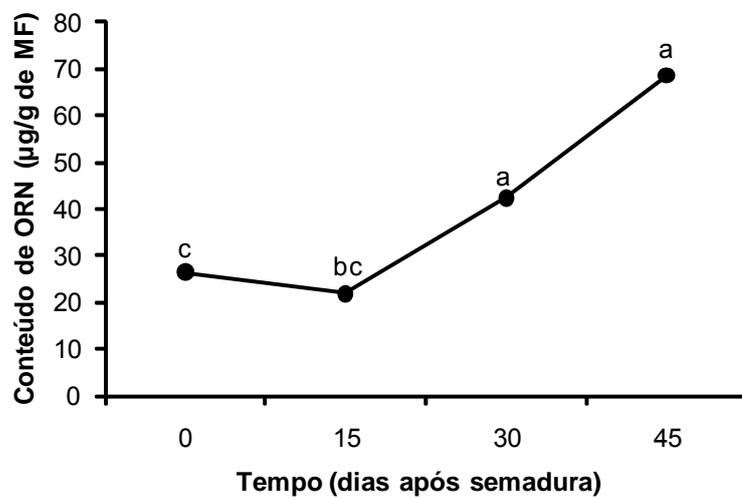
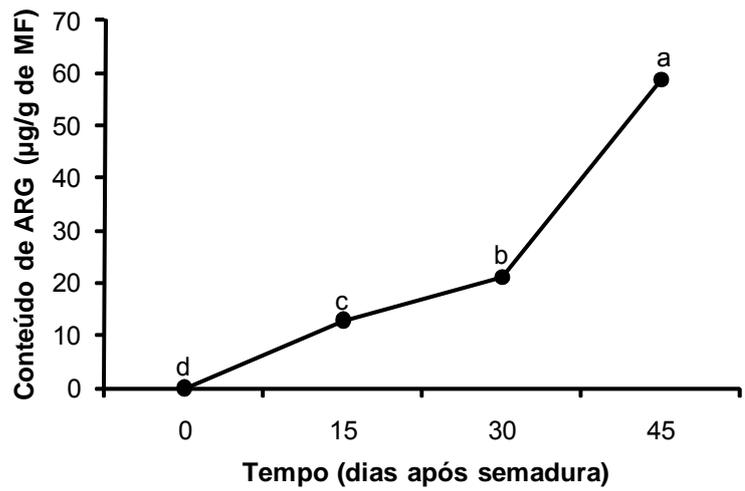
e) a lisina foi o único aminoácido que permaneceu constante ao longo de todo o processo;

f) a glutamina e a histidina apresentam padrões similares de variação, com redução de seus conteúdos nos primeiros quinze dias após a semeadura (Figura 10);

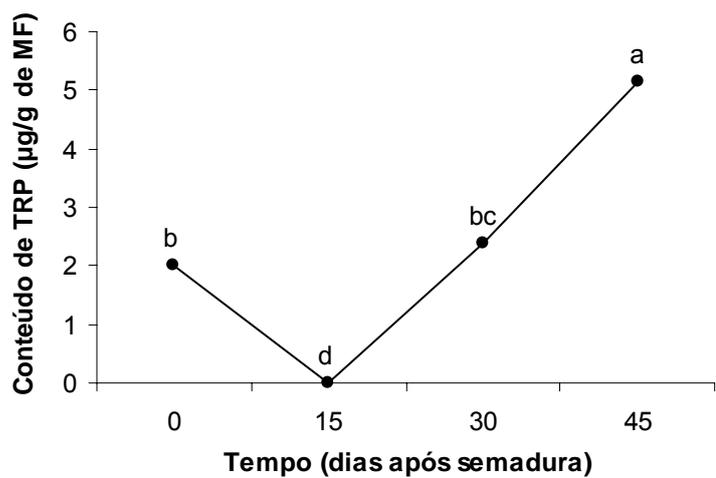
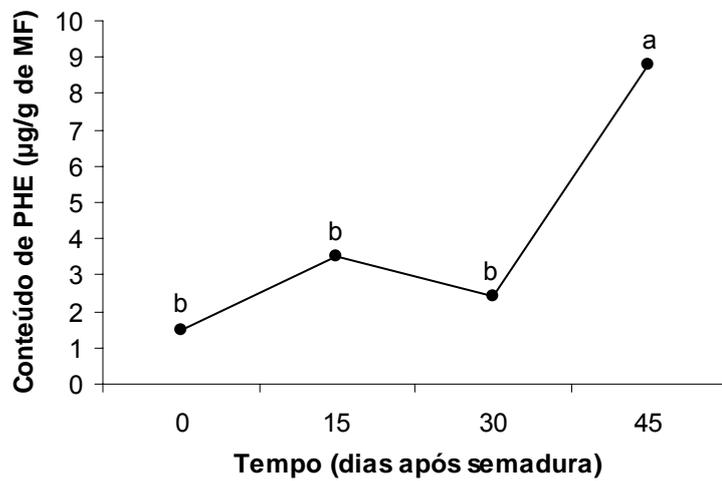
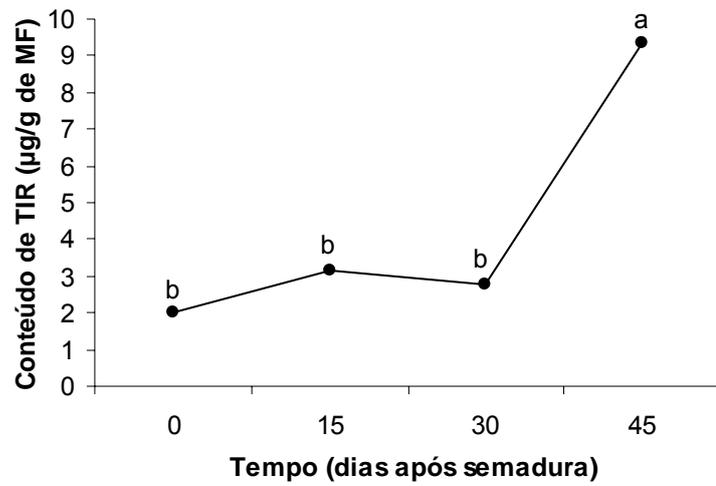
g) a ornitina e metionina, participantes da via das PAs, apresentam comportamento semelhante durante todo o período analisado. Ocorrem em aumento a partir dos 30 primeiros dias de semeadura quando comparados com seu próprio conteúdo aos 15 dias e aumento significativo aos 45 dias de semeadura quando comparados à semente madura (Figura 11);

h) arginina, também envolvido na síntese de PAs, aumento significativo durante todo o processo comparado à semente madura (Figura 11);

i) a fenilalanina (PHE) e a tirosina (TIR), aminoácidos aromáticos, mantiveram-se estáveis nos primeiros 30 dias analisados e aumento de conteúdo aos 45 dias. O triptofano, também aromático e precursor do AIA, sofreu decréscimo aos 15 dias e subsequente acréscimo ao longo do restante do período analisado (Figura 12).



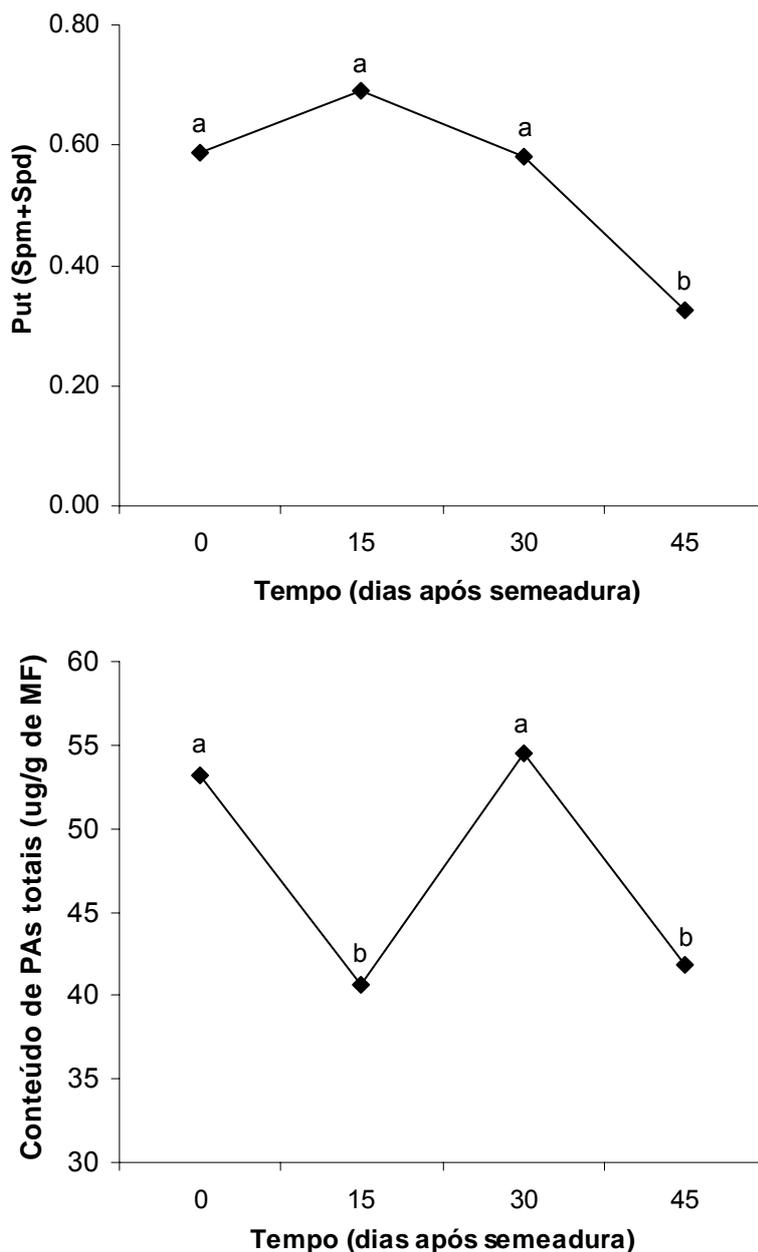
**Figura 11.** Conteúdo dos aminoácidos livres ( $\mu\text{g/g}$  de MF  $\pm$  DV), participantes da via de biossíntese de poliaminas ornitina (ORN), arginina (ARG) e metionina (MET) na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.



**Figura 12.** Conteúdo dos aminoácidos aromáticos livres ( $\mu\text{g/g}$  de MF  $\pm$  DV) (TIR) tirosina (PHE) fenilalanina (TRP) triptofano na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semadura. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.

### 2.5.3. Poliaminas

Com relação, ao conteúdo das PAs totais (livres + conjugadas), na semente madura, verificou-se uma redução após 15 dias de semeadura, seguido de aumento após 30 dias, e novamente uma redução após 45 dias, quando do aparecimento da radícula. A relação entre a putrescina (Put) e a soma de espermina (Spm) e espermidina (Spd), que apresentou um decréscimo, após 45 dias em relação à semente madura (Figura 13).



**Figura 13.** Conteúdo de poliaminas (PAs) totais (livres + conjugadas) ( $\mu\text{g/g}$  de MF  $\pm$  DV) e relação Put (Spm+Spd), na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.

Em relação ao conteúdo de PAs livres (Figura 14), em relação às sementes maduras, destaca-se ( $p < 0,05$ ):

a) o conteúdo de PAs livres totais aumentou após 30 dias, decrescendo após 45 dias de semeadura;

b) a Spm foi a PA mais abundante nas etapas finais do processo germinativo, aos 30 e 45 dias. Seu padrão de variação foi similar ao observado para as PAs livres;

c) A Put manteve-se estável durante os primeiros 30 dias, decrescendo após 45 dias;

d) A Spd manteve-se estável durante todo o processo, e foi a PA menos abundante nos primeiros 30 dias;

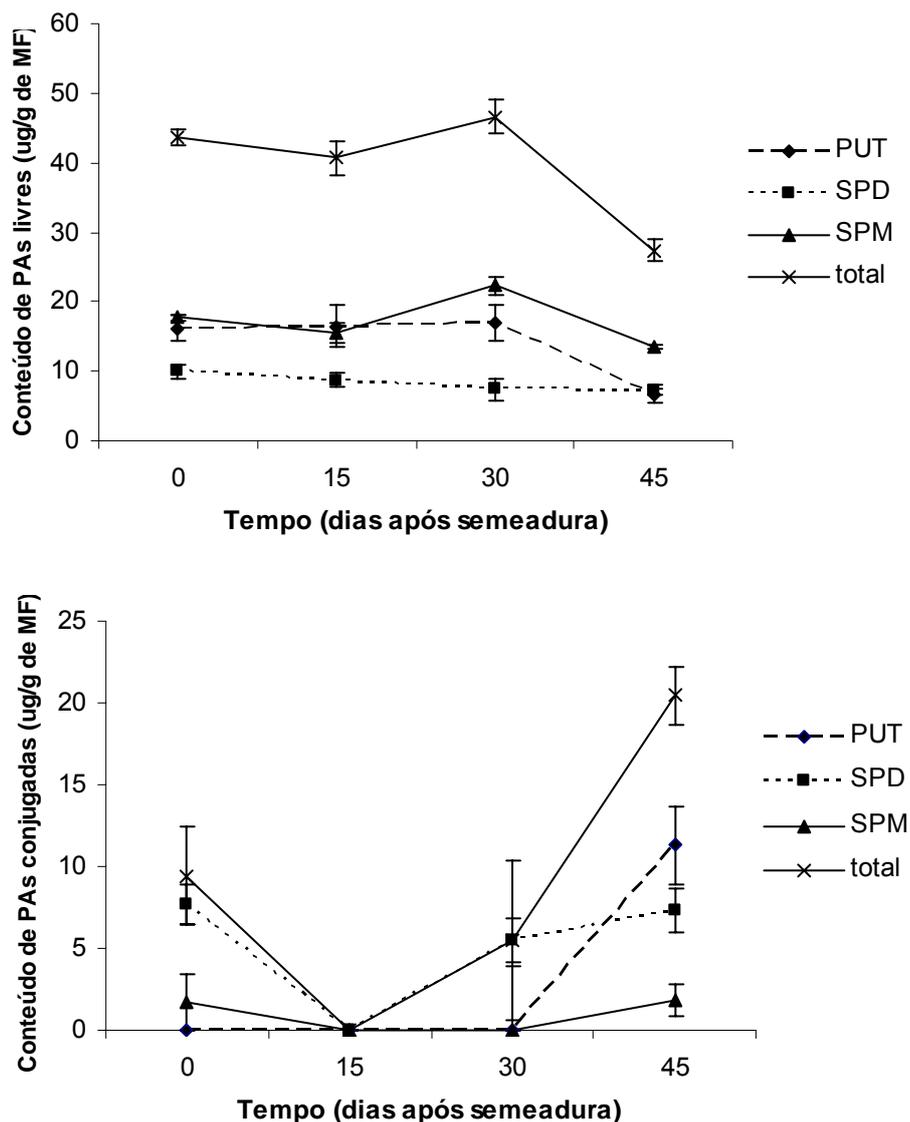
Com relação ao conteúdo das PAs conjugadas (Figura 14), observou-se que:

a) As PAs conjugadas totais apresentaram queda após 15 dias, mantendo-se estável até os 30 dias, e seguida de aumento após 45 dias;

b) A Put manteve-se estável até os 30 dias, aumentando após 45 dias;

c) A Spm foi a PA conjugada menos abundante ao longo de todo o processo. Apresentou queda após 15 dias, mantendo-se estável até os 30 dias, aumentando aos 45 dias após a semeadura;

d) A Spd decresceu aos 15 dias e aumentou aos 30 dias, com tendência à estabilização no restante do processo.



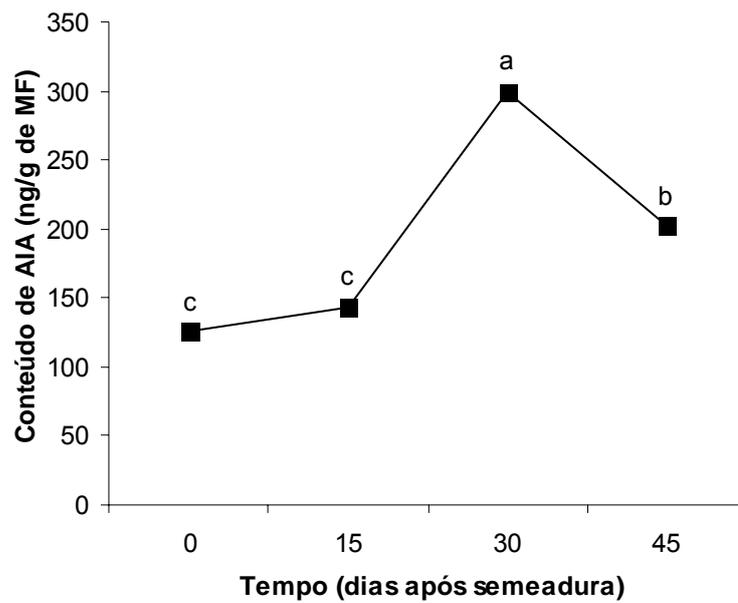
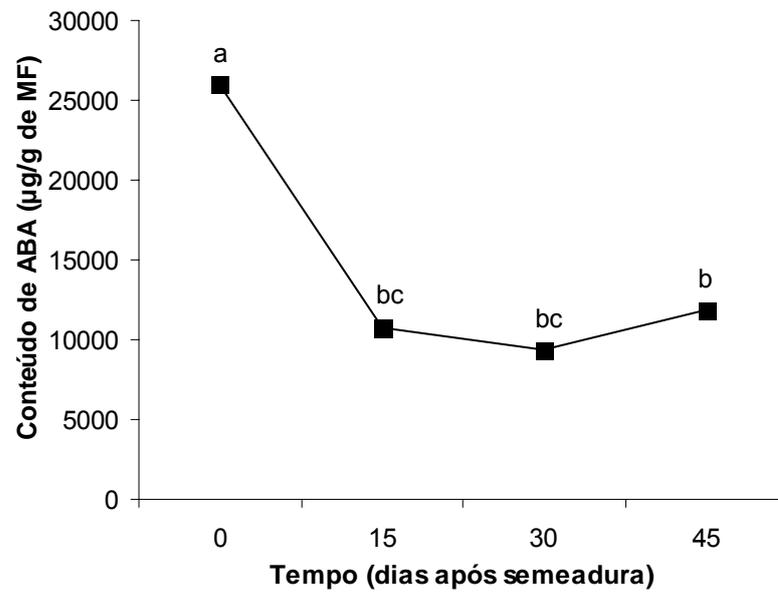
**Figura 14.** Poliaminas (PAs) livres e conjugadas ( $\mu\text{g/g}$  de MF  $\pm$  DV) na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. Put = putrescina, Spd = espermidina, Spm = espermina.

#### 2.5.4. AIA e ABA

Em relação aos reguladores vegetais, AIA e ABA, foi observado (Figura 15):

a) o conteúdo de ABA apresentou redução após 15 dias, mantendo-se estável até os 45 dias, quando apresentou aumento em relação aos 15 e 30 dias;

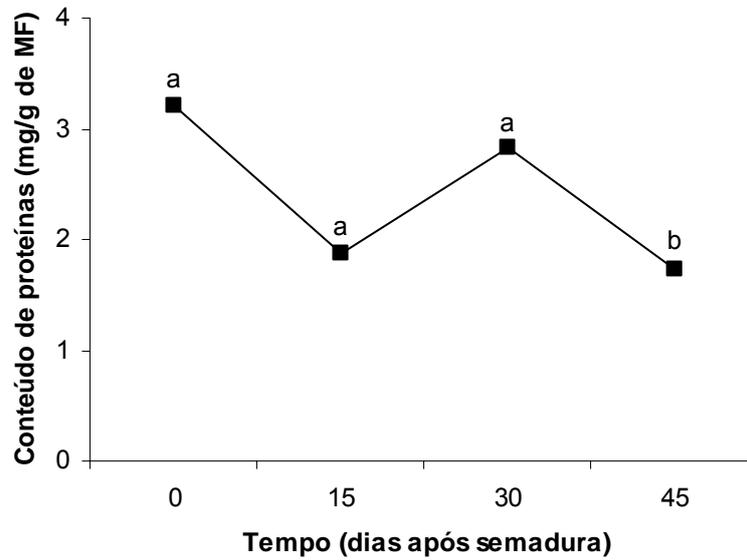
b) inversamente ao discutido para o ABA, o conteúdo de AIA aumentou durante os primeiros 30 dias, com uma redução após este período. Entretanto, o valor final, após 45 dias, é superior ao observado na semente madura e após 15 dias.



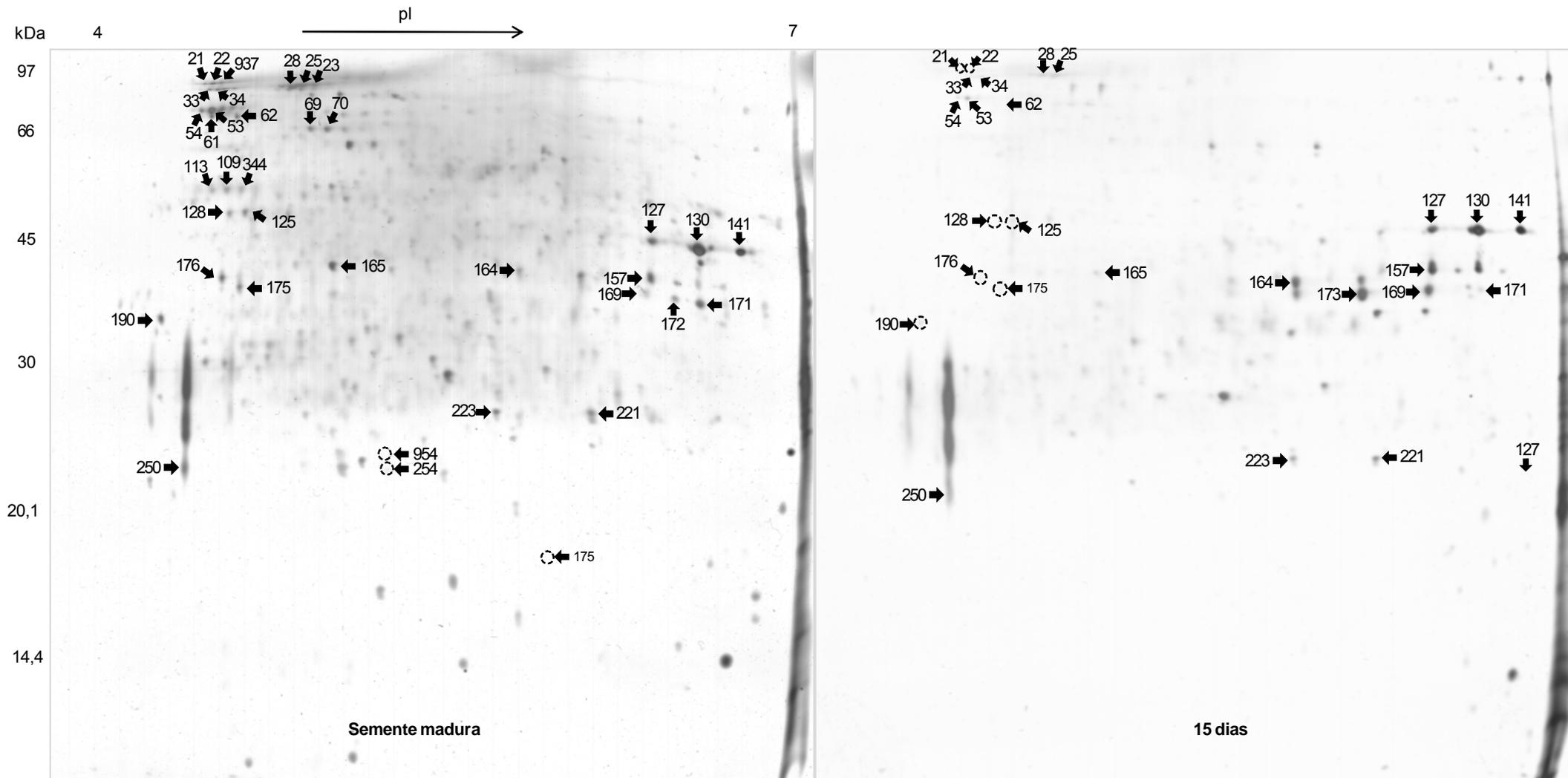
**Figura 15.** Conteúdos ( $\mu\text{g/g}$  ou  $\text{ng/g}$  de MF  $\pm$  DV) de ácido indol-3-acético (AIA) e ácido abscísico (ABA) na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30, e 45 dias de sementeira. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.

## 2.6. Proteínas

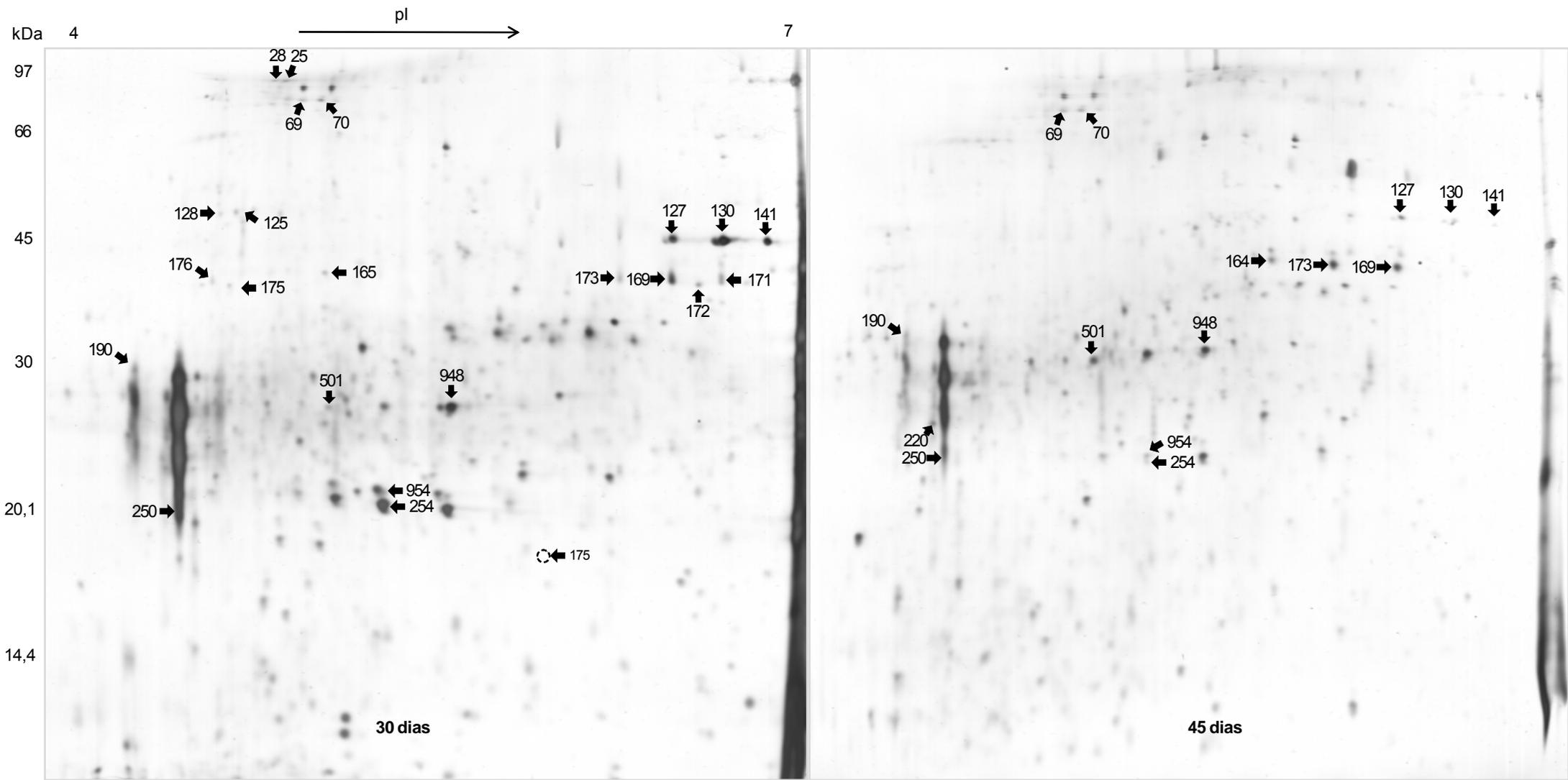
No presente trabalho, o conteúdo de proteínas totais decresceu aos 45 dias em relação às sementes maduras (Figura 16).



**Figura 16.** Conteúdo proteínas totais (mg/g de MF  $\pm$  DV) na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. Letras iguais representam ausência de diferenças estatísticas.



**Figura 17.** Géis 2-DE representativos de *O. odorifera*, corados em prata, em gradiente de pH 4-7, a partir de 40  $\mu$ g de proteínas, na semente madura e após 15 dias de semeadura.

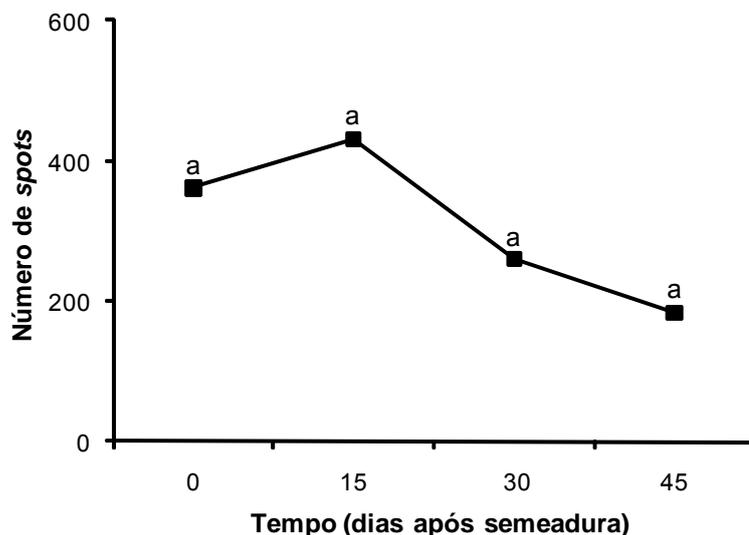


**Figura 18.** Géis 2-DE representativos de *O. odorifera*, corados em prata, em gradiente de pH 4-7, a partir de 40 µg de proteínas após 30 e 45 dias de semeadura.

A partir da análise dos géis de gradiente de pH 4 a 7 (Figuras 17 e 18), pode-se concluir que:

a) o número de spots não variou de forma significativa ao longo do processo germinativo (Figura 19)

b) 455 spots foram identificados no gel representativo da semente madura, sendo apenas 36 exclusivos deste estágio e nenhum destes apresentando alta abundância;



**Figura 19.** Número de spots na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura. As letras iguais representam ausência de diferenças estatísticas.

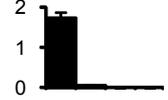
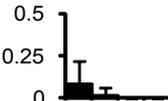
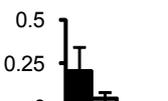
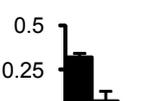
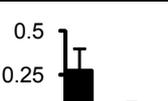
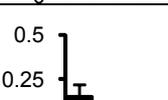
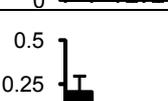
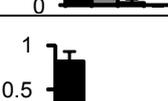
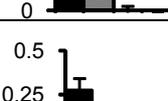
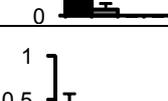
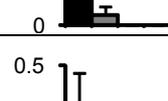
Diante desses resultados, foi realizado o teste ANOVA em todos os spots considerados candidatos a marcadores do processo germinativo de *O. odorifera*, sendo escolhidos 39 spots (Tabela 2), sendo:

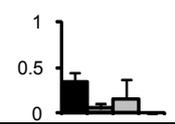
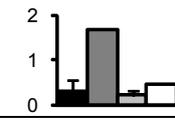
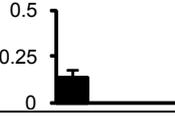
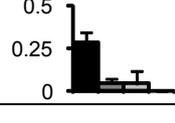
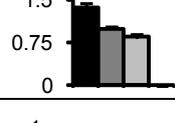
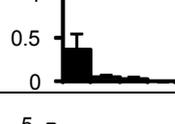
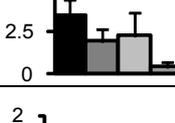
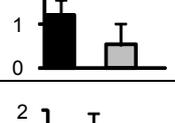
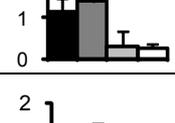
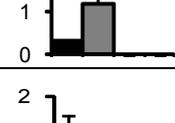
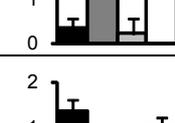
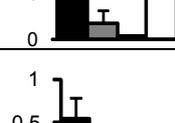
a) 26 apresentaram redução de abundância (% de volume) ao longo do período analisado, sendo 11 deles estavam presentes apenas até os 30 dias de semeadura e 1 exclusivo da semente madura;

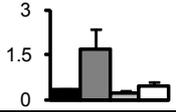
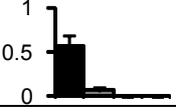
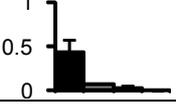
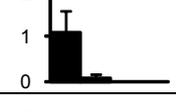
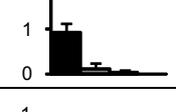
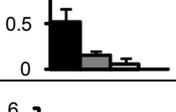
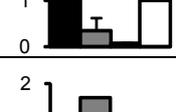
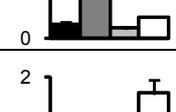
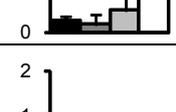
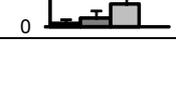
b) 2 aumentaram durante o processo germinativo, sendo um deles ausente na semente madura;

c) 10 sofreram tanto redução quanto aumento de abundância ao longo do processo germinativo.

**Tabela 2.** Proteínas com variação de abundância na semente madura de *O. odorifera* e após 15, 30 e 45 dias de semeadura.

Identificação do spot	Ponto isoelétrico (pI)	Massa molecular (kDa)	Abundância (% Volume)
21	4.76	94	
22	4.73	94	
23	5.18	94	
25	5.12	93	
28	5,07	91	
33	4,74	89	
34	4,78	89	
53	4,75	75	
54	4,71	75	
58	4,80	73	
61	4.75	71	
62	4,86	71	
69	5,16	66	

70	5,23	66	
109	4,82	52	
113	4,76	52	
125	4,90	48	
127	6,51	47	
128	4,84	48	
130	6,70	47	
141	6,85	47	
157	6,51	42	
164	6,00	41	
165	5,27	41	
169	6,49	41	
171	6,70	40	
172	6,60	40	

173	6,25	40	
175	4,82	40	
176	4,89	39	
190	4,59	36	
221	6,28	29	
223	5,93	29	
250	4,71	25	
254	5,50	24	
344	5,05	63	
501	5,50	31	
937	4,79	95	
948	5,93	31	
954	5,49	25	

## 5. DISCUSSÃO

Os aminoácidos constituem parte fundamental no metabolismo do nitrogênio, representando o produto inicial da assimilação primária deste composto (Ortiz-Lopez et al. 2000). Durante o desenvolvimento da semente, os aminoácidos são armazenados na forma de proteínas, sendo a sua taxa de síntese controlada, principalmente, pela disponibilidade dos aminoácidos: ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico e asparagina, ou pela taxa de conversão destes em outros aminoácidos nos tecidos de reserva (Bewley e Black 1994, Silveira et al. 2004b, Santa-Catarina et al. 2006). Além da síntese de proteínas, os aminoácidos estão relacionados com diferentes processos do metabolismo primário e secundário nos vegetais, atuando direta e/ou indiretamente nos vários aspectos ligados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Corruzi e Last et al. 2000).

No presente trabalho, os aminoácidos identificados em maior quantidade na semente madura foram: aspartato, asparagina, glutamina e glutamato (Tabela 1), conhecidos como transportadores de nitrogênio nas plantas (Oliveira et al. 2001).

O nitrogênio (N), assimilado na forma de glutamato e glutamina, é prontamente assimilado no metabolismo das plantas. Esses aminoácidos atuam como doadores de nitrogênio para biossíntese de outros aminoácidos, ácidos nucleicos e outros compostos nitrogenados. Alternativamente, eles podem ser incorporados aos aminoácidos aspartato e asparagina (Lea et al. 2006). A asparagina funciona como transportador e estoque de nitrogênio nas plantas (Azevedo et al. 2006). Destaca-se ainda que o aspartato, além de estar envolvido na translocação de nitrogênio, é precursor da síntese de asparagina, treonina, metionina, lisina e isoleucina (Lam et al. 1995).

A predominância do aminoácido asparagina, durante o processo germinativo, (Figuras 6 e 7) evidencia a importância deste aminoácido na germinação das sementes de *O. odorifera*. Tal predominância também foi observada para a germinação de sementes de *Ocotea catharinensis* (Dias et al. 2009). O metabolismo da asparagina tem sido objeto de intenso estudo em diferentes sistemas vegetais, e os resultados deste trabalho reforçam sua importância na produção desse aminoácido, durante o desenvolvimento da plântula. Segundo Lea et al. (2006), a asparagina se acumula, na maioria dos órgãos das plantas, durante períodos de baixa síntese protéica e de reduzido suprimento de nitrogênio, além de participar do processo da germinação de sementes. Gianinno et al. (2008) observaram que, plântulas de alface transgênicas, capazes de produzir maior quantidade de asparagina e aspartato que as selvagens, eram capazes de produzir folhas de maior área e massa seca, além de desenvolverem folhas e floração precoces, em relação às plantas selvagens. Em outro estudo, Herrera-Rodriguez et al. (2006) demonstraram que, durante a germinação de sementes de girassol, existe um tipo específico de asparagina sintetase, a qual atua preferencialmente na síntese de asparagina durante a germinação e expansão dos cotilédones.

Nas plantas, a asparagina, formada pela amidação do aspartato ou amônio é um metabólito-chave para o transporte de N (Lea et al. 2006). A asparagina sintetase possui importante papel na mobilização de fontes de N, convertendo estoques de proteínas em asparagina, a qual é transportada para os ápices em crescimento. Várias características químicas fazem com que a asparagina seja um veículo de N conveniente para translocação na planta. Incluem-se nestas características, a sua solubilidade mais elevada, em relação aos ureídeos, e o fato de apresentar maior relação nitrogênio/carbono. Adicionalmente, a asparagina apresenta maior estabilidade, estrutural e química, quando comparado com a glutamina (Urquhart e Joy 1981), favorecendo o transporte em longas distâncias (Oliveira et al. 2001). Normalmente, este aminoácido é considerado como doador de nitrogênio para a biossíntese de um grande número de compostos necessários durante a germinação das sementes (Lea et al. 1989, Bewley e Black 1994, Radwanski e Last 1995, von Wettstein et al. 1995). Durante a germinação de sementes de *Pinus* foi observada uma alocação preferencial de asparagina no hipocótilo, sendo posteriormente degradada para o fornecimento de nitrogênio para a produção do sistema vascular secundário (Cañas et al. 2006). Destaca-se que, nas espécies arbóreas, a asparagina é responsável por 24-76% do nitrogênio presente no xilema (Lea et al., 2006).

Quanto ao aumento no conteúdo total dos aminoácidos, sugere-se que, além da função de suprir as demandas de nitrogênio requeridas pela plântula, os aminoácidos atuam, como agentes osmóticos, necessários para completar o processo germinativo. De acordo com Bove et al. (2001), nas etapas anteriores ao alongamento da radícula, novos processos fisiológicos se estabelecem, preparando o embrião para a expansão do eixo embrionário. Estes processos estariam relacionados com o aumento nos conteúdos de aminoácidos, açúcares e íons potássio. Estas substâncias, osmoticamente ativas, favoreceriam a entrada de água nas células, permitindo o seu alongamento (Bove, 2001).

Os demais aminoácidos avaliados apresentaram variações ao longo de todo o processo germinativo. Exceção foi feita à lisina, que permaneceu estável durante todo o processo (Tabela 1). Normalmente em plantas, a lisina é acumulada em baixas quantidades, comparadas aos demais aminoácidos. A alta quantidade deste aminoácido, em mutantes de soja transgênica, provoca a formação de folhas com morfologia enrugada e sementes com baixa taxa de germinação (Coruzzi e Last 2000). Para *N. sylvestris*, altas quantidades deste aminoácido promoveram um decréscimo no conteúdo de clorofila, e alterações no desenvolvimento vegetativo, como por exemplo, a perda da dominância apical e alteração na morfologia e tamanho das folhas (Ghislain 1995). Os aminoácidos glutamina e a histidina, diferentemente dos demais aminoácidos, tiveram seus conteúdos reduzidos, nos primeiros quinze dias após a semeadura (Figura 9).

Os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) apresentaram uma tendência de aumento ao longo do processo germinativo (Figura 12). As plantas utilizam as

etapas de biossíntese destes aminoácidos para a produção de numerosos metabólitos secundários aromáticos como o hormônio AIA, pigmentos (antocianinas), compostos com funções defensivas (fitoalexinas e alcalóides ativos) e estruturais. (Yoshida 1969). Embora o conteúdo de aminoácidos aromáticos nos tecidos serem baixos, em relação aos demais aminoácidos, as plantas produzem quantidades abundantes de metabólitos secundários, induzidos a partir destas vias, quando são submetidas a injúrias ou infecção por patógenos (Raskin, 1992). O aumento na produção dessas substâncias, durante o processo germinativo, deve ter importante papel na proteção contra patógenos e a injúria, nesta etapa do desenvolvimento. Durante esta fase, o eixo embrionário é exposto para o ambiente externo, devendo ser submetido às condições adversas durante o desenvolvimento radicular.

O aumento do conteúdo de triptofano, identificado no presente trabalho, coincide com a etapa na qual a emissão da radícula foi observada. Provavelmente, o aumento deste aminoácido foi responsável pelo pico de AIA, observado em período imediatamente anterior ao alongamento que, por sua vez, deve ter sido um estímulo para o alongamento da radícula (Hager, et al., 1971).

O aumento de AIA e a redução nos níveis de ABA identificados neste trabalho, foram semelhantes ao observado para sementes de *O. catharinensis* (Dias et al. 2009), onde observou-se que: a) o conteúdo de AIA aumenta no início do processo de germinação, seguido pelo decréscimo e estabilização; b) o ABA apresentou queda no início da germinação. Resultados semelhantes em relação ao AIA também foram obtidos durante a germinação de *Pinus sylvestris*, em que os níveis de AIA são maiores nos estádios iniciais, durante a fase de embebição, e decrescem no momento em que ocorre o alongamento da raiz (Ljung et al. 2001).

A descoberta sobre os efeitos do ABA no alongamento celular não são recentes, e remontam os estudos de Evans (1978). Silva et al. (2008), trabalhando com sementes de café, observaram que, a manutenção de altos níveis de ABA podem inibir os processos relacionados ao alongamento, expansão e divisão celular celular. Karssen et al., (1983) em estudos com mutantes deficientes ou insensíveis ao ABA, demonstraram que a ausência deste hormônio reduziria as camadas de mucilagem ao redor da testa, facilitando a absorção de água e oxigênio pelas sementes.

O metabolismo do ABA é regulado pelo fitocromo (Gutierrez et al. 2007) ocorrendo um declínio deste fitorregulador durante o início do processo germinativo, o resultante tanto da supressão da síntese *de novo* quanto da ativação do catabolismo (Feurtado et al. 2004, Kushiro et al. 2004). O ABA atua de forma antagônica às GAs, conhecidas como promotoras e mantenedoras do processo germinativo (Kermode 2000). De acordo com Ali-Rachedi et al. (2004), após a embebição, as sementes estabelecem um catabolismo específico que resulta na redução dos níveis de ABA e síntese das GAs. As GAs, por sua vez, participam da regulação da biossíntese do ABA, promovendo a sua inibição (Gutierrez et al. 2007). O balanço de ABA/GA é fundamental para o processo de maturação e germinação, de forma que o balanço favorável para

ABA promove a maturação e inibe a progressão do ciclo celular, crescimento e germinação do embrião (Curaba et al. 2003, Gazzarini et al. 2004). A importância desta relação ABA/GA para a germinação, também pode ser reconhecida nas sementes dormentes, que não germinam mesmo quando embebidas (Finch-Savage et al. 2006). Esta situação pode ser explicado pela incapacidade de promover o catabolismo de ABA, mantendo altos níveis desta substância (Ali-Rachedi et al. 2004).

Durante o início maturação das sementes de *Arabidopsis*, foi descrito a interação entre AIA e ABA. Neste sistema, o AIA ativa o fator de transcrição FUS3, que modula a produção de ABA (Gutierrez et al. 2007). Entretanto, estudos relacionando os conteúdos de AIA e o ABA durante o processo germinativo são praticamente inexistentes na literatura. Neste trabalho, observou-se, após 30 dias de semeadura, quando ocorre o intumescimento do eixo embrionário e início do alongamento, os menores valores de ABA livre coincidem com os maiores conteúdos de AIA. Assim, os resultados apresentados neste trabalho sugerem a existência de uma relação entre o processo germinativo e o balanço ABA/AIA, durante o processo germinativo de *O. odorifera*. Neste caso, assim como na relação entre ABA/GA, baixos níveis de ABA e altos níveis de AIA estariam positivamente relacionados com a emissão da radícula.

Como já mencionado anteriormente, em sementes ortodoxas, a continuidade do desenvolvimento do embrião em plântula, interrompido durante a maturação, é ativado pela absorção de água. (Han et al. 2007). Entretanto, as sementes estudadas no presente trabalho, por serem recalcitrantes, apresentam o processo germinativo como uma continuidade do processo de maturação da semente, já que são liberadas com altos teores de água (Berjak e Pammer, 2008). De acordo com Lopez-Molina et al. (2001), a interrupção do processo germinativo logo após a maturação, representaria um mecanismo adaptativo que aumenta a sobrevivência das sementes quando a umidade do solo é baixa. Estes autores relacionaram o gene ABI3, que expressa um fator de transcrição relacionado ao ABA, como um dos responsáveis pelo acúmulo de reservas, aquisição de tolerância à dessecação e imposição de dormência. Os mutantes incapazes de expressar este fator não apresentaram dormência e apresentaram deficiências em relação à produção de proteínas durante a maturação. Faltam estudos sobre o comportamento e os efeitos desse gene em espécies recalcitrantes, que não apresentam tal interrupção metabólica e, portanto, não apresentam dormência, mas são capazes de acumular reservas e disponibilizá-las durante o processo germinativo.

Pesquisas envolvendo as PAs no processo germinativo são escassas. Neste trabalho, investigou-se as variações destes compostos ao longo do metabolismo germinativo, e a sua relação com os demais compostos envolvidos no processo. Em relação aos aminoácidos relacionados à biossíntese de PAs: metionina (precursor indireto), ornitina e arginina (precursores diretos), o aumento no conteúdo endógeno desses aminoácidos, observado após 30 dias de semeadura, pode estar relacionado com o aumento no conteúdo das PAs livres, no mesmo

período. Por outro lado, o declínio das PAs livres, observado após 45 dias de semeadura, pode ser decorrente do aumento da taxa de conjugação de PAs, nas sementes de *O. odorifera*. Esta situação pode refletir ainda, o conteúdo da Spd, ou seja, sua maior abundância entre as PAs livres, e menor abundância dentre as PAs conjugadas. Salienta-se que, a conjugação pode ser considerada como uma forma de controle da concentração intracelular das PAs (Bagni e Pistocchi 1990, Katerova e Todorova 2009).

Diversos estudos têm relatado os efeitos fisiológicos das PAs, considerando-se não apenas os seus conteúdos individuais, mas também as combinações entre elas. Shoeb et al. (2001) propuseram que a relação Put/Spd constitui importante biomarcador da capacidade regenerativa em plantas. Papadakis et al. (2005), em estudos com protoplastos de tabaco, evidenciaram que os níveis mais elevados de Put em relação à soma de Spd e Spm, podem estar associados à totipotencialidade. Para a embriogênese zigótica, foi sugerido que a Put possui importância fundamental no início da embriogênese, quando a taxa de divisão celular é alta. Os altos conteúdos de Spd e/ou Spm, seriam essenciais, na fase final do desenvolvimento do embrião, quando o crescimento está relacionado, especialmente, ao alongamento celular (Astarita et al. 2003b, Santa-Catarina et al., 2006). A relação de PAs livres Put/(Spd+Spm) durante a germinação de *O. odorifera* diminuiu nas sementes germinadas, em relação às sementes maduras. Como a emissão da radícula é resultante, principalmente, do alongamento de suas células, a associação de baixos valores da relação Put/(Spd+Spm) com alongamento celular pode ser corroborada no presente trabalho.

Embora existam vários estudos sobre a mobilização de proteínas em espécies vegetais, estudos da alteração dos perfis protéicos ao longo do processo germinativo de sementes recalcitrantes e ortodoxas são bastante escassos. No presente trabalho, a análise dos perfis protéicos durante a germinação de *O. odorifera*, utilizando a eletroforese bi-dimensional, permitiu evidenciar alterações quantitativas e qualitativas nos extratos protéicos dos diferentes materiais. A análise das imagens digitalizadas dos géis bi-dimensionais permitiu a identificação de 455 polipeptídeos, no decorrer dos 45 dias de germinação analisados. Destes, 39 polipeptídeos foram selecionados como marcadores do processo germinativo em *O. odorifera*.

Dentre estes spots selecionados, o perfil apresentado pelo *spot* 250 sugere a ação de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo. Ao longo do processo germinativo foi observado um aumento na porcentagem de volume deste *spot*, sendo o seu peso molecular e o ponto isoelétrico (pI) semelhantes aos observados para ascorbato peroxidase e glutathione transferase em *O. catharinensis* (Dias 2009). Como o teor de água nas sementes é alta desde a semente madura, este fato sugere que o aumento da oxidação seja decorrente de outros fatores que não a reidratação e o aumento das taxas respiratórias, como observado nas sementes ortodoxas. Dessa forma, a oxidação observada, seria consequência de outros eventos relacionados à germinação. Um exemplo seria o alongamento radicular, já que tais proteínas estão em maior abundância

quando o mesmo encontra-se intumescido, caindo drasticamente após a emissão da radícula. Além disso, o aumento da abundância dessas proteínas já foram relacionadas com outros eventos relacionados à germinação, como aqueles relacionados ao ciclo celular (De Castro et al. 2000, Vasquez-Ramos e Sanchez, 2003), enfraquecimento do endosperma pela atividade de hidrolases (Groot et al. 1988, Bradford et al. 2000) e mobilização dos estoques de proteínas (Job et al. 1997).

Os spots 954 e 254 (aproximadamente com 25 kDa) também apresentaram aumento de abundância ao longo do período observado. A análise comparativa com os mapas estabelecidos para *O. catharinensis* (Dias 2009), sugerem que estas proteínas possam estar relacionadas com enzimas do tipo protease e hidrolase. Durante a germinação estas enzimas podem ser sintetizadas ou ativadas pela mobilização ou modificação dos componentes da parede celular necessários para o alongamento radicular (Chiban et al. 2006).

Os grupos protéicos representados pelos spots 127 e 130 apresentaram diminuição de abundância ao longo do período observado e são semelhantes (peso molecular e pI) aos spots identificados como GDP-manose-3',5' epimerase, identificadas em sementes maduras de *O. catharinensis* (Dias, 2009) e *Araucaria angustifolia* (Balbuena et al. 2009). Em plantas, esta enzima está envolvida no processo de síntese de polissacarídeos de parede celular e glicoproteínas a partir de GDP-D-manose, e participa da via de produção de ácido ascórbico *de novo* a partir da formação de GDP-L-gulose (Wolucka 2003).

Durante a germinação de sementes de *Arabidopsis*, Gallardo et al. (2001) identificaram 1300 polipeptídeos. Dentre estes apenas 74 apresentaram variação ao longo do processo, e destes apenas 12 relacionados com funções regulatórias. Os autores puderam identificar proteínas marcadoras das principais fases do processo germinativo incluindo: embebição, mobilização dos estoques de reserva da semente e alongamento da radícula. Este fato corrobora a hipótese de que, aparentemente todos os componentes necessários para a atividade metabólica durante a germinação estão presentes em formas potencialmente ativas em sementes maduras dessecadas, incluindo mRNAs, proteínas ribossomais e fatores de iniciação ao alongamento (Gallardo et al. 2001), sendo o potencial para a germinação programado durante o processo de maturação (Catusse et al. 2008).

Os spots referentes aos números 21, 22, 23, 25, 28, 33 e 34 e que apresentam queda de abundância durante o período observado e são indetectáveis aos 45 dias após semeadura apresentam massa molecular e pI compatíveis à subunidades de  $\beta$ -conglucina. Esta proteína, que se acumula em altos níveis, durante o desenvolvimento da semente de soja (Meinke 1981) representa um tipo de vicilina com importante papel de reserva protéica (Than e Shibasaki 1978, Bourgeois et al, 2009). De acordo com o comportamento observado no presente trabalho, sugere-se que esta vicilina seja também importante fonte nitrogenada para o processo germinativo de *O. odorifera* e caracterizar uma fonte para o aumento dos aminoácidos observados durante o processo.

A futura identificação dos *spots*, considerados neste trabalho como marcadores do processo germinativo, trarão novas informações sobre a germinação de espécies recalcitrantes e poderão evidenciar diferenças inéditas entre a germinação desse tipo de semente com as sementes ortodoxas.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os parâmetros bioquímicos contemplados neste estudo fornecem informações a respeito do metabolismo envolvido durante o processo germinativo de sementes recalcitrantes. É importante ressaltar que a literatura existente referente à germinação é baseada quase em sua totalidade em sementes ortodoxas de espécies modelo.

A variação no conteúdo dos aminoácidos, como elementos precursores, pode ser relacionado com a variação no conteúdo de PAs, AIA e ABA. O aumento no conteúdo de asparagina sugerem importante papel da deste aminoácido no processo germinativo de *O. odorifera*. A relação entre as PAs livres Put/(Spd+Spm), favorável principalmente à Spm, e o aumento da conjugação de Put, durante o período de alongamento radicular corroboram os resultados de trabalhos anteriores (Santa-Catarina et al. 2006, Dias et al., 2009) e apontam relação entre Spm e alongamento celular. A relação entre os conteúdos de AIA e ABA, estudo praticamente inexistente para o processo germinativo, aponta para uma relação antagônica entre os reguladores, abrindo perspectiva de estudos mais aprofundados sobre possível uma interação entre estes reguladores, de forma similar aos efeitos da interação de ABA e GA na germinação.

A análise do acúmulo diferencial de proteínas, associada à futura identificação das mesmas, trará um componente robusto complementar aos parâmetros relatados acima e permitiu a identificação de marcadores do processo. Os trabalhos de proteômica durante a germinação de sementes recalcitrantes são praticamente inexistentes. No presente trabalho, observou-se variação quantitativa na abundância das proteínas em detrimento de variação qualitativa de *spots* ao longo do período observado. Praticamente todos os *spots* observados na semente madura foram observados durante a germinação, salvo um pequeno número que aparece ao longo do processo.

Diferentes estudos apontam sugerem similaridade entre a embriogênese e germinação somática e zigótica (Dias et al. 2009). Assim, os resultados obtidos no presente trabalho podem contribuir para a elucidação e otimização dos protocolos de embriogênese somática e conversão de embriões somáticos em plântulas, a partir da mimetização *in vitro* das alterações fisiológicas observadas. A produção massal de embriões com alta taxa de conversão promoverá sua utilização em programas de recuperação dessa espécie e de outras espécies recalcitrantes complementando estudos que vêm sendo desenvolvidas no Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL – USP).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner M-H, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M (2004) Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 219: 479–488
- Astarita LV, Floh EIS, Handro W (2004) Free amino acid, protein and water changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biol Plantarum*; 47(1): 53-59
- Azevedo RA, Lancien M, Lea PJ (2006) The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids* 30: 143-162
- Bagni N, Pistocchi R (1990) Binding, transport and subcellular compartmentation of polyamines in plants. Flores HF, Arteca RN, Shannon JC (eds) *Polyamines and ethylene biochemistry, physiology and interactions*. American Society of Plant Physiology, Rockville, pp. 62-72
- Bak-Jensen KS, Laugensen S, Roepstorff P, Svensson B (2004) Two-dimensional gel electrophoresis pattern (pH 6-11) and identification of water-soluble barley seed and malt proteins by mass spectrometry. *Proteomics* 4: 728-742
- Balbuena TS, Silveira V, Junqueira M, Dias LLC, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh EIS (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *Journal of Proteomics* 72 :337-352
- Barendse GWN, Peeters TJM. Multiple hormonal control in plants (1995) *Acta Bot Neerl* 44: 03-17
- Berjak P, Farrant JM, Pammenter NW (1989) The basis of recalcitrant seed behaviour. In: Taylorson RB (ed) *Recent advances in the development and germination of seeds*. Plenum Press, New York, 89–108.
- Berjak P, Pammenter NW (2004) Recalcitrant seeds. In: Benech-Arnold RL, Sanchez RA eds *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*. Haworth Press, New York: 305–345.
- Berjak P, Pammenter NW (2008) From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in Perspective. *Annals of Botany* 101(2): 213-228.
- Bewley JD, Black M (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. 2 ed New York: Plenum Publishing 445p.

- Bewley JD, Oliver MJ (1992) Desiccation-tolerance in vegetative plant tissues and seeds: Protein synthesis in relation to desiccation and a potential role for protection and repair mechanisms. In: Somero GN, Osmond CB, Bolis CL (eds) *Water and life: Comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular levels*. Springer-Verlag, Berlin, pp 141–160.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140: 103-125.
- Bove J, Jullien M, Grappin P (2001) Functional genomics in the study of seed germination *Genome Biology* 3(1): reviews1002.1–1002.5
- Bradford KJ, Chen F, Cooley MB, Dahal P, Downie B, Fukunaga KK, Gee OH, Gurusinghe S, Mella RA, Nonogaki H et al. (2000) Gene expression prior to radical emergence in imbibed tomato seeds. In M Black, KJ Bradford, J Vázquez-Ramos, eds, *Seed Biology: Advances and Applications*. CABI International, Wallingford, pp 231–251
- Burger LM, Richter HG (1991) *Anatomia da Madeira*. Nobel, São Paulo, 151p
- Cañas RA, Torre F, Cánovas FM, Cantón FR (2007) Coordination of *PsAS1* and *PsASPG* expression controls timing of re-allocated N utilization in hypocotyls of pine seedlings *Planta* 225: 1205–1219
- Cánovas FM, Dumas-Gaudot E, Recobert G, Jorin J, Mock HP, Rossignol M (2004) Plant Proteome analysis. *Proteomics* 4: 285-298.
- Carvalho PER (1994) *Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Embrapa, Curitiba p 367-370.
- Casson S, Lindsey K (2006) The turnip mutant of *Arabidopsis* reveals the *LEAFY COTYLEDON1* expression mediates the effects of auxin and sugars to promote embryonic cell identity. *Plant Physiol* 142: 526–541
- Catusse J, Strub J-M, Job C, Van Dorsselaer A, Job D (2008) Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. *Proc Natl Acad Sci* 105: 10262–10267
- Cetnarski Filho R, Nogueira AC (2004) Regeneração natural de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (canela-sassafrás). *Revista Acadêmica (PUCPR)* 2: 61-68.

- Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T Sheen J (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* 14:2723–43
- Chibani K, Ali-Rachedi S, Job C, Job D, Jullien M, Grappin P (2006) Proteomic Analysis of Seed Dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142: 1493-1510
- Chin HF, Roberts EH. 1980. Recalcitrant crop seeds. Kuala Lumpur, Tropical Press SDN/BHD, 152 p
- Cohen SS (1998) Cohen SS (ed) A Guide to the Polyamines. Oxford University Press, Oxford
- Coruzzi G, Last R (2000) Amino acids. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists p. 358-410.
- Curaba J, Herzog M, Vachon G (2003) GeBP, the first member of a new gene family in *Arabidopsis*, encodes a nuclear protein with DNA-binding activity and is regulated by KNAT1. *The Plant Journal* 33:305–317
- Davide AC, Carvalho LR, Carvalho MLM, Guimarães RM (2003) Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família Lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. *Cerne* 9(1): 29-35
- De Castro RD, van Lammeren AAM, Groot SPC, Bino RJ, Hilhorst HWM (2000) Cell division and subsequent radical protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. *Plant Physiol* 122: 327–335
- Dias LLC, Floh EIS, Santa-Catarina C, Silveira V (2007) Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. *Revista brasileira de Horticultura Ornamental* 13: 2002-2009
- Dias LLC, Santa-Catarina C, Silveira V, Pieruzzi FP, Floh EIS (2009) Polyamines, amino acids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. *Seed Science and Technology* 37: 42-51
- Duarte da Silva, JMO, Oltramari AC, Maraschin M, Pedrotti EL (2001) Cultura de embriões imaturos e organogênese – Aspectos biotecnológicos da canela sassafrás. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 20: 44 – 48
- Faria JMR (2006) Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal – Universidade de Wageningen, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

- Feurtado JA, Ambrose SJ, Cutler AJ, Ross ARS, Abrams SR, Kermode A (2004) Dormancy termination of western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds is associated with changes in abscisic acid metabolism. *Planta* 218: 630–39
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* (Tansley Review) 171: 501-523
- Frey, A, Godin B, Bonnet M, Sotta B, Marion-Poll A (2004) Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 218:958-964
- Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D (2002) Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth. *Physiol Plant* 116: 238-247
- Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D (2001) Proteomic Analysis of *Arabidopsis* Seed Germination and Priming. *Plant Physiol* 126: 835-848
- Gallardo M, Bueno M, Angosto T, Gallardo E and Matilla AJ (1992) Free polyamines in *Cicer arietinum* seeds during the onset of germination. *Phytochemistry* 31: 2283-2287
- Garciarrubio A, Legaria JP, Covarrubias AA (1997) Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients *Planta* 203: 182-187
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 32: 272-289
- Ghislain M, Frankard V, Jacobs M (1995) A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. *Plant J* 8: 733–743
- Giannino D, Nicolodi C, Testone G (2008) The overexpression of asparagine synthetase A from *E. coli* affects the nitrogen status in leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and enhances vegetative growth. *Euphytica* 162: 11-22
- Groot SPC, Kieliszewska-Rokicha B, Vermeer E, Karssen CM (1988) Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radical protrusion. *Planta* 174: 500–504
- Groppa MD, Zawoznik MS, Tomaro ML, Benavides MP (2007) Inhibition of root growth and polyamine metabolism in sunflower (*Helianthus annuus*) Seedlings Under Cadmium and Copper Stress. *Biological Trace Element Research* 126: 1-3.

- Gutierrez L, Wuytswinkel OV, Castelain M, Bellini C (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science* 12: 294-300
- Hager A, Menzel H, Krauss A (1971) Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum (Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth). *Planta* 100:47–75
- Hakman I (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. *Physiol Plant* 87: 148-159
- Han B, Hughes WD, Galau GA, Bewley DJ, Kermode AR (1997) Changes in late-embryogenesis-abundant (LEA) messenger RNAs and dehydrins during maturation and premature drying of *Ricinus communis* L. seeds. *Planta* 201: 27–35
- Herrera Rodriguez MB, Maldonado JM, Perez-Vicente R (2006) Role of asparagine and asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) germination and natural senescence. *Journal of Plant Physiology* 163: 1061-1070
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6: 431-438
- Högberg KA, Ekberg I, Norell LE, Von Arnold S (1998) Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding program: a case study with *Picea abies*. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 1536-1545
- Hvoslef-Eide AK, Corke FMK (1997) Embryogenesis specific protein changes in birch suspension cultures (1997)
- Igarashi K, Kashiwagi K (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 559–564
- Inoue MT, Roderjan CV, Kuniyoshi YS (1984). Projeto Madeira do Paraná FUPEF-UFPR, Curitiba 260 p
- IUCN (2009) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <<http://www.iucnredlist.org>> acessado em setembro de 2009
- Jain SM, Ishii K (1998) Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In *Recent advances in biotechnology for conservation and management*. Mantell, SH, Bruns S, Tragardh C, Viana AM (eds) International Foundation for Science, Stockholm, pp 214-231

- Job C, Kersulec A, Ravasio L, Chareyre S, Pepin R, Job D (1997) The solubilization of the basic subunit of sugarbeet seed 11-S globulin during priming and early germination. *Seed Sci Res* 7: 225–243
- Karszen CM, Swan DLCB, Breeklund AE, Koornneef M (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 157:158-165
- Katerova ZI, Todorova D (2009) Endogenous polyamines lessen membrane damages in pea plants provoked by enhanced ultraviolet-C radiation. *Plant Growth Regulation* 57: 145-152
- Kermode AR (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Plant Sciences* 9(2): 155-195
- Kermode AR (1997) Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. *Seed Science Research* 7: 75-90
- Kermode AR (2005) Role of abscisic acid in seed dormancy. *J Plant Growth Reg* 24: 319-344
- Kermode AR (2005) Role of Abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24 : 319-344
- Kermode AR, Finch-Savage WE (2002) Desiccation Sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In Black M and Pritchard H (eds) *Desiccation and Plant Survival*, CAB International, Wallingford, pp149-184
- Kong L, Attree SM, Fowke LC (1997) Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. *Physiol Plant* 101: 23-30
- Koster KL, Leopold AC. 1988. Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. *Plant Physiology* 88:829-832
- Kucera B, Cohn A, Leubner-Metzger G (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281-307
- Kumar A, Taylor M, Altabella T, Tiburcio AF (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Sci* 2(4):124-130
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism *EMBO J* 23(7):1647-56

- Kuzano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival 228: 367-381
- Kuznetsov V, Radyukina NL, Shevyakova NI (2006) Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. Russ J Plant Physiol 53(5): 583-604
- Lam HM, Coschigano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira I, Ngai N, Hsieh M-H, Coruzzi G (1995) Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. The Plant Cell 7: 887-898
- Lea PJ, Robinson SA, Stewart GR (1989) The use of mutants lacking glutamine synthetase and glutamate synthetase to study their role in plant nitrogen metabolism. In: Poulton JE, Romeo JT, Conn EE. Recent advances in phytochemistry. New York: Plenum Press 569-607
- Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, PR Shewry NG Halford. Asparagine in plants (2006) Annals of applied biology 150(1): 1-26
- Lorenzi H (1992) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas
- Macnicol PK (1983) Developmental changes in the free amino acid pool and total protein amino acids of pea cotyledons (*Pisum sativum* L.) Plant Physiol 72: 492-497
- Maia JGS, Zoghbi MGB (1998) Óleos Essenciais da Amazônia: Inventário da Flora Aromática. In: Faria LJG de, Costa CMLI (eds) Tópicos Especiais em Tecnologia de Produtos Naturais, UFPa/NUMA/POEMA, Belém, pp127-146
- Marchiori JNC (1997) Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas. Ed da UFSM, Santa Maria, p 271
- Matilla AJ (1996) Polyamines and seed germination. Seed Sci Reser 6: 81-93
- Meinke DW, Chen J, Beachy RN (1981) Expression of storage protein genes during soybean seed development. Planta 153: 130-139
- Merkle SA, Parrot WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thope TA (Ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 155-203
- Minocha R, Dale RS, Cathie R, Steele KD, Minocha SC (1999) Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. Physiol Plant 105: 155-164
- Moon H, Hildebrand DF (2003) Effects of proliferation, maturation, and desiccation methods on conversion of soybean somatic embryos. In vitro Cell Dev Biol Plant 39: 623-628

- Natarajan S, Xu C, Caperna TJ, Garrett WM (2005) Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal Biochem* 342: 214-220
- Obendorf RL, Zimmerman AD, Zhang Q, Castillo A, Kosina SM, Bryant EG, Sensenig EM, Wu J, Schnebly SR (2009) Accumulation of Soluble Carbohydrates during Seed Development and Maturation of Low-Raffi nose, Low-Stachyose Soybean. *Crop Science* 49: 329-341
- Oliveira IC, Brenner E, Chiu J, Hsieh MH, Kouranov A, Lam HM, Shin MJ, Coruzzi G (2001) Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Braz J Med Biol Res* 34: 567-575
- Oliver MJ, Tuba Z, Mishler BD (2000) The evolution of desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* 151: 85-100
- Ortiz-Lopez A, Chang H-C, Bush DR (2000) Amino acid transporters in plants. *Biochim Biophys Acta* 1465: 275-280
- Papadakis AK, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2005) Biosynthesis profile and endogenous titers of polyamines differ in totipotent and recalcitrant plant protoplasts. *Physiologia Plantarum* 125: 10-20
- Radwanski ER, Last RL (1995) Tryptophan biosynthesis and metabolism: Biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7: 921-934
- Raskin I (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bioi* 43:439-463
- Reitz R, Klein, RM, Reis A (1978) Projeto Madeira de Santa Catarina. *Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí* 320 p
- Rizzini CT (1971) Árvores e madeiras úteis do Brasil. Edgard Blucher LTDA, São Paulo 298 p
- Rock CD, Quatrano RS (1995) The role of hormones during seed development. In: Davies PJ (Ed) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2 ed. Ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 671-697
- Salomão NA, Brandão JEM De S, Silva JA (1992) Distribuição geográfica de seis espécies florestais com subsídio para a escolha de áreas futuras de conservação "*in situ*". *Revista do Instituto Florestal* 4: 1199-1205
- Santa-Catarina C, Maciel SC, Pedrotti EL (2001) Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). *Rev Bras Bot* 2001, vol 24 n4 supl p 501-510

- Santa-Catarina C, Silveira V, Balbuena TS, Maranhão MEE, Handro W e Floh EIS (2006) IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Reg* 49: 237–247
- Santa-Catarina C, Silveira V, Scherer GFE, Floh EIS (2007) Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90: 93–101
- Santos E (1987) *Nossas Madeiras*. Itatiaia, Belo Horizonte 313 p
- Seo M, Koshiba T (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants *Trends in Plant Biology*. 7(1): 41-48
- Sghaier B, Bahloul M, Gargouri BR, Drira N (2008) Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour comparative study. *Sci Hortic* 116: 169-175
- Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism indifferent genotypes of *Indica rice*. *Plant Science* 160: 1229–1235
- Silveira V, Balbuena TS, Santa-Catarina C, Floh EIS, Guerra MP, Handro W (2004b) Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L. *Plant Grow Reg* 44 (2): 147-156
- Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP (2004a) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69: 233-249
- Silveira V, Santa-Catarina C, Balbuena, TS, Moraes FMS, Ricart CAO, Sousa MV De, Guerra MP, H Walter, Floh EIS (2008) Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum* 52: 101-104
- Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Guerra MP, Floh EIS (2006) Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant Sci* 171: 91-98
- Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53:749-90
- Taiz L, Zeiger E (2009) *Fisiologia Vegetal*. Artmed, Porto Alegre. 4<sup>a</sup> ed, 848 p
- Taurus TE, Fowke LC, Dunstan DI (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Can J Bot* 69:1873-1899

- Than VH, Shibasaki K (1978) Major Proteins of Soybean Seeds. Subunit Structure of fl-Conglycinin. J Agric Food Chem, vol 26(3): 692-695
- Urquhart AA, Joy KW (1981) Use of phloem exudate technique in the study of amino acid transport in pea plants. Plant Physiol 68: 750–754
- Vasquez-Ramos, JM, Sánchez MP (2003) The cell cycle and seed germination. Seed Sci Res 13: 113-130
- Vensel W, Tanaka CK, Cai N, Wong JH, Buchanan BB, Hurkman WJ (2005) Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. Proteomics 5: 1594-1611
- von Wettstein D, Gough S, Kannangara CG (1995) Chlorophyll biosynthesis. Plant Cell 7: 1039-1057
- Wermuth CG(1996) The Practice of Medicinal Chemistry, Academic Press, New York
- Wise JM, Tunnacliffe A (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? Trends Plant Sci 9: 13-17
- Wolucka BA, MV Montagu (2003) GDP-mannose 3'-5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the *de Novo* biosynthesis of Vitamin C in Plants. The Journal of Biological Chemistry 278(48): 47483–47490
- Yoshida S (1969) Biosynthesis and conversion of aromatic amino acids in plants department of biology Tokyo Metropolitan University Setagaya-ku, Tokyo, Annu Rev Plant Physiol 20: 41-62
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plan. Plant Cell 5: 1411-1423