UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

LEANDRO FRANCISCO DE OLIVEIRA

Metabolismo de poliaminas na embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

Polyamine metabolism in zygotic and somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

LEANDRO FRANCISCO DE OLIVEIRA

Metabolismo de poliaminas na embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

Polyamine metabolism in zygotic and somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na área de Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Iochevet Segal Floh

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

de Oliveira, Leandro Francisco

Metabolismo de poliaminas da embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze.

180 p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Arginina descarboxilase. 2. *Araucaria angustifolia*. 3. Embriogênese somática. 4. Embriogênese zigótica. 5. Ornitina descarboxilase. 6. Poliaminas.

COMISSÃO JULGADORA

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Profa. Dra. Eny Iochevet Segal Floh
Orientadora

Aos meus pais e família, José e Lúcia,

os quais foram e são a base de tudo o que sou,

Dedico.

“*Alegria é aceitar a vida com tudo que ela oferece*

e poder escolher com o coração, para

aprender o que o espírito realmente deseja!”

César Laurenti

Agradecimentos

De maneira muito honrosa, gostaria de expressar aqui meus sentimentos em finalizar mais uma etapa da minha vida. Deixo aqui minha imensa gratidão a todos que participaram direta e indiretamente neste trabalho, tornando-o uma realidade e fazendo com que eu pudesse vivenciar essa experiência de aprendizado. Desta forma, registro meus agradecimentos:

Primeiramente aos meus pais, **José e Lúcia**, que foram meus primeiros professores da vida. Muito tenho a agradecê-los pelos incontáveis ensinamentos sobre a vida, honestidade, dignidade, honra, dedicação e amor ao que se faz. Obrigado pela paciência de minha ausência em vários momentos importantes da vida de vocês. Amo vocês.

À **Professora Dra. Eny I. S. Floh**, que me confiou tal trabalho. Sou imensamente grato à confiança, paciência, ensinamentos e puxões de orelhas. Obrigado pela enorme compreensão em vários momentos de dificuldade nos quais me encontrei, bem como pelas minhas falhas. Graças ao seu aceite e orientação pude evoluir, e muito, em minha formação científica. Minha gratidão será eterna.

Ao **Dr. André Luís Wendt dos Santos**, pela enorme colaboração e participação neste trabalho. Obrigado por todos os ensinamentos que me passaste. Sua participação nas várias etapas desta tese foi essencial para a finalização da mesma. Deixo aqui minha gratidão.

À **Dra. Paula Maria Elbl**, minha gratidão pelas valiosas contribuições metodológicas e conceituais que enriqueceram esse trabalho, pela orientação, por tudo o que sei sobre bioinformática e biologia molecular, pela grande amizade, paciência e conselhos.

À técnica **MSc. Amanda F. Macedo**, a qual foi peça fundamental na realização deste trabalho. Agradeço imensamente sua paciência e dedicação como apoio técnico durante esses quatros anos. Seu conhecimento técnico é reconhecido neste trabalho.

A todos os colegas BIOCEL e GMP, do IB-USP, antigos, novos e os que por ali passaram: Bruno Navarro, Ana Carolina, Giovanni, Marcella, Silvia, Juliana, Dani Rosado, Giovanna, Bruno, Leandro, Carmen, Fernanda, Caroline, Débora, Augusto, Aline Meneguzzi, Fernanda Rezende, Igor, Jessica e outros que eu possa ter esquecido. Em especial, **Leonardo Jo**, o qual agradeço pela intermediação que proporcionou minha vinda ao BIOCEL. Todos vocês fazem parte deste trabalho. À **Dra. Lydia Yamaguchi**, pelas boas conversas, conselhos e ajuda técnica. À **Dra. Adriana Grandis** pela grande ajuda nas análises multivariadas.

Ao Laboratório de Genética Molecular de Plantas (GMP) e à **Profa. Dra. Magdalena Rossi** por todo o suporte técnico para a realização das análises moleculares. Sobretudo, agradeço todos os seus conselhos, ensinamentos e amizade. Ao **Prof. Dr. Igor Cesarino**, pelas boas risadas, conselhos e suporte técnico.

Ao **Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas** (Lafieco, IB-USP) e sua equipe (**Prof. Dr. Marcos Buckeridge**, técnica **Eglee Igarashi**, **Dra. Eveline Tavares** e demais alunos) pelo provimento de infraestrutura e equipamentos para processamentos de amostras e análises. Aos Laboratórios de Fitoquímica e GaTE, pelo uso de equipamentos. Ao Instituto de Ciências Biomédicas II (ICB II-USP), por permitir o uso da sala de equipamentos e a utilização do contador de radioatividade.

Ao **Professor Dr. Subhash Minocha** (Universidade de New Hampshire, NH, EUA) e sua esposa **Dra. Rakesh Minocha** (Serviço Florestal, NH, EUA), pela colaboração, ensinamentos, confiança e sobretudo amizade. Thank you so much!

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica a ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, da Universidade de São Paulo, pela oportunidade, apoio acadêmico e estruturas necessárias para realização deste doutorado.

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (processo 2012/22738-9). As agências de fomento: CAPES, CNPq, FAPESP e Petrobrás pelo apoio dado ao grupo de pesquisa.

Ao **Dr. Emerson Luiz Gumboski**, deixo aqui minha gratidão pela amizade desde os tempos do mestrado e pela grande ajuda na coleta de material para a execução deste projeto. Ao Parque Estadual de Campos do Jordão, toda sua equipe técnica e, em especial, ao senhor **Anésio**, pela realização das coletas de sementes.

Por fim, deixo um agradecimento ao meu colega de projeto **Bruno V. Navarro**, que se revelou um grande amigo pela participação, colaboração, ajuda, paciência, discussões, risadas e maravilhosa amizade em todos os momentos. A **Eglee Igarashi**, a qual tem sido uma grande companheira, amiga, paciente, conselheira e que tornou minha vida mais enriquecida de bons momentos e alegrias. Sem sua participação nela, eu não teria chegado aqui. Obrigado por ser e estar em minha vida. Obrigado a vocês dois por me aguentarem e por conviverem sob o mesmo teto por quase quatro anos.

A todos vocês,

MUITO OBRIGADO!

"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido,

mas aquele que vai acompanhado,

com certeza vai mais longe."

Clarice Lispector

RESUMO

DE OLIVEIRA, Leandro Francisco. **Metabolismo de poliaminas na embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze.** 2017. 180 p. Tese (Doutorado em Ciências, área de Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A *Araucaria angustifolia* é uma conífera nativa do Brasil. Em função da sua intensa exploração florestal, a espécie ocupa apenas 2% de sua vegetação natural. Neste sistema, a aplicação de técnicas biotecnológicas, como a embriogênese somática, podem ser integradas a programas de melhoramento genético e conservação. A similaridade entre a embriogênese somática e zigótica, tem sido utilizada para o estabelecimento de estudos visando o aperfeiçoamento do cultivo *in vitro* dos embriões somáticos, bem como para um maior conhecimento dos aspectos moleculares e fisiológicos que regulam a embriogênese. O metabolismo de poliaminas (PAs), mais especificamente putrescina, espermidina e espermina, tem se mostrado como fundamental para a compreensão e evolução da embriogênese zigótica e somática. Entretanto, a biossíntese das PAs e seu envolvimento nos vários processos biológicos que regulam a embriogênese, são pouco conhecidas em coníferas. Inserido nessa perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo o estudo do metabolismo de PAs durante três estádios de desenvolvimento da semente (contendo as fases da embriogênese inicial até a tardia) e na proliferação de linhagens embriogênicas com diferentes potenciais embriogênicos de *A. angustifolia*. Foram investigados: a) os perfis de PAs (livres e conjugadas) e aminoácidos; b) determinação da via preferencial da biossíntese de putrescina, através da atividade enzimática da arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC); c) identificação e caracterização do padrão de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de PAs; e d) a identificação das relações entre os perfis de PAs e aminoácidos presentes nas sementes das matrizes, e sua potencial influência nas fases de indução, proliferação e maturação dos embriões somáticos. Durante a embriogênese zigótica, a expressão dos genes *AaADC* (arginina descarboxilase) e *AaSAMDC* (S-adenosilmetionina descarboxilase) aumentaram no estádio cotiledonar, juntamente com o aumento de PAs. A biossíntese da putrescina é realizada preferencialmente via ADC, enquanto que a citrulina foi o principal aminoácido presente nas sementes. Em relação ao metabolismo de PAs nas culturas embriogênicas, os dados obtidos demonstraram que a arginina e ornitina parecem ter diferentes funções em cada linhagem testada. Na linhagem com alto potencial embriogênico, a arginina parece estar associada com a ativação dos genes relacionados ao catabolismo de PAs (*AaPAO2*, *AaCuAO* e *AaALDH*), enquanto que esse efeito não foi observado na linhagem bloqueada. A ODC tem uma maior atividade na linhagem responsiva, enquanto que na linhagem bloqueada, as atividades da ADC e ODC são similares. Dependendo da matriz foram observados diferentes perfis de PAs e aminoácidos, sendo estes perfis relacionados com as taxas de indução, proliferação e desenvolvimento dos embriões somáticos. Putrescina total, ornitina e asparagina foram os

metabólitos diferencialmente identificados entre as matrizes, os quais podem ser propostos como marcadores bioquímicos para a seleção de matrizes com alto potencial para a embriogênese somática. Os resultados obtidos fornecem informações relevantes e inéditas sobre o metabolismo de PAs e aminoácidos na embriogênese zigótica e somática de *A. angustifolia*, bem como fornece novos subsídios para o aprimoramento das condições artificiais utilizadas para o desenvolvimento dos embriões somáticos.

Palavras-chave: Arginina descarboxilase. *Araucaria angustifolia*. Embriogênese somática. Embriogênese zigótica. Ornitina descarboxilase. Poliaminas.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Leandro Francisco. **Polyamine metabolism in zygotic and somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze.** 2017. 180 p. Tese (Doutorado em Ciências, área de Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The *Araucaria angustifolia* is a native conifer species of Brazil. Due to its intense exploitation, the species cover only 2% of its original forest area. In this system, biotechnological tools, like somatic embryogenesis, may be integrated into breeding and conservation programs. The similarity between zygotic and somatic embryogenesis have been used to establishment of studies in order to optimization of somatic embryos in vitro culture, as well as for a better understanding of physiologic and molecular aspects that modulates the embryogenesis. The metabolism of polyamines (PAs), specifically putrescine, spermidine and spermine, has been demonstrated as fundamental for the comprehension and evolution of zygotic and somatic embryogenesis. However, the biosynthetic pathways of PAs and their involvement in various biological process that regulate the embryogenesis are little known in conifers. Inserted in this perspective, the aim of the current work was to study the metabolism of PAs during three seeds development stages (containing the early till late embryogenesis phases) and in proliferation of cell lines with different embryogenic potential of *A. angustifolia*. Were investigated: a) PAs (free and conjugated) and amino acids profiles; b) determination of preferential pathway for putrescine biosynthesis, through enzymatic activity of arginine decarboxylase (ADC) and ornithine decarboxylase (ODC); c) identification and characterization of gene expression profile of genes related to metabolism of PAs; and d) identification of the relationship between PAs and amino acids profiles in seeds of mother plants, and their potential influence in initiation, proliferation and maturation phases of somatic embryos. During the zygotic embryogenesis, *AaADC* (arginine decarboxylase) and *AaSAMDC* (S-adenosylmethionine decarboxylase) genes were up-regulated at cotyledonary stage along with the increasing of PAs. The biosynthesis of putrescine is performed preferentially by ADC pathway, while citrulline was the main amino acid recorded during the seed development. Regarding the metabolism of PAs in embryogenic cultures, the data demonstrated that arginine and ornithine seem to have different functions in each cell line tested. In cell line with high embryogenic potential, arginine seems to be associated to activation of genes related to PAs catabolism (*AaPAO2*, *AaCuAO* e *AaALDH*), while in blocked cell line this effect was not observed. ODC has a higher enzymatic activity in responsive cell line, while in blocked cell line, both ADC and ODC activities are similar. Depending of mother plant, were observed different PAs and amino acids profiles, being these profiles related with the rate of initiation, proliferation and maturation of somatic embryos. Total putrescine, ornithine and asparagine were the differentially metabolites identified between the mother plants, which can be proposed as biochemical marker to select mother plant with high potential to somatic embryogenesis. The results obtained provide relevant and inedited information about the metabolism of PAs and amino acids in zygotic and somatic embryogenesis of *A. angustifolia*, as well as provide news subsidies for optimization of *in vitro* conditions for somatic embryos development.

Keywords: Arginine decarboxylase. *Araucaria angustifolia*. Somatic embryogenesis. Zygotic embryogenesis. Ornithine decarboxylase. Polyamines.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL 17

1. O processo de embriogênese zigótica 18

2. Embriogênese somática em gimnospermas 20

3. Poliaminas 24

3.1. Metabolismo de poliaminas em plantas 26

3.2. Importância das poliaminas na embriogênese 28

4. A *Araucaria angustifolia* como modelo de estudo 31

4.1. A escolha do sistema 31

4.2. Embriogênese zigótica 33

4.3. Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* 36

5. Contextualização da tese 40

6. Referências bibliográficas 43

Capítulo I. Elucidação da biossíntese de poliaminas durante o desenvolvimento de sementes do pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*) .. 61

Capítulo II. Biossíntese de poliaminas em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* 77

Abstract 78

1. Introduction 79

2. Materials and Methods 81

3. Results 86

4. Discussion 97

5. Conclusions 103

6. References 104

Capítulo III. Poliaminas e aminoácidos em diferentes matrizes de *Araucaria angustifolia* e sua associação com o potencial embriogênico 113

1. Introdução 114
2. Materiais e Métodos 116
3. Resultados e Discussão 122
4. Conclusões 135
5. Referências bibliográficas 136

Considerações finais e perspectivas 143

Anexos 148

Anexo I – Material suplementar do Capítulo I 149

Anexo II – Material suplementar do Capítulo II 166

Anexo III – Material suplementar do Capítulo III 174

Anexo IV – Divulgação de resultados 178

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

1. O processo de embriogênese zigótica

A embriogênese zigótica é um processo biológico complexo e altamente organizado e representa o papel central no ciclo de vida das plantas superiores (Cairney *et al.*, 1999; von Arnold *et al.*, 2002; Santa-Catarina *et al.*, 2006). Nos vegetais o termo embriogênese corresponde as fases de desenvolvimento compreendidas entre a fertilização até o início da dormência do embrião zigótico (Harada *et al.*, 2010). A embriogênese é considerada como um modelo para estudos de desenvolvimento e diferenciação em plantas, pois é através dela que é estabelecida a arquitetura do indivíduo, pela geração da forma (morfogênese), associada com a organização de estruturas (organogênese) e diferenciação das células que resultam nos diversos tecidos vegetais (histogênese) (Floh *et al.,* 2015).

Nas angiospermas, o processo de embriogênese tem início com a dupla fecundação dando origem ao zigoto (2n) e o endosperma (3n). Dentro do saco embrionário ocorre a primeira divisão celular do zigoto (divisão assimétrica), resultando na formação de uma estrutura polarizada formada por um polo superior voltado para o endosperma (embrião) e pelo polo inferior voltado para a micrópila (suspensor) (Floh *et al.*, 2015). A primeira divisão do zigoto é acompanhada pela formação da parede celular, pela determinação dos três eixos embrionários (longitudinal, lateral e radial), e por uma sequência de alterações na morfologia do embrião passando, no caso de dicotiledôneas, pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Floh *et al.,* 2015).

Por outro lado, a embriogênese em gimnospermas é caracterizada, após a fusão dos gametas masculino e feminino, por uma etapa de núcleos livres na qual inicialmente não é possível observar a formação da parede celular (Hakman e Oliviusson, 2002). Em gimnospermas são reconhecidas três fases distintas durante o desenvolvimento embrionário (Figura 1): a) fase proembrionária que vai desde a fertilização até o rompimento da arquegônia pelo proembrião (estádios anteriores ao alongamento do suspensor primário); b) fase embrionária inicial, que compreende aos estádios após o alongamento do suspensor secundário e antes do estabelecimento dos meristemas e c) fase embrionária tardia, na qual a protoderme e o procâmbio são diferenciados e os meristemas apical e radicular são estabelecidos (Singh, 1978; Haines e Prakash, 1980; von Arnold *et al.*, 2002).

Para a maioria das gimnospermas ocorre a formação de múltiplos embriões durante a fase embrionária inicial (Figura 1) cuja formação pode ocorrer via dois processos: a

poliembrionia simples ou por clivagem (Singh, 1978; Gifford e Foster, 1989; Floh *et al.*, 2015). Na poliembrionia simples ocorre a formação de mais de um embrião a partir da fertilização de mais de um arquegônio. Já na poliembrionia por clivagem, poliembriões podem ser formados a partir da bipartição por clivagem das células proembrionárias resultando na formação de até 24 proembriões. Independente do processo de poliembriogênese (simples ou por clivagem), apenas o embrião zigótico que atinge a cavidade de corrosão é mantido na semente, sendo que os demais (embriões subordinados) são eliminados por morte celular programada (Gifford e Foster, 1989; Sharma e Thorpe, 1995; Floh *et al.*, 2015).

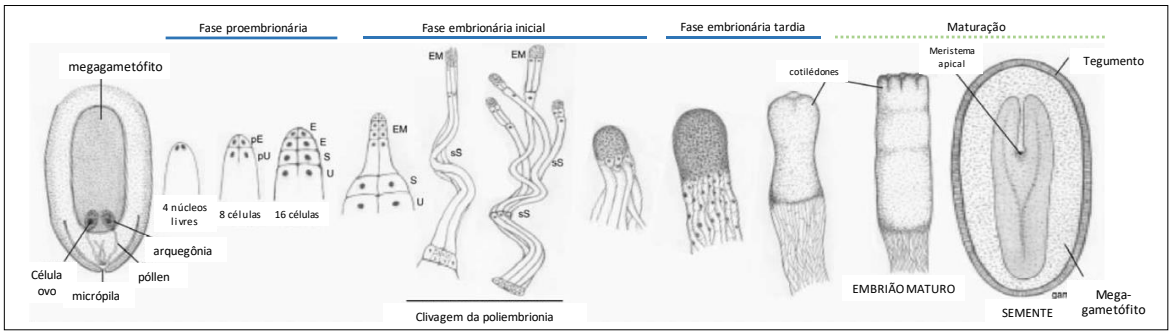

Figura 1. Modelo de desenvolvimento do embrião em gimnospermas (*Pinus sp*). E – camada embrionária; EM – massa embrionária; pE – camada embrionária primária; pU – camada superior primária; S – camada do suspensor; sS – suspensor secundário; U – camada superior. Fonte: adaptado de von Arnold *et al.* (2002).

Nas fases tardias do desenvolvimento, o embrião reduz drasticamente os processos de divisão celular dando início a fase de maturação (Ikeda *et al.*, 2006). Tanto para angiospermas como em gimnospermas, a maturação é considerada como a etapa final e fundamental do desenvolvimento do embrião (Perán-Quesada *et al.*, 2004). Durante maturação, ocorre o desenvolvimento dos cotilédones e acúmulo de substâncias de reserva (lipídeos, carboidratos e proteínas), as quais são consideradas fundamentais para o período pós-germinação (desenvolvimento inicial da plântula) até a autotrofia (Bewley e Black, 1994; Merkle *et al.*, 1995). Dependendo do desenvolvimento fisiológico da semente, a fase de maturação pode ser ainda caracterizada pela diminuição da atividade metabólica e aquisição da tolerância a dessecação mediada ou não pelo ácido absíscico (sementes ortodoxas) (Bewley e Black, 1994; von Arnold *et al.*, 2002; Walters *et al.*, 2008), ou então

pelo aumento da atividade metabólica e acúmulo de água (sementes recalcitrantes) (dos Santos *et al.,* 2006).

O desenvolvimento embrionário vegetal é caracterizado por um controle espacial e temporal na expressão de centenas de genes que desencadeiam processo de transcrição, biossíntese e transporte de hormônios vegetais (principalmente auxinas) ao longo do eixo embrionário (Floh *et al.,* 2015). Grande parte do nosso conhecimento sobre os aspectos moleculares do desenvolvimento embrionário são decorrentes do uso de sistemas modelos como *Arabidopsis thaliana* ou *Medicago truncatula* (Karami *et al.,* 2010; Elhiti *et al.,* 2013; Radoeva e Weijers, 2014; Fehér, 2015). Contudo, de acordo com Ballester *et al.,* (2016), o desenvolvimento embrionário de espécies arbóreas com longo ciclo de vida, sobretudo nas coníferas, apresenta uma série de particularidades que não são encontradas nos sistemas modelos. Os recentes avanços obtidos com uso dos sequenciadores de última geração, e a rápida expansão da base de dados de sequências genéticas vem permitindo o aprofundamento dos estudos moleculares em sistemas não-modelo, como por exemplo, as arbóreas com longo ciclo de vida (Elbl *et al.,* 2015a; Ballester *et al.,* 2016). O desenvolvimento de estudos envolvendo aspectos moleculares em arbóreas é considerado atualmente como fundamental para a ampliação do conhecimento básico relacionado ao desenvolvimento embrionário, bem como para a sua potencial aplicação via ferramentas biotecnológicas (Ballester *et al.,* 2016).

2. Embriogênese somática em gimnospermas

A embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica, no qual uma célula ou um grupo de células vegetativas são precursoras de embriões somáticos (Tautorus *et al.*, 1991; Zimmerman, 1993). Esse processo envolve uma série de estádios de desenvolvimento, que se aproximam da sequência de eventos observados na embriogênese zigótica. As similaridades entre os dois processos envolvem aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares (Hakman, 1993; Thibaud-Nissen *et al.,* 2003; Schmidt *et al.,* 2006; Tereso *et al.*, 2007**;** Sghaier *et al.,* 2008; Floh *et al.*, 2015). Em virtude dessas similaridades, vários estudos têm buscado marcadores comuns dos diferentes estádios do desenvolvimento da embriogênese somática e zigótica (Klimaszewska *et al.,* 2004; Domoki *et al.*, 2006; Namasivayam, 2007; Sghaier *et al.*, 2008). Abordagens integrativas da embriogênese zigótica e somática são fundamentais para o a compreensão destes processos,

estabelecimento de protocolos eficientes, e que mimetizem as condições necessárias para o correto desenvolvimento embrionário (Garcia-Mendiguren *et al.*, 2015).

O emprego da embriogênese somática pode ter diferentes objetivos, que vão desde a obtenção de um modelo de referência para estudos básicos em biologia celular e molecular, fisiologia e bioquímica, até a propagação clonal, visando à conservação e o melhoramento genético das espécies (Floh *et al.*,2015). Como modelo para estudo de um processo morfogenético, a embriogênese somática é ideal para investigar o processo de diferenciação em plantas, bem como os mecanismos de totipotencialidade da célula vegetal. Incluem-se aqui abordagens diferenciais da competência celular que é definida como o potencial de reprogramação de uma célula em resposta a sinais específicos, por meio de processos de desdiferenciação e rediferenciação (Floh *et al.*, 2007). Adicionalmente, a ES permite eliminar as dificuldades encontradas em se analisar os estádios iniciais da embriogênese zigótica, durante o desenvolvimento do embrião no interior do tecido materno (Smertenko e Bozhkov, 2014). Como exemplo, estão as fases pró-embrionária e embrionária inicial, caracterizadas como de difícil ou impossíveis manipulações nas condições *in vivo*.

Sistemas de embriogênese somática e micropropagação têm sido utilizados, com relativo sucesso, para diferentes sistemas vegetais, objetivando a multiplicação e conservação de espécies lenhosas, em especial gimnospermas (Jain e Ishii, 1998; Klimaszewska *et al.*, 2016; Ballester *et al.*, 2016), sejam aquelas de interesse comercial ou ameaçadas de extinção, para futuros programas de reflorestamento clonal (Guerra *et al.*, 2000; Neale e Kremer, 2011; Santa-Catarina *et al.*, 2013). A utilização da cultura de tecidos, mais especificamente da embriogênese somática, como uma técnica biotecnológica, possibilita que sejam transpostas barreiras e dificuldades encontradas na propagação convencional de espécies nativas recalcitrantes (Santa-Catarina *et al.*, 2013). Comparativamente às demais técnicas de micropropagação, a embriogênese somática apresenta as seguintes vantagens sobre outros sistemas de propagação *in vitro*: a) permite a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); b) o sistema permite um alto grau de automatização (biorreatores), permitindo baixar os custos por unidade produzida; c) os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e qualidade genética; d) pode ser utilizada como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento vegetal; e) e como ferramenta para pesquisa de genômica funcional em coníferas, por meio da transformação genética (Högberg *et al.*, 1998; Guerra *et al.*, 1999; Santa-Catarina *et al.*, 2013; Klimaszewska *et al.*, 2016).

A modulação da embriogênese somática pode ser dividida em quatro etapas distintas (Figura 2):

a) Etapa de indução **–** tem início após a inoculação dos explantes em meio de cultura suplementado ou não com reguladores de crescimento, especialmente auxinas e citocininas (von Arnold *et al.*, 2002), ou ainda com a aplicação de condições estressantes como baixas temperaturas e exposição a luz, estressores osmóticos, aumento ou diminuição na concentração salina ou então do pH do meio de cultura (Lee *et al.*, 2001). Frequentemente, para o estabelecimento das culturas embriogênicas (CEs) em espécies arbóreas são utilizados embriões imaturos como explantes iniciais (Stasolla e Yeung, 2003; Klimaszewska *et al.*, 2007; Klimaszewska *et al.*, 2016). A presença, na superfície do explante, de um calo branco-translúcido indica o início da formação das massas proembriogênicas (MPEs) (von Arnold *et al.*, 2002; Stasolla e Yeung, 2003);

b) Etapa de multiplicação ou proliferação **–** quando alteradas as concentrações de auxinas e citocininas, suplementadas ao meio de cultura, as CEs podem ser proliferadas e/ou multiplicadas. Frequentemente os ciclos de subcultivos, que dão origem às novas MPEs, ocorrem de duas a três semanas em meio semi-sólido ou líquido (von Arnold *et al.*, 2002; Stasolla e Yeung, 2003). Com base na morfologia, organização celular e número de células, podem ser identificados diferentes padrões de MPEs, descritas como: a) **MPE I**, composta por uma célula do suspensor vacuolizada adjacente as células embrionárias com citoplasma denso; b) **MPE II**, composta por agregados celulares similares a MPE I, entretanto com mais de uma célula do suspensor; c) **MPE III** caracterizada por um agregado com um número maior de células, constituído por células do suspensor e embrionárias, as quais formam agregados sem qualquer padrão de organização (von Arnold *et al.*, 2002);

c) Etapa de maturação – a partir da formação das MPE III e a retirada dos reguladores de crescimento ocorre a formação do ES inicial (Filonova *et al.*, 2000; von Arnold *et al.*, 2002). A adição de promotores da maturação, como o ABA, poliaminas e agentes osmóticos, promovem a inibição da proliferação e a evolução dos embriões somáticos (Attre e Fowke, 1993; Stasolla *et al.*, 2002; von Arnold *et al.*, 2002; Stasolla e Yeung, 2003). Durante a maturação são observadas as várias etapas da embriogênese tardia, incluindo os estádios globular e cotiledonar. Nesta evolução podem ser identificados diferentes eventos morfológicos (histodiferenciação da protoderme, crescimento axial e radial do embrião, desenvolvimento e expansão dos cotilédones, degradação do suspensor e desenvolvimento dos meristemas) e bioquímicos (acúmulo de substâncias de reserva,

redução da atividade metabólica e aquisição da tolerância à dessecação) (Stasolla e Yeung, 2003; von Arnold *et al.*, 2002);

d) Etapa de germinação e estabelecimento da plântula – após sua completa formação, a transferência dos ES para meios isentos de reguladores de crescimento permite a germinação e subsequente desenvolvimento da plântula (Attre e Fowke, 1993; Stasolla e Yeung, 2003; von Arnold *et al.*, 2002). O posterior desenvolvimento do sistema radicular permite a transferência destas plântulas para uma condição *ex vitro* (Högberg *et al.*, 2003).

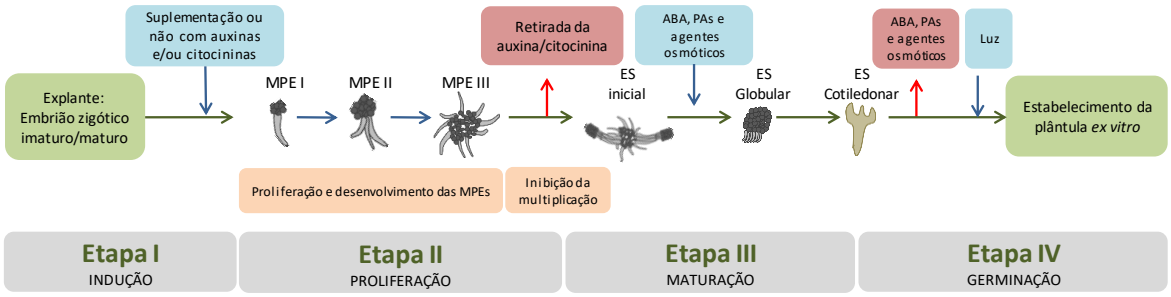

Figura 2. Esquema do desenvolvimento da embriogênese somática em coníferas. ABA, ácido abscísico; ES, embrião somático; MPEs, massas proembriogênicas; PAs, poliaminas. Fonte: Adaptado de Stasolla e Yeung (2003), von Arnold *et al.* (2002), Steiner *et al.* (2008) e Jo (2012).

O primeiro relato da obtenção de embriões somáticos em gimnospermas foi realizado por Norstog e Rhamstine (1967) utilizando embriões zigóticos de *Zamia* spp. Para coníferas o processo foi inicialmente descrito para *Picea abies* (Chalupa, 1985; Hakman e von Arnold, 1985; Hakman *et al.*, 1985) e *Larix decidua* (Nagmani e Bonga, 1985), e atualmente está descrito para 30 espécies da família Pinaceae e para espécies das famílias Cupressaceae (quatro), Taxaceae (uma), Podocarpaceae (uma), Cephalotaxaceae (uma) e Araucariaceae (uma) (Guerra *et al.*, 2016; Klimaszewska *et al.*, 2016; Fraga *et al.*, 2016).

O uso da ES em coníferas tem proporcionado a produção de embriões em larga escala, como por exemplo em *Picea glauca*, onde é possível a obtenção de aproximadamente 300 embriões somáticos a partir de 50 mg (peso fresco) de células em proliferação (Klimaszewska *et al.*, 2016). Além disso, a criopreservação de CEs tem sido obtida com sucesso em pelo menos 26 espécies, incluindo aquelas pertencentes ao gênero *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* e *Pseudotsuga* (Cyr e Klimaszewska, 2002; Klimaszewska *et al.*, 2016). Entretanto, a genótipo-dependência, a rápida perda do potencial embriogênico após poucos

meses de subcultivo e a baixa taxa de embriões somáticos formados durante a maturação, devido as diversas condições impostas nessa etapa, tem impedido o emprego da ES na regeneração de plantas de algumas coníferas (Santa-Catarina *et al.,* 2013). Apesar de inúmeros protocolos de ES já terem sido estabelecidos para espécies de coníferas, grande parte do sucesso obtido ainda se restringe aos membros da família *Pinaceae* (Lelu-Walter *et al.,* 2013). Para as demais famílias de coníferas ainda existem uma série de limitações que impossibilitam a regeneração de plantas via ES (Sutton, 2002).

Grande parte destas dificuldades estão associadas às condições de cultivo empregadas (estímulos físicos e químicos) ainda ineficazes para o correto desenvolvimento embrionário *in vitro* (Santa-Catarina *et al.,* 2013). Com isso, estudos comparativos envolvendo abordagens moleculares, incluindo proteômica e transcriptômica, têm levado a identificação molecular e caracterização funcional dos vários genes envolvidos na indução e desenvolvimento do embrião somático (Vestman *et al.,* 2011; Champagne *et al.,* 2013; Martin *et al.,* 2013; Elbl *et al.,* 2015a; dos Santos *et al.,* 2016).

Estudos dos diferentes aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares nestas várias fases são fundamentais para a compreensão dos processos básicos da diferenciação celular, bem como para o estabelecimento de protocolos mais eficientes de propagação através da embriogênese somática. Destaca-se que a indução e controle da embriogênese somática são dependentes da fonte de explante, do genótipo da planta matriz, e do tipo e concentração dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura (Guerra *et al.,* 1999; Steiner *et al.,* 2008; Santa-Catarina *et al.,* 2013).

3. Poliaminas

As poliaminas (PAs) são substâncias de ampla distribuição nos seres vivos tendo sido identificadas em bactérias, fungos, animais e plantas (Vuosku *et al.,* 2006; Majumdar *et al.,* 2013; Lasanajak *et al.,* 2014). A presença em cristais de sêmen humano foi descrita por Antonie van Leeuwenhoek, em 1678, embora a sua constituição bioquímica tenha sido determinada em 1924, e a sua síntese realizada dois anos mais tarde (Wallace *et al.,* 2003).

A natureza policatiônica, associada às interações eletrostáticas observada junto a diversas macromoléculas essenciais (DNA, RNA, fosfolipídeos e proteínas), fazem com que as PAs apresentem funções essenciais para a sobrevivência da célula. Estudos destacam a sua interação com a cromatina (afetando as modificações epigenéticas do DNA), processamento do RNA, tradução e ativação de proteínas (Childs *et al.,* 2003; Vuosku *et al.,*

2006; Kusano *et al.*, 2007; Baron e Stasolla, 2008; Vuosku *et al.*, 2012; Minocha *et al.*, 2014). Acredita-se também que as PAs podem agir tanto como um sequestrador de radicais livres, protegendo o DNA de espécies reativas de oxigênio, bem como gerador dos mesmos, através de seu catabolismo, liberando peróxido de hidrogênio (Aloisi *et al.*, 2016).

Em plantas, as PAs têm sido consideradas como uma nova classe de reguladores de crescimento (Kakkar *et al.*, 2000; Bais e Ravinshanlar, 2002; Steiner *et al.*, 2007; Steiner *et al.*, 2008; Lasanajak *et al.*, 2014). Geralmente estão envolvidas nas respostas ao estresse biótico e abiótico (Baron e Stasolla, 2008; Alcázar *et al.*, 2010). Entretanto, estudos também indicam seu envolvimento na morfogênese, agindo na divisão e diferenciação celular, morte celular programada, embriogênese, formação das raízes, iniciação e desenvolvimento floral, crescimento do tubo polínico, desenvolvimento e amadurecimento de frutos, metabolismo secundário, senescência, sinalização e balanço de N:C (Bouchereau *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2006; Kuznetsov e Shevyakova, 2007; Kusano *et al.*, 2008; Steiner *et al.*, 2008; Gemperlová *et al.*, 2009; Alcázar *et al.*, 2010; Kovács *et al.*, 2010; Moschou *et al.*, 2012; Tavladoraki *et al.*, 2012; Majumdar *et al.*, 2013; Minocha *et al.*, 2014; Lasanajak *et al.*, 2014; Majumdar *et al.*, 2016).

As PAs mais comuns nos vegetais são: putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) (Silveira *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2012; Jo *et al.*, 2014; de Oliveira *et al.*, 2017) (Figura 2). Em alguns casos, a termoespermina (tSpm), pode ocorrer em conjunto ou substituindo a Spm (Minocha *et al.*, 2014; Pál *et al.*, 2015). As PAs podem ser encontradas nas formas de aminas livres ou conjugadas (Minocha *et al.*, 2014; Pál *et al.*, 2015). Na sua forma conjugada, elas geralmente ocorrem associadas com pequenas moléculas, tais como os ácidos fenólicos, ou ligadas a macromoléculas (Pál *et al.*, 2015). Em células vegetais, as PAs são frequentemente armazenadas no vacúolo e na parede celular, entretanto, a Spm também está presente no núcleo celular (Belda-Palazon *et al.*, 2012; Aloisi *et al.*, 2016).

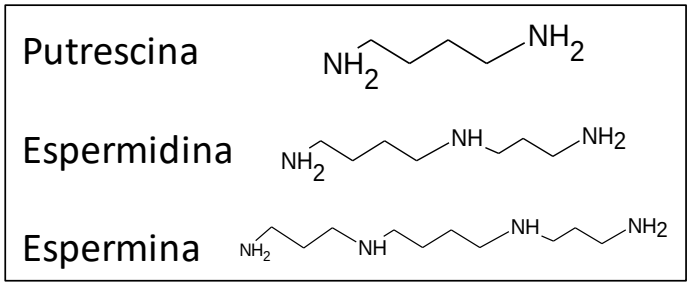

Figura 3. Estrutura molecular das poliaminas putrescina, espermidina e espermina. Fonte: de Oliveira (2017).

3.1. Metabolismo de poliaminas em plantas

Os níveis endógenos de PAs nas células são afetados por sua biossíntese, degradação, influxo e efluxo celular, compartimentalização e mecanismos de conjugação (Tiburcio *et al.*, 1997; Kusano *et al.*, 2007; Carbonell e Blázquez, 2009; Jiménez-Bremont *et al.*, 2014). Embora existam relatos de trabalhos sobre o estudo do metabolismo de PAs em gimnospermas desde a década de 90, os mecanismos moleculares da ação das PAs ainda não foram totalmente elucidados, e pouco se sabe sobre a sua função a nível celular em coníferas (Vuosku *et al.*, 2006; Jiménez-Bremont *et al.*, 2014).

Revisões abordando e descrevendo a biossíntese e catabolismo das PAs foram recentemente publicadas (Liu *et al.*, 2015; Jancewicz *et al.*, 2016; Majumdar *et al.*, 2016). Em plantas, a biossíntese de Put, pode ocorrer através de duas rotas independentes, reguladas por duas diferentes enzimas (Figura 4) (Jiménez-Bremont *et al.*, 2014; Majumdar *et al.*, 2016) ou seja: a primeira rota se inicia com a descarboxilação do aminoácido arginina, pela ação da enzima arginina descarboxilase (ADC; EC 4.1.1.19), localizada principalmente no cloroplasto em células fotossintéticas e direcionada ao núcleo em células não-fotossintéticas (Bortolotti *et al.*, 2004). O produto desta reação é a agmatina, a qual é subsequentemente metabolizada a *N*-carbamoilputrescina e em Put, pela ação das enzimas agmatina deiminase (AIH; EC 3.5.3.12) e *N*-carbamoilputrescina amidohidrolase (CPA; EC 3.5.1.53), respectivamente (Alcázar *et al.*, 2010; Vuosku *et al.*, 2006); a segunda rota inicia com o aminoácido ornitina, o qual é convertido em Put, em uma única reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (ODC; EC 4.1.1.17), encontrada principalmente no citosol de células vegetais (Jiménez-Bremont *et al.*, 2014). A partir da Put pode ocorrer a síntese da Spd e Spm, onde a S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM) atua como doador de grupos aminopropil, gerados pela ação da enzima S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC; EC 4.1.1.50) (Figura 3). A síntese da Spd e Spm é controlada por uma combinação da SAMDC e mais duas aminopropiltransferases, chamadas espermidina sintase (SPDS; EC 2.5.1.16) e espermina sintase (SPMS; EC 2.5.1.22) (Shao *et al.*, 2014; Majumdar *et al.*, 2016). A biossíntese de PAs e etileno são ligadas através da SAM, o qual é um precursor comum entre esses dois metabolismos (Bouchereau *et al*., 1999; Bais e Ravishankar, 2002; Silveira *et al*., 2006; Jo *et al*., 2014).

A biossíntese de PAs está relacionada com o fluxo metabólico de outros aminoácidos, como o glutamato, ornitina, arginina, prolina, citrulina e metionina (Majumdar *et al.*, 2016). A biossíntese de arginina ocorre via citrulina, a partir da ornitina (Figura 3), o

qual envolve a ação de três enzimas: ornitina carbamoiltransferase (OTC; EC 2.1.3.3), argininosuccinato sintase (ASS; EC 6.3.4.5) e argininosuccinato liase (ASL; EC 4.3.2.1). Por outro lado, a arginina pode ser convertida em ornitina em uma via simples, pela ação da arginase (EC 3.5.3.1), participando do ciclo da ureia. A arginina também pode ser convertida em citrulina e óxido nítrico (ON), como produtos pela ação da enzima óxido nítrico sintase (ainda não caracterizada em plantas) (Page *et al.*, 2012; Minocha *et al.*, 2014; Corpas e Barroso, 2014; Majumdar *et al.*, 2016; Santolini *et al.*, 2016). Juntos, o metabolismo das PAs e do glutamato conferem uma das maiores interações de vias na assimilação e particionamento do carbono e nitrogênio, apresentando uma ampla variedade de funções fisiológicas em plantas, produzindo outros aminoácidos, moléculas sinalizadoras, como o óxido nítrico, e GABA, que desempenham funções críticas no desenvolvimento vegetal e respostas ao estresse (Page *et al.*, 2012; Minocha *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2014; Majumdar *et al.*, 2016).

O catabolismo de PAs tem a ação de duas enzimas específicas: a poliamina oxidase (PAO; EC 1.5.3.3), que degrada tanto a Spm em Spd, como a Spd em Put, e a diamino oxidase (DAO; EC 1.4.3.6), ou amina oxidase contendo cobre (CuAO), que degrada a putrescina em Δ^{-1}-pirrolina, posteriormente em GABA e então direcionado para o ciclo do ácido tricarboxílico (Bhatnagar *et al.*, 2002; Minocha *et al.*, 2014; Majumdar *et al.*, 2016). Essas enzimas se localizam na parede celular, e o catabolismo das PAs acontece no apoplasto. Pesquisas tem demonstrado a importância do catabolismo das PAs no padrão da parede celular, através da liberação de H_2O_2 (produto do catabolismo) e influenciando os processos de lignificação e rigidez da parede (Moschou *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2015; Aloisi *et al.*, 2016).

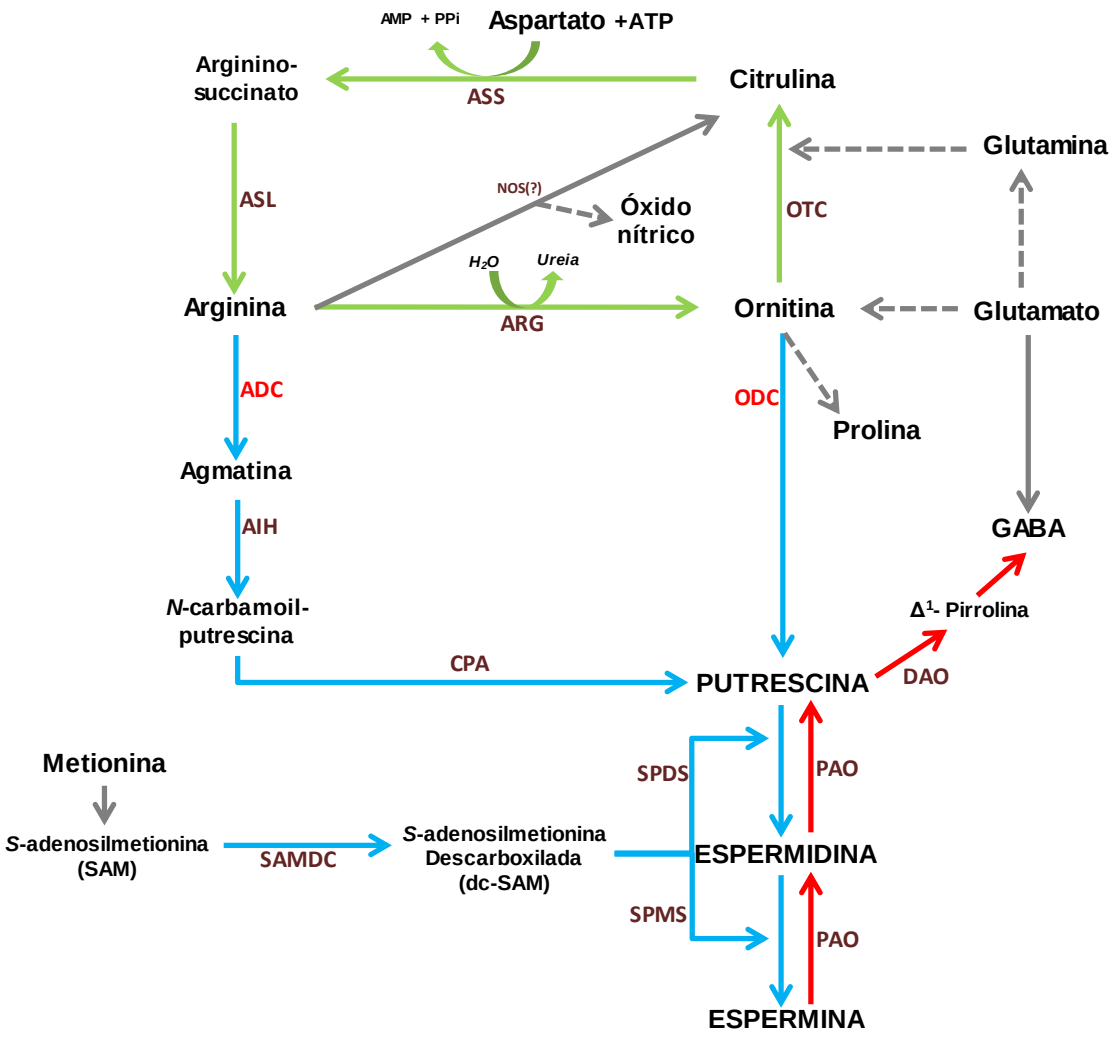

Figura 4. Vias de biossíntese da arginina/ornitina e poliaminas. AIH, agmatina deiminase; ARG, arginase; ADC, arginina descarboxilase; ASL, argininosuccinato liase; ASS, argininosuccinato sintase; CPA, N-carbamoilputrescina amidase; DAO, diamino oxidase; NOS, óxido nítrico sintase (putativa); ODC, ornitina descarboxilase; OTC, ornitina carbamoiltransferase; PAO, poliamina oxidase; SAMDC, S-adenosilmetionina descarboxilase; SPDS, espermidina sintase; SPMS, espermina sintase. Fonte: de Oliveira (2017).

3.2. Importância das poliaminas na embriogênese

A importância das PAs no processo de embriogênese zigótica tem sido amplamente estudada no sistema *Arabidopsis thaliana*. Grande parte deste conhecimento está relacionado com a utilização de mutantes das principais enzimas das vias de biossíntese como ADC, ODC, SPDS, SPMS e SAMDC (Imai *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006).

Diferentes funções podem ser associadas a cada rota biossintética (ADC ou ODC), as quais podem ser tecido-específica e terem uma regulação distinta, dependendo das condições fisiológicas do material (Kumar *et al.*, 1997; Page *et al.*, 2012; Majumdar *et al.*, 2013; Minocha *et al.*, 2014). Ressalta-se que a via da ODC é geralmente identificada como mais ativa em células e tecidos com intensa atividade de divisão celular, como por exemplo, nos meristemas (Hummel *et al.*, 2004; Vuosku *et al.*, 2006), enquanto que a atividade da ADC tem sido encontrada em células em processo de alongamento, células embrionárias e células expostas a vários tipos de estresse (Tiburcio *et al.*, 1997; Vuosku *et al.*, 2006). Diferenças também foram observadas nos vários sistemas vegetais. Durante a embriogênese zigótica de *Pinus sylvestris* foi identificada a existência das duas rotas de biossíntese de PAs com o predomínio da ADC para a produção da Put. Entretanto, em *Arabidopsis thaliana*, bem como em outras espécies da família Bracicaceae, a ODC é ausente e a biossíntese só ocorre via a ADC (Hanfrey *et al.*, 2001).

Alterações nos perfis e conteúdo de Put, Spd e Spm ocorrem durante as diferentes fases de desenvolvimento *in vivo* dos embriões zigóticos, sugerindo a sua utilização como marcador bioquímico da diferenciação celular (Minocha *et al.*, 1999, Astarita *et al.*, 2003c, Silveira *et al.*, 2004). Em *Pinus radiata* (Minocha *et al.*, 1999), *P. taeda* (Silveira *et al.*, 2004), *P. silvestrys* (Vuosku *et al.,* 2006) e *P. abies* (Malá *et al.*, 2009) o conteúdo de Put é alto nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário, em comparação a Spd e Spm. Contudo, durante as fases de estabelecimento dos meristemas apical e radicular, alongamento dos cotilédones e acúmulo de substâncias de reserva, a Spd passa a ser a PA predominante em relação à Put e Spm (Minocha *et al.,* 1999; Vuosku *et al.,* 2006).

Embora as PAs demonstrem grande importância durante o desenvolvimento dos embriões zigóticos (Minocha *et al.*, 1999; Astarita *et al.*, 2003b, 2003c; Silveira *et al.*, 2004; Vuosku *et al.*, 2006; Kusano *et al.*, 2008; Gemperlová *et al.*, 2009), ainda é desconhecido a relação da expressão gênica e as mudanças associadas com a biossíntese de PAs e arginina/ornitina durante o desenvolvimento de sementes. Em coníferas, como ainda não existe a disponibilidade de mutantes, o estudo do metabolismo de PAs tem sido baseado no uso de precursores marcados, quantificação por HPLC, ensaios enzimáticos, e estudos de expressão gênica (Gemperlová *et al.*, 2009; Vuosku *et al.*, 2006; Vuosku *et al.*, 2012).

A participação das PAs no desenvolvimento do embrião somático foi primeiramente descrita por Montague *et al.* (1978) em *Daucus carota*. Desde então, diversos trabalhos têm confirmado a importância das PAs para o desenvolvimento embrionário *in*

vitro em diferentes sistemas (Astarita *et al.*, 2003a; Silveira *et al.*, 2006; Steiner *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2012; Santa-Catarina *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015; Salo *et al.*, 2016). Em *Allium cepa*, a adição de Put associada com a Spd promove a indução de embriões somáticos, enquanto que a presença apenas da Spd estimula a maturação e a conversão de embriões em plantas (Martinez *et al.*, 2000). Em *Daucus carota* a Spm estimula a formação de embriões somáticos (Takeda *et al.*, 2002). Baixas concentrações de ABA e de Put e níveis elevados de Spd foram associadas às altas taxas de conversões de embriões somáticos em *Quercus petraea* (Cvikrová *et al.*, 1998).

Os maiores níveis de Put estão associadas à intensa atividade de divisão celular, que ocorre durante a fase de proliferação celular da embriogênese somática (Feirer, 1995; Minocha *et al.*, 2004). Durante a fase de maturação a qual está associada à diferenciação celular são observadas maiores concentrações de Spd e Spm (Minocha *et al.*, 1999; Stasolla *et al.*, 2002; Minocha *et al.*, 2004; Gemperlová *et al.*, 2009). A Spm é considerada biologicamente mais ativa que as demais PAs, atuando em diferentes processos como: estabilização das membranas celulares pela redução do transporte transmembrana dos fosfolipídios, interagindo com proteínas nucleares que determinam a configuração espacial do DNA, estimulando a atividade da síntese de pectinas e hemicelulose, além de exercer ação antioxidante (Bouchereau *et al.*, 1999).

A adição de Spd e Spm ao meio de cultura pode induzir a formação de ON em culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* (Santa-Catarina *et al.,* 2007) e *A. angustifolia* (Silveira *et al.*, 2006) e em plântulas de *Arabidopsis thaliana* (Tun *et al.*, 2006). Estes trabalhos foram pioneiros e constituem as primeiras evidencias da relação em plantas de PAs e ON, bem como da importância deste processo de sinalização na competência e formação de embriões somáticos. A associação entre poliaminas e ON vem proporcionando novas perspectivas para o estudo da biossíntese e catabolismo de PAs e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em gimnospermas. Esses aspectos indicam que as PAs podem conferir maior tolerância a variados tipos de estresse atuando na remoção de espécies reativas de oxigênio e na estabilização das membranas celulares (Larher *et al.*, 2003; Groppa & Benavides, 2008).

Em espécies arbóreas, estudos indicam que as PAs estão envolvidas no estabelecimento da competência dos tecidos em produzir uma resposta à indução embriogênica e, portanto, serem utilizadas como marcadores para a identificação precoce de linhagens com diferentes capacidades embriogênicas (Niemi *et al.*, 2002; Silveira *et al.*,

2006; Nakagawa *et al.*, 2011; Santa-Catarina *et al.*, 2013). Segundo Shoeb *et al.* (2001), os níveis celulares de PAs e a relação Put/Spd constituem importantes biomarcadores da capacidade regenerativa em um sistema vegetal. Uma menor razão Put/Spd foi associada a intensa diferenciação de embriões somáticos globulares em culturas de *P. sylvestris* (Niemi *et al.*, 2002).

4. A *Araucaria angustifolia* como modelo de estudo

4.1. A escolha do sistema

O gênero *Araucaria* é composto por 19 espécies, constituindo o mais abundante dentro da família Araucariaceae, presente em parte da Oceania, sudeste Asiático e América do Sul (Liu *et al.*, 2009). A *A. angustifolia* (Bertol.) Kuntze é uma espécie arbórea nativa do Brasil, dominante nas formações de Floresta Ombrófila Mista (Guerra *et al.*, 2002). Existente há mais de 300 milhões de anos, a espécie pertence a um dos grupos mais basais dentre as coníferas ainda vivas (Ordem Pinales) (Liu *et al.*, 2009). Apesar da sua ampla distribuição no período mesozóico, as mudanças edafoclimáticas sofridas após a separação dos continentes (Haworth *et al.*, 2011) e o surgimento das angiospermas, fizeram com que a *A. angustifolia* ficasse restrita a regiões de altitude no sul da América do Sul (Zonnenveld, 2012), com ocorrência natural nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, podendo também ser encontrada e em áreas esparsas de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Argentina e Paraguai (Auler *et al.*, 2002; Guerra *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2009).

A *A. angustifolia* possui um papel fundamental na estrutura e funcionamento dos ecossistemas nos quais está inserida, sendo fonte de recursos também para os seres humanos. Sua área original era de aproximadamente 200 mil Km² (Guerra *et al.*, 2000; Auler *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2002; Guerra *et al.*, 2002). Entretanto, em função da alta qualidade da sua madeira, a espécie foi intensivamente explorada ao longo de sua história, de modo que atualmente restam somente 2% da área original por ela ocupada (Figura 4) (Guerra *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2002). Adicionalmente, a redução da Floresta Ombrófila Mista resultou na degradação das populações de Araucária, o que dificulta ainda mais sua regeneração natural (Shimizu *et al.*, 2000). Como consequência, a espécie foi classificada como "criticamente em perigo de extinção" pela Lista Vermelha de Espécies ameaçadas da IUCN (The World Conservation Union) (disponível em: http://www.iucnredlist.org/details/32975/0, acesso em dezembro de 2016), e "em perigo" no Livro Vermelho da Flora do Brasil (Martinelli e Moraes, 2013), dados que foram

insuficientes, entretanto, para o recuo na exploração dos remanescentes florestais por ela ocupados (Guerra *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*,2006). Somado a isso, o aquecimento global é outro fator que poderá afetar diretamente a Araucária, uma vez que a espécie necessita de baixas temperaturas e elevada umidade relativa para se desenvolver adequadamente (Souza e Aguiar, 2012).

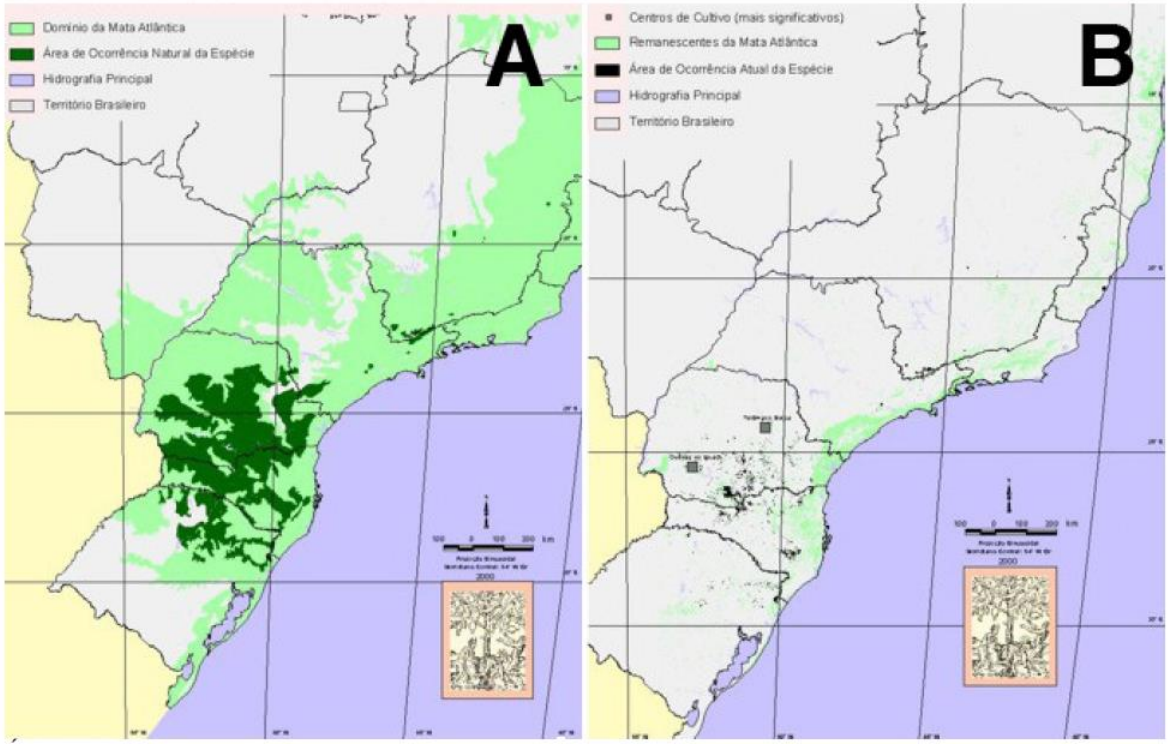

Figura 4. Distribuição geográfica da espécie *Araucaria angustifolia* no Brasil. Área de ocorrência destacada em verde escuro. Distribuição no início do século XX (**A**), e a área de cobertura atual da espécie (**B**). Fonte: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (2012).

Além da exploração exacerbada da espécie, a dificuldade da recuperação natural de sua população também está ligada ao seu ciclo de vida longo, que leva em torno de 15 anos até atingir a maturidade reprodutiva (Garcia, 2002). A polinização inicia-se em setembro, e estende-se até dezembro, com o amadurecimento das sementes no período de março a julho. Sua fenologia é irregular, e seu ciclo reprodutivo leva, em geral, em torno de dois a quatro anos, considerando-se o início do desenvolvimento do cone feminino até a dispersão das sementes (Shimoya, 1962; Sousa e Hattemer, 2003a, 2003b; Mantovani *et al.*, 2004).

Outro ponto que dificulta sua conservação é o fato de suas sementes apresentarem características recalcitrantes, e consequentemente a sua reduzida longevidade e viabilidade dificultam o armazenamento e conservação, resultando em um curto período de vida pós-colheita (Balbuena *et al.*, 2009; Pieruzzi *et al.*, 2011; Berjak e Pammenter, 2013; Araldi *et al.*, 2016). De acordo com Santos (2000), a conservação de pólen ou o cultivo *in vitro* de suas estruturas vegetativas, são alternativas de maior viabilidade quando comparadas a conservação utilizando sementes. A macropropagação, e os métodos convencionais de propagação dessa espécie, são dificultados pelo estádio de maturação dos propágulos, seja via estaquia ou enxertia, em função do plagiotropismo e crescimento lateral dos explantes (Kageyama e Ferreira, 1975; Wendling, 2011).

Assim, outras estratégias como é o caso de técnicas biotecnológicas, devem ser adotadas para assegurar a sobrevivência da espécie. Salienta-se que estas metodologias apresentam um grande potencial de aplicação nos programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma de *A. angustifolia* (Steiner *et al.*, 2008; Pieruzzi *et al.*, 2011). Dentre as técnicas biotecnológicas, a micropropagação, através da embriogênese somática, é considerada como a mais promissora em plantas, para a clonagem massal de genótipos superiores (Steiner *et al.*, 2008) bem como para conservação *ex situ* de germoplasma de espécies em risco de extinção (Johnson *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2012).

Associado a estas abordagens, estudos utilizando a *A. angustifolia* como modelo ou sistema referência, para estudos básicos dos processos de diferenciação, totipotencialidade e desenvolvimento embrionário são muito escassos. Em partes, a dificuldade em se estudar os processos de embriogênese desta espécie se deve à natureza recalcitrante das sementes, dificuldade em isolar os estádios iniciais do desenvolvimento dos embriões, referente a proembrionia, além do fato de seu ciclo reprodutivo ser longo.

4.2. Embriogênese zigótica

O desenvolvimento proembrionário na família Araucariaceae é considerado como um dos mais basais, e divergentes em relação às demais Coniferophytas (Johansen, 1950; Durzan, 2012). Diferentemente ao descrito para as demais famílias de coníferas, onde ocorre a formação de até quatro núcleos livres, em espécies de Araucariaceae há a formação de 32 a 64 núcleos livres, formadas logo após a fusão dos gametas masculinos e femininos, e que precede a formação das paredes celulares (Guerra *et al.*, 2008). Esta estrutura não fica posicionada nas extremidades do arquegônio, mas sim em uma posição central onde os

proembriões se formam (Raghavan e Sharma, 1995; Durzan, 2012; Floh *et al.*, 2015). A polaridade dos proembriões ocorre pela organização dos núcleos livres, constituindo três tipos celulares bem definidos: as células do suspensor, da capa e do grupo embrionário (Guerra *et al*., 2008). A presença de uma camada de células denominada de capa, e o desenvolvimento de um proeminente sistema de suspensor secundário são consideradas características exclusivas da família Araucariaceae (Durzan, 2012; Floh *et al.*, 2015).

Nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário, o suspensor constitui a principal via de transporte de nutrientes para o proembrião o qual degenera após o final do estádio proembrionário (com o rompimento da arquegônia) (Astarita e Guerra, 2000). Neste estádio foi demonstrado a ocorrência de um aumento nos níveis de AIA (Astarita *et al.*, 2003a). Destaca-se que este fitormônio está diretamente relacionado com o estabelecimento da simetria e polaridade (eixo ápice-base) do embrião. A formação dos cotilédones é caracterizada por um aumento no número e tamanho das células, devido à presença de proteínas e um grande número de grãos de amido (Guerra *et al*., 2008; Rogge-Renner *et al*., 2013). A seguir tem início a fase de maturação da semente com um aumento da concentração do ácido abscísico (ABA) durante a fase pré-cotiledonar dos embriões zigóticos, seguido de uma diminuição nos níveis durante as fases da embriogênese tardia (estádio cotiledonar e maturo) (Silveira *et al.*, 2008). O ABA desempenha um papel fundamental no processo de maturação dos embriões zigóticos sendo a sua presença associada ao aumento na concentração de lipídeos e acúmulo de proteínas de reserva. Adicionalmente, a diminuição do ABA na embriogênese tardia, pode estar associada ao comportamento recalcitrante das sementes de *A. angustifolia*, ou seja, elas mantêm altos teores de água, são sensíveis à dessecação e continuam metabolicamente ativas até a germinação (dos Santos *et al*., 2006; Pieruzzi *et al*., 2011).

A associação entre PAs e os processos de embriogênese zigótica em *A. angustifolia,* tem sido reportado em diversos trabalhos (Astarita *et al*., 2003*c*; Silveira *et al*., 2004; Silveira *et al*., 2006; Steiner *et al*., 2007; Jo *et al*., 2014; de Oliveira *et al*., 2017). Neste sistema vegetal, o perfil de PAs é caracterizado por uma redução brusca dos níveis de Put, e aumento da Spm durante as fases da embriogênese tardia (estabelecimento dos meristemas e formação dos cotilédones) (Astarita *et al.,* 2003a, 2013b; Pieruzzi *et al.*, 2011). Conteúdos elevados de Spd e Spm são essenciais ao final do desenvolvimento do embrião, quando o crescimento é decorrente, principalmente, do alongamento celular (Silveira *et al.,* 2006). Adicionalmente, as PAs também estão relacionadas com os eventos pós-embriogênicos, se apresentando

também como marcadores do término da germinação das sementes de *A. angustifolia* (Pieruzzi *et al.*, 2011).

A presença de proteínas estádio-específicas, sugeridas como marcadores bioquímicos foram identificadas ao longo do processo de embriogênese zigótica de *A. angustifolia* (Silveira *et al.*, 2008; Balbuena *et al.*, 2011). Destaca-se que nas etapas iniciais do desenvolvimento embrionário ocorre maior expressão do metabolismo do estresse oxidativo, enquanto que nas fases tardias da embriogênese ocorre o acúmulo de proteínas de reserva (Balbuena *et al.*, 2009, 2011). A expressão diferencial de oito genes (Argonaute (*AaAGO*), Cup-shaped cotyledon1 (*AaCUC*), wushel-related WOX (*AaWOX*), S-locus lectin protein kinase (*AaLecK*), Scarecrow-like (*AaSCR*), Vicilin 7S (*AaVIC*), Leafy Cotyledon 1 (*AaLEC*), e Reversible glycosylated polypeptide (*AaRGP*)) durante o desenvolvimento das sementes de *A. angustifolia*, foi relatada por Schlogl *et al*. (2012a, b). Neste trabalho, os autores verificaram que genes relacionados a morfogênese (*AaAGO, AaCUC, AaWOX, AaLeckin, AaLEC, AaRPG-like*) e ao acúmulo de reservas na semente (*AaVIC*) foram mais expressos durante as fases globular e cotiledonar dos embriões zigóticos, enquanto que na fase de maturação foi possível observar uma diminuição no padrão de expressão.

A construção de uma plataforma de transcriptoma da *A. angustifolia* tem fornecido relevantes informações sobre os aspectos moleculares do desenvolvimento embrionário desta espécie, tanto na embriogênese zigótica como na somática (Elbl *et al.*, 2015a). Durante o desenvolvimento das sementes, os autores relataram que 13 genes foram diferencialmente expressos entre o estádio globular e cotiledonar. No estádio globular, foi identificada a expressão de genes envolvidos no armazenamento e biossíntese de carboidratos, enquanto que no estádio cotiledonar genes associados com a produção de metabólitos secundários e fatores responsivos ao etileno foram mais expressos. A comparação entre os estádios cotiledonar e maturo evidenciou 78 genes diferencialmente expressos. No estádio cotiledonar, foram identificados transcritos associados às categorias de processo do desenvolvimento e divisão celular, enquanto que no estádio maturo, foi observado maior abundância de transcritos relacionados com os fotossistemas e metabolismo da clorofila (Elbl *et al*., 2015a). A análise do transcriptoma evidenciou que a maioria dos unigenes identificados em *A. angustifolia* representam funções basais, comuns em Viridiplantae, mas também há genes compartilhados com espécies de Monocotiledôneas e Eudicotiledôneas, que podem representar funções que surgiram entre as espécies basais de Viridiplantae e gimnospermas (Elbl *et al*., 2015a).

4.3. Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia*

Os trabalhos com a embriogênese somática em *A. angustifolia* tiveram início com Guerra e Kemper (1992). Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos visando o aperfeiçoamento do protocolo para obtenção de embriões somáticos nesta espécie (Astarita e Guerra 1998, 2000; Guerra *et al.*, 2000; dos Santos *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2006; Steiner *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2008, 2010; Schlogl *et al.*, 2012a; Vieira *et al.*, 2012, Jo *et al.*, 2014).

Especificamente para *A. angustifolia*, as MPEs são originadas a partir do ápice do embrião zigótico imaturo em estádio globular (dos Santos *et al*., 2002), e podem ser induzidas e proliferadas em meio de cultura, na ausência de reguladores de crescimento (Figura 5). Este fato, apesar de ser considerado como uma vantagem, por amenizar os problemas associados à variação somaclonal, impossibilita a formação de poliembriões somáticos pela simples retirada das auxinas e citocininas do meio de cultura (dos Santos *et al.*, 2008). Como resultado, as culturas embriogênicas são formadas apenas por agregados celulares contendo células embrionárias e de suspensor com diferentes tamanhos, e por um baixo número de embriões somáticos globulares, os quais raramente evoluem para o estádio cotiledonar (dos Santos *et al*., 2008; de Oliveira *et al.*, 2015; Jo *et al*.,2014; Elbl *et al.*,2015a; dos Santos *et al*., 2016).

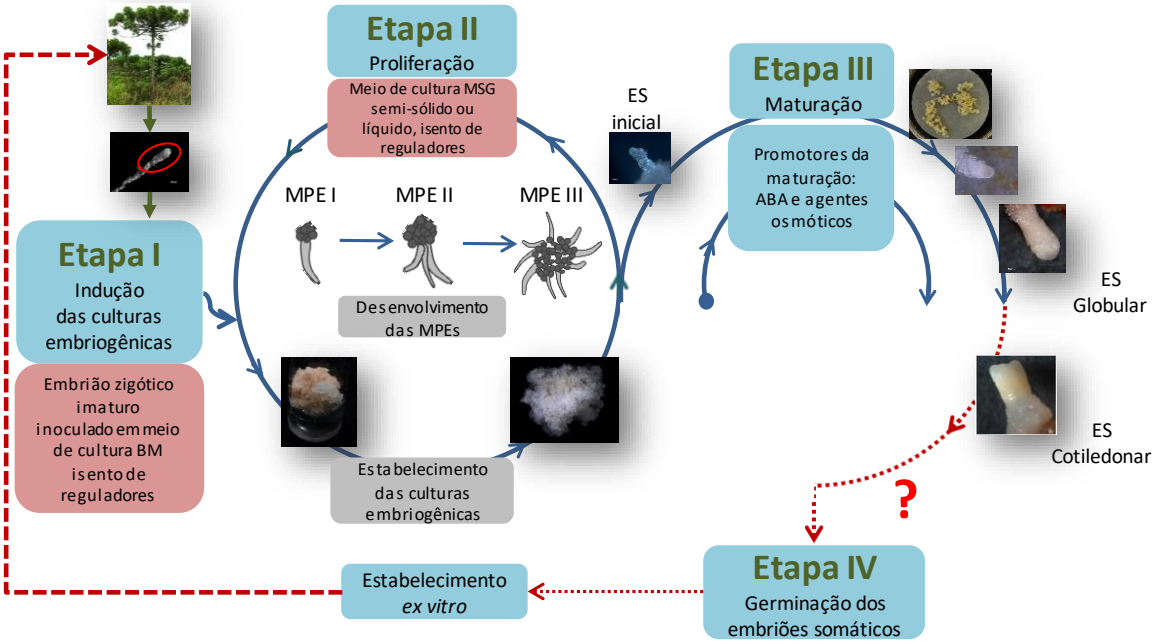

Figura 5. Esquema da modulação da embriogênese somática em *A. angustifolia*. MPE, massas proembriogênicas; ES, embrião somático; ABA, ácido abscísico; BM, BM (Gupta e Pullman, 1991); meio de cultura MSG básico (Becwar *et al.*, 1989). Caixas vermelhas indicam particularidades para este sistema. Caixas azuis indicam processos comuns aos protocolos para gimnospermas em geral. Linhas vermelhas tracejadas indicam as etapas nas quais o protocolo ainda não está completamente estabelecido. Fonte: Adaptado de Steiner *et al.* (2008) e Jo *et al.* (2014).

A ausência de embriões somáticos e a genótipo-dependência da resposta das culturas ao ABA tem dificultado a fase de maturação dos embriões de *A. angustifolia*, onde o ABA provoca a oxidação das estruturas embrionárias menos evoluídas morfologicamente (dos Santos *et al.*, 2008). Esta incapacidade de alguns genótipos apresentarem o desenvolvimento de embriões somáticos é geralmente identificada apenas nas etapas finais do processo de embriogênese, resultando na formação de embriões maduros com anormalidades, ou então com baixas taxas de conversão em plântulas (Stasolla *et al.*, 2002; Stasolla e Yeung, 2003; dos Santos *et al.*, 2006; Ochatt *et al.*, 2016). Adicionalmente, diversos estudos têm mostrado a influência da planta mãe na eficiência em várias etapas da embriogênese somática, como relatado em *Pinus sylvestris* (Lelu-Walter *et al.*, 2008; Aronen *et al.*, 2009; Vuosku *et al.*, 2009) e *A. angustifolia* (dos Santos *et al.*, 2002). Estes trabalhos demonstraram que a utilização de diferentes matrizes como doadores de explantes, tem revelado diferentes

respostas no estabelecimento de culturas embriogênicas e maturação dos embriões somáticos (Niskanen *et al.*, 2004; Montalbán *et al.*, 2012). Além disso, o efeito materno tem sido reportado como mais influente na indução e maturação dos embriões somáticos (Niskanen *et al.*, 2004). Neste sentido, a identificação de marcadores bioquímicos e moleculares para uma seleção precoce de genótipos aptos e competentes para a formação e evolução de embriões somáticos viáveis, é considerada importante para o aperfeiçoamento dos protocolos de embriogênese somática (Dowlatabadi *et al*., 2009; Klimaszewska *et al*., 2004; Lipert *et al*., 2005; Silveira *et al*., 2008; Jo *et al*., 2014; Elbl *et al*., 2015a; dos Santos *et al.*, 2016).

As altas concentrações endógenas de auxinas no embrião zigótico (Astarita *et al*., 2003a), fonte inicial das culturas, podem suprimir sua suplementação no meio de indução das culturas embriogênicas. Contudo, a possível manutenção dos altos níveis de auxinas endógenas (provenientes dos explantes utilizados na fase de indução) nas culturas embriogênicas, durante a fase de proliferação, possivelmente dificultam a transdiferenciação das massas embrionárias em embriões somáticos, e possivelmente afetam a morfologia dos estádios tardios do embrião somático. Esse fato foi observado ao avaliar-se o banco de transcritos de *A. angustifolia* (Elbl *et al*., 2015a), em que vinte e um genes relacionados à via de auxina e outras vias auxina-independentes foram identificados como possíveis promotores da inadequada formação e evolução dos embriões somáticos durante a fase de maturação (Elbl *et al*., 2016, dados não publicados).

Considerando-se as similaridades morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, estudos com abordagens integrativas dos processos de embriogênese somática e zigótica têm sido estudados em *A. angustifolia,* em especial pelo grupo do BIOCEL e associados (Silveira *et al*., 2006; Silveira *et al*., 2008; Balbuena *et al*., 2009, 2011; Steiner *et al*., 2007; Durzan *et al*., 2012; Steiner *et al*., 2012; Schlogl *et al*., 2012a, 2012b; Vieira *et al*., 2012; Elbl *et al.*, 2015a, 2015b; dos Santos *et al*., 2016). Adicionalmente, a manipulação do meio de cultura com relação ao metabolismo de aminoácidos (dos Santos *et al.* 2010), óxido nítrico (Silveira *et al.* 2006; Vieira *et al.* 2012) e poliaminas (Silveira *et al.*, 2006; Steiner *et al.*, 2007; Jo *et al.*, 2014) tem desencadeado mudanças morfológicas adequadas para a formação dos poliembriões somáticos. Este tipo de abordagem tem contribuído para o desenvolvimento de condições artificiais de cultivo semelhantes ao ambiente natural do desenvolvimento embrionário em coníferas, diminuindo o tempo para o estabelecimento e aumentando a eficiência dos protocolos de ES (Pullman *et al.* 2015).

Nesse aspecto, foram identificados marcadores relacionados aos perfis de expressão gênica e protéicos (Silveira *et al*., 2008; Jo *et al*. 2014; Elbl *et al*., 2015a; dos Santos *et al*., 2016; de Oliveira *et al*., 2017). Jo *et al.* (2014), utilizando linhagens responsiva (SE1) e bloqueada (SE6) para o tratamento de maturação, identificaram possíveis marcadores bioquímicos e moleculares associados à competência para embriogênese somática em *A. angustifolia.* Os resultados obtidos foram essenciais para a identificação de proteínas estádio-específicas de culturas celulares com alto potencial embriogênico, além de confirmarem a importância das vias de sinalização (poliaminas, aminoácidos, etileno, carboidratos, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e auxina) estudadas pelo grupo de pesquisa na temática (Silveira *et al*., 2006; Steiner *et al*., 2007; Silveira *et al.*, 2008; Balbuena *et al.*, 2009, 2011; Durzan *et al*., 2012; Steiner *et al*., 2012; Vieira *et al.*, 2012; Schlogl *et al*., 2012a, 2012b; Jo *et al*., 2014; Elbl *et al.*, 2015a, 2015b; dos Santos *et al*., 2016; de Oliveira *et al.*, 2017).

A ausência de um genoma de referência para a espécie constituiu um fator limitante para uma abordagem mais aprofundada neste sistema. Para contornar este problema, foi realizada uma plataforma de transcriptoma (Elbl *et al*., 2015a), que a partir daí tem sido referência para todos os trabalhos em desenvolvimento (Elbl *et al*, 2015 a, b; dos Santos *et al*., 2016; de Oliveira *et al.*, 2017). A montagem *de novo* do transcriptoma foi realizada utilizando-se três diferentes estádios de desenvolvimento da semente e duas linhagens celulares estabelecidas (SE1 e SE6) (Jo *et al*., 2014), tendo permitido: i) a identificação de unigenes, ii) obtenção dos perfis de expressão diferencial entre os diferentes estádios e linhagens celulares, e iii) a correlação destes perfis com os processos biológicos capazes de modular a embriogênese *in vitro* e *in vitro* no sistema *A. angustifolia* (Elbl *et al*., 2015a). Adicionalmente, foi construída uma base de dados comparativa entre os estádios globular da embriogênese somática e da zigótica, a qual permitiu a identificação dos possíveis genes relacionados com as anormalidades morfológicas. Além disso, foi elaborado um banco de dados de sequencias de proteínas o que permitiu pela primeira vez a identificação em larga escala de proteínas presentes em linhagens celulares embriogênicas de *A. angustifolia* (dos Santos *et al.*, 2016).

As atuais possibilidades de integração dos conhecimentos, obtidos ao longo dos anos, e os estudos de genômica funcional no sistema, tem acenado para resultados promissores e poderá ser fundamental para modular de forma correta o desenvolvimento embrionário *in vitro.* Além disso, um maior conhecimento dos aspectos moleculares envolvidos durante a

embriogênese poderá fornecer uma base de referência para o aperfeiçoamento das condições artificiais utilizadas durante o cultivo *in vitro* de *A. angustifolia*.

5. Contextualização da tese

Ao longo da última década, o Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL) do IBUSP vem estudando parâmetros morfofisiológicos, bioquímicos e moleculares, em torno do processo da embriogênese zigótica e somática em diferentes sistemas vegetais, com ênfase na *A. angustifolia*. As abordagens incluem o estudo e compreensão dos aspectos básicos (fisiológicos, bioquímicos e moleculares) na competência, determinação e diferenciação celular em uma arbórea nativa. Do ponto de vista biotecnológico, numa analogia com a embriogênese zigótica, os estudos visam o aperfeiçoamento das condições artificiais de cultivo *in vitro* de embriões somáticos. Neste contexto, insere-se a possibilidade de um aumento na quantidade, qualidade e evolução morfogenética, para *A. angustifolia*, com perspectivas de uso em programas de melhoramento genético que visam a propagação massal clonal de genótipos superiores e na conservação de material genético, via estabelecimento de bancos de germoplasma. Dentro desta perspectiva, o grupo de pesquisa vem utilizando metodologias inovadoras, que permitem um maior aprofundamento dos aspectos moleculares, e que incluem o estudo do transcriptoma (*high throughtput* (RNAseq) e de proteômica quantitativa (GeLC-MS/MS) (Elbl *et al.*, 2015a, b; dos Santos *et al*., 2016), aspectos bioquímicos e fisiológicos (Jo *et al.*, 2014; de Oliveira *et al*., 2017) responsáveis pela regulação do desenvolvimento embrionário do pinheiro brasileiro. Dentre as principais vias de sinalização celular estudadas, as PAs foram identificadas como extremamente relevantes ao longo do desenvolvimento da semente, e em linhagens celulares com alto potencial embriogênico da *A. angustifolia* (Astarita *et al*., 2003c; Jo *et al*., 2014; Elbl *et al.*, 2015a; Santos *et al*., 2016; de Oliveira *et al*., 2017).

Pesquisas desenvolvidas pelo grupo demonstraram que embriões zigóticos de *A. angustifolia* apresentam um perfil de aminoácidos diferente de outras coníferas, tais como as da família Pinaceae. Enquanto que, em sementes de *Pinus taeda* e de outras coníferas, o principal aminoácido encontrado é a arginina, precursor das PAs, em *A. angustifolia* o ácido aspártico e glutâmico são os aminoácidos mais abundantes (Astarita *et al.*, 2003c). Esta observação levanta uma importante questão sobre sua principal via de biossíntese das PAs, e seu reflexo na embriogênese. O uso de aminoácidos marcados e a expressão gênica das enzimas de biossíntese podem ser ferramentas importantes para elucidação do metabolismo

das PAs, e para a compreensão da evolução da embriogênese *in vitro* e *in vivo.* Através da plataforma de transcriptoma da *A. angustifolia* foram identificados genes envolvidos tanto no metabolismo de PAs como na biossíntese de arginina e ornitina (de Oliveira *et al.*, 2015, 2017). A análise *in silico* tem revelado que essa é uma via conservada e a *AaADC* e *AaSAMDC* foram identificados como diferencialmente expressos em diferentes linhagens celulares, demonstrando a importância do estudo dos genes envolvidos na regulação do metabolismo de PAs (de Oliveira *et al.*, 2015). Adicionalmente, trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo descrevem as PAs como potencial marcador bioquímico para a capacidade embriogênica, sendo que diferentes perfis de PAs foram associados a linhagens responsivas e bloqueadas aos agentes da maturação (Jo *et al.*, 2014). Esses dados sugerem a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre a relação dos perfis de PAs, desde a semente até o estabelecimento de culturas embriogênicas.

Inserido nestas pesquisas a presente tese tem como temática o estudo do metabolismo das poliaminas durante a embriogênese zigótica e em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. Para tanto foram investigados: a) os perfis de aminoácidos e poliaminas (livres e conjugadas) em diferentes estádios de desenvolvimento de embriões zigóticos e em culturas embriogênicas com diferentes potenciais embriogênicos; b) determinação da via preferencial de biossíntese da putrescina, através da análise da atividade enzimática da ADC e ODC em embriões zigóticos e culturas embriogênicas com diferentes potencias embriogênicos; c) identificação, através do banco de dados de transcritos da embriogênese de Araucária (Elbl *et al.*, 2015a), dos principais genes envolvidos na via de PAs; d) caracterização do padrão de expressão dos genes envolvidos no metabolismo de PAs em diferentes estádios de desenvolvimento de embriões zigóticos e em culturas embriogênicas; e) identificação das relações entre os perfis de PAs e aminoácidos presentes nas sementes das matrizes, e sua potencial influência nas fases de indução, proliferação e maturação dos embriões somáticos.

O fluxograma de trabalho para o desenvolvimento da tese é apresentado na figura 6.

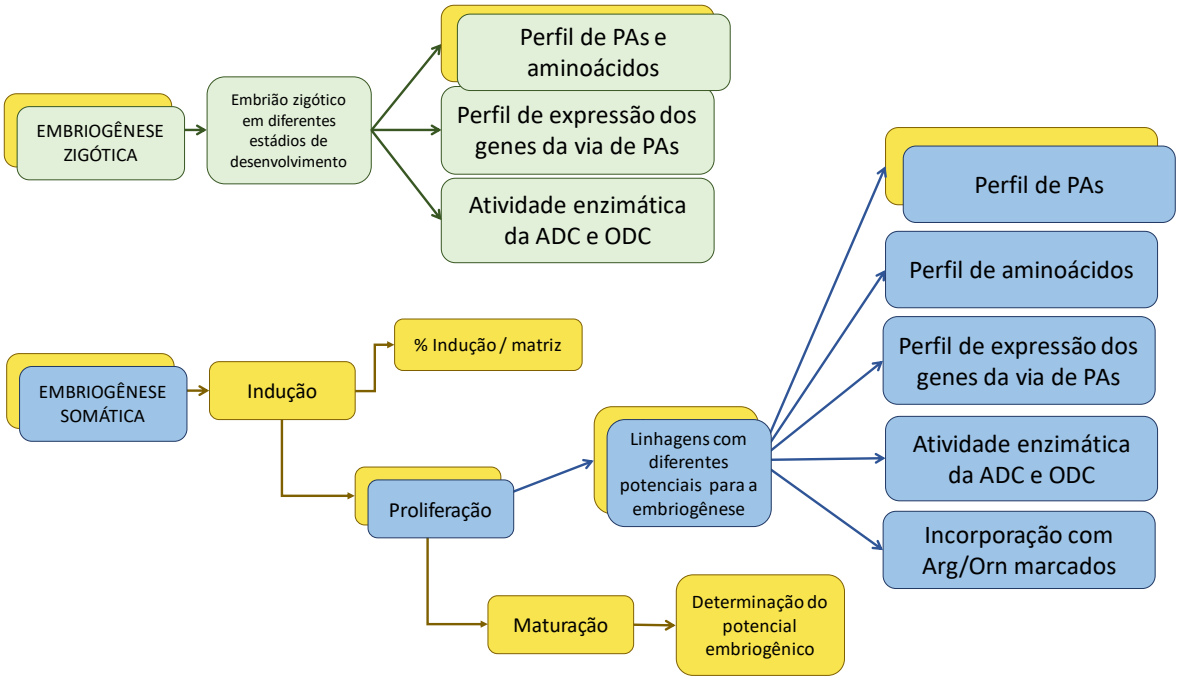

Figura 6. Fluxograma para o desenvolvimento do trabalho. ▢ - Capítulo I; ▢ - Capítulo II; ▢ - Capítulo III. Fonte: de Oliveira (2017).

Neste contexto o presente trabalho foi estruturado nos seguintes capítulos:

Capítulo I. Elucidação da biossíntese de poliaminas durante o desenvolvimento de sementes do pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*)

Capítulo II. Biossíntese de poliaminas em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*

Capítulo III. Poliaminas e aminoácidos em diferentes matrizes de *Araucaria angustifolia* e sua associação com o potencial embriogênico

Considerações finais e perspectivas

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho está inserido na temática que envolve a compreensão dos processos de embriogênese zigótica e somática em *A. angustifolia*. Diversas pesquisas têm sido realizadas visando a abordagem de aspectos básicos relacionados à competência, determinação e diferenciação celular da embriogênese, em associação com o aperfeiçoamento de um protocolo para a aplicação da propagação clonal massal neste sistema vegetal. Neste contexto, as pesquisas tem recorrido à utilização de parâmetros morfo-fisiológicos, bioquímicos e moleculares, num estudo comparativo entre a embriogênese zigótica e somática. Dentro desta perspectiva, diferentes vias de sinalização celular foram estudadas, onde as PAs e aminoácidos foram identificados como importantes ao longo do desenvolvimento da semente, e em linhagens celulares com alto potencial embriogênico da *A. angustifolia.* Neste contexto insere-se o presente trabalho, que objetivou aprofundar o conhecimento destes grupos de substâncias na modulação dos processos de embriogênese zigótica e somática de *A. angustifolia*. Estudos nesta linha de pesquisa foram realizados em espécies modelo, como *Arabidospsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Nicotiana tabacum*, e em algumas coníferas de interesse econômico. Neste trabalho, de maneira inédita, foi utilizado um sistema constituído de uma arbórea nativa, que possui sementes recalcitrantes, de difícil propagação por métodos tradicionais, e considerada ameaçada de extinção.

Os recentes avanços obtidos com as novas plataformas de sequenciadores de ácidos nucléicos vem permitindo, com grande eficiência, o estudo do transcriptoma através da técnica de RNA-seq de espécies sequenciadas e não sequenciadas, ou então, com um grande genoma como é o caso da *A. angustifolia*. Um extenso banco de dados, utilizando esta metodologia, foi obtido para embriogênese zigótica e somática no presente sistema de estudo, possibilitando um maior conhecimento da regulação molecular do desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro* (Elbl *et al.*, 2015). Adicionalmente, estudos integrados do transcriptoma e do proteoma (dos Santos *et al*., 2016) puderam predizer a função de genes, caracterizar os processos biológicos envolvidos, e o estudo das redes metabólicas relacionadas aos reguladores, como aqueles selecionados para o presente trabalho. Associados a estes estudos, no presente trabalho, a determinação da atividade das enzimas das vias metabólicas, a utilização de aminoácidos marcados, e a expressão gênica das enzimas de biossíntese foram ferramentas fundamentais para elucidação da participação das PAs e aminoácidos na evolução dos processos da

embriogênese *in vitro* e *in vivo.* Adicionalmente, foi possível confirmar a possibilidade de utilização das PAs como marcador bioquímico para a capacidade embriogênica, em consonância com outros trabalhos desenvolvidos.

Os resultados, apresentados no Capítulo I e publicados no periódico *Tree Physiology* (de Oliveira *et al.*, 2017), elucidaram, utilizando parâmetros bioquímicos e moleculares, o metabolismo e a participação das PAs e aminoácidos nos vários estádios de desenvolvimento do embrião zigótico. Foi verificado que: a) dois genes diferencialmente expressos que podem codificar para enzimas chaves na via de biossíntese de PAs, sendo o gene *AaADC* para a regulação da biossíntese de Put e *AaSAMDC* para biossíntese de Spd/Spm; b) a via preferencial de biossíntese de Put é realizada através da enzima ADC; e c) diferentes perfis de aminoácidos associados à via de PAs. A arginina, diferente do observado para outras coníferas, não foi o principal aminoácido identificado durante a embriogênese zigótica de *A. angustifolia*. Os resultados indicam que a arginina estaria menos relacionada com a incorporação de proteínas de reserva na semente, e numa maior integração com a biossíntese de NO ou PAs. A citrulina foi o principal aminoácido observado nos estádios cotiledonar e maturo dos embriões zigóticos, o qual pode estar associado ao metabolismo oxidativo, como um produto da via de NO. Para comprovar estas hipóteses, novos estudos envolvendo a análise da emissão de NO, bem como a incorporação de precursores (arginina e ornitina), devem ser realizados, obtendo informações relevantes sobre a participação da citrulina no metabolismo oxidativo durante o desenvolvimento embrionário.

Estudos anteriores revelaram que linhagens celulares de *A. angustifolia* com diferentes potenciais embriogênicos, apresentam distintos perfis de PAs, sobretudo nos conteúdos de Put (Jo *et al.*, 2014). Entretanto, os mecanismos que controlam o metabolismo de PAs em diferentes linhagens celulares ainda não foram completamente determinados em coníferas. Nesse contexto, o uso de precursores marcados, como a ^{14}C-Arg e ^{14}C-Orn, permitiram obter um maior conhecimento sobre a participação da arginina e da ornitina tanto no metabolismo da via da Ornitina/Arginina como na regulação da Put, em linhagens celulares com diferentes potenciais embriogênicos. Ressalta-se que esse tipo de estudo é inédito para coníferas.

Os resultados apresentados no Capítulo II, demonstraram que a arginina tem maior participação no metabolismo de PAs do que a ornitina, nas duas linhagens testadas. Em linhagens responsivas, o efeito da aplicação exógena de arginina parece ativar os genes

relacionados ao catabolismo de PAs, enquanto que para a linhagem bloqueada, parece haver um efeito acumulativo das PAs. Futuros estudos envolvendo as atividades das enzimas relacionadas ao catabolismo de PAs permitirão uma análise mais detalhada para confirmar a participação do catabolismo de PAs em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. As análises de expressão gênica e atividade enzimática da ADC e ODC, no presente trabalho, foram avaliados após 48h de incubação com os precursores marcados. Entretanto, não foi possível observar uma relação entre esses dois perfis, sugerindo que pode haver uma regulação pós-traducional. A maior acumulação de Put foi observado após 168h e 336h de incubação, indicando que esses pontos devem ser levados em conta para futuras análises dos perfis de expressão gênica e atividade enzimática. Estudos com inibidores da ADC, ODC e SAMDC também serão efetivos para uma melhor compreensão da participação dessas enzimas na evolução das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

Além de regular os níveis de PAs, a arginina e ornitina também alteram o conjunto total de aminoácidos. A citrulina foi o principal aminoácido identificado nas culturas embriogênicas, sendo alterada em linhagens responsivas, quando da suplementação da arginina exógena. Este resultado vem corroborar a possível participação da arginina na biossíntese de NO, uma vez que citrulina é um dos produtos dessa via. Estudos mais detalhados, envolvendo as análises de emissão de NO devem ser realizados, confirmando a via de biossíntese em questão, e seu papel durante a embriogênese somática. Pelos dados obtidos, observou-se que a taxa de conversão da ornitina em arginina pode ser maior do que o inverso, ou seja, a conversão da arginina em ornitina. Estudos envolvendo a análise da atividade enzimática da arginase e o ciclo da ureia, são pontos importantes a serem estudados, apontando para a importância do metabolismo do nitrogênio nas culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

A embriogênese somática é um processo complexo, onde o sucesso de cada etapa depende do desempenho adequado na etapa anterior. O estabelecimento de culturas embriogênicas nesta espécie é genótipo-dependente, entretanto, o potencial embriogênico é apenas observado quando da etapa de maturação. Estudos anteriores apontam as PAs como candidatos a marcadores bioquímicos para a seleção de linhagens com potencial embriogênico, previamente à etapa de maturação (Jo *et al.*, 2014). Esta temática é abordada no o Capítulo III, onde é proposta a utilização dos perfis de PAs e aminoácidos como possíveis marcadores bioquímicos para a seleção de matrizes com maior potencial embriogênico. Três metabólitos (Put total, ornitina e asparagina) identificados nas sementes

das matrizes foram associados às respostas observadas *in vitro*. As abordagens utilizadas neste trabalho, ou seja, a análise dos perfis bioquímicos das matrizes e sua associação com as respostas observadas *in vitro*, permitiram abrir novas perspectivas para o estabelecimento de marcadores bioquímicos para seleção de matrizes com maior potencial embriogênico em *A. angustifolia*. Entretanto, uma análise estatística mais aprofundada é necessária para estabelecer uma correlação entre os parâmetros bioquímicos observados nas sementes, e as respostas observadas *in vitro*, bem como expandir para um número maior de matrizes testadas em diferentes populações de *A. angustifolia*.

Em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho representam um avanço no conhecimento dos mecanismos que regulam a biossíntese de PAs durante a embriogênese zigótica e em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. Ressalta-se que os resultados obtidos neste trabalho são inéditos, considerando-se a espécie em estudo.

Os resultados apresentados elucidaram pontos relevantes sobre o metabolismo das PAs, entretanto, futuros estudos a nível proteico, ou seja, que envolvam as análises das principais enzimas relacionadas às PAs e aminoácidos, deverão ser conduzidos para complementar as informações obtidas no presente estudo. Adicionalmente, outros metabólitos, como carboidratos, estão sendo avaliados e poderão ser integrados às PAs e aminoácidos no estabelecimento de marcadores bioquímicos para o sistema *A. angustifolia.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Aloisi, I., Cai, G., Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S. 2016. Polyamines in Pollen: From Microsporogenesis to Fertilization. Front Plant Sci. 7, doi: 10.3389/fpls.2016.00155.

Araldi, C. G., Coelho, C. M. M., Gaziola, S. A., Azevedo, R. A. 2016. Storage elicits a fast antioxidant enzyme activity in *Araucaria angustifolia* embryos. Acta Physiol Plant 38:201, doi: 10.1007/s11738-016-2219-2.

Aronen, T., Pehkonen, T., Ryynänen, L. 2009. Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris*. Scandinavian Journal of Forest Research 24:372-83.

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

Astarita, L. V., Floh, E. I. S., Handro, W. 2003b. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. Biol Plant 47:53–59.

Astarita, L. V., Guerra, M. P. 1998. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*– induction and maintenance of embryonal-suspensor mass culture. Rev. Bras. Fisiol. Veg 10:113-118.

Astarita, L. V., Guerra, M. P. 2000. Conditioning of culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). In Vitro Cell Dev Biol Plant. 36:194-200.

Astarita, L. V., Handro, W., Floh, E. I. S. 2003c. Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O Ktze. Rev Bras Bot 26:163–168.

Attre S. M., Fowke L. C. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. Plant Cell Tissue and Organ Culture 35:1-35.

Auler, N. M. F., Reis, M. S., Guerra, M. P., Nodari, R. O. 2002. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. Genetics and Molecular Biology 25:329-338.

Bais, H. P., Ravinshankar, G. A. 2002. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. Plant Cell Tissue Organ Cult 69:1-34.

Balbuena, T. S., Jo, L., Pieruzzi, F. P., Dias, L. L. C., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Junqueira, M., Thelen, J. J., Shevchenko, A., Floh, E. I. S. 2011. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. Phytoch 72:302-311.

Balbuena, T. S., Silveira, V., Junqueira, M., Dias, L. L. C., Santa-Catarina, C., Shevchenko, A., Floh, E. I. S. 2009. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). Journal of Proteomics 72:337-352.

Balbuena, T. S., Silveira, V., Junqueira, M., Dias, L. L. C., Santa-Catarina, C., Shevchenko, A., Floh, E. I. S. 2009. Changes in 2-DE proteins protein profiles during zygotic embryogenesis in *A. angustifolia*. J Proteomics 72:337-352.

Ballester, A., Corredoira, E., Vieitez, A. M. 2016. Limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees: Vegetative propagation of forest trees. Park, Y. S., Bonga, J. M., Moon, H. K. (eds) National Institute of Forest Science, Seoul, Korea, pp. 56–74.

Baron, K., Stasolla, C. 2008. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. In Vitro Celll Dev Biol Plant. 44:384-95.

Becwar, M. R., Noland, T. L., Wyckoff, J. L. 1989. Maturation, germination, and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. In Vitro Cell Dev Biol Plant 26: 575-580.

Belda-Palazon, B., Ruiz, L., Marti, E., Tarraga, S., Tiburcio, A. F., Culianez, F., Farràs, R., Carrasco, P., Ferrando, A. 2012. Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. PLoS ONE 7:e46907. doi: 10.1371/journal.pone.0046907.

Berjak, P., Pammenter, N. W. 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. Front Plant Sci 5:123.

Bewley, J. D., Black, M. 1994. Seeds: Physiology of development and germination. Plenum Press, New York, pp. 341.

Bhatnagar, P., Minocha, R., Minocha, S. C. 2002. Genetic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. The regulation of putrescine catabolism. Plant Physiol. 128:1455–1469.

Bortolotti, C., Cordeiro, A., Alcazar, R., Borrell, A., Culiañez-Macià, F. A., Tiburcio, A. F., Altabella, T. 2004. Localization of arginine decarboxylase in tobacco plants. Physiol Plant 120:84–92.

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

Cairney, J., Xu, N., Pullmann, G. S., Ciavatta, V. T., Johns, B. 1999. Natural and somatic embryo development in Loblolly pine. Appl Bioch Biotech 77-79:5-17.

Carbonell, J., Blázquez, M. A. 2009. Regulatory Mechanisms of polyamine biosynthesis in plants. Genes & Genomics 31:107-118.

Chalupa, V. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. Comm Inst For Cecholosveniae 14:57-63.

Champagne, A., Boutry, M. 2013. Proteomics of nonmodel plant species. Proteomics 13:663-673.

Childs, A. C., Mehta, D. J., Gerner, E. W. 2003. Polyamine-dependent gene expression. Cell Mol Life Sci. 60:1394-13406.

Conselho Nacional Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Disponível em: <http://www.rbma.org.br/anuario/mata_03_anosdedesttuicao_dest_araucaria.asp>. (Acesso em 01 out 2016).

Corpas, F. J., Barroso, J. B. 2014. Peroxisomal plant nitric oxide synthase (NOS) protein is imported by peroxisomal targeting signal type 2 (PTS2) in a process that depends on the cytosolic receptor PEX7 and calmodulin. FEBS Letters 588:2049–2054.

Cvikrová, M., Malá, J., Eder, J., Hrubcová, M., Vágner, M. 1998. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion potential. Plant Physiol. Biochem. 36:247-255.

Cyr, D. R., Klimaszewska, K. 2002. Conifer somatic embryogenesis: II. Applications. Dendrobiology 48:41–49.

de Oliveira, L. F., Elbl, P., Navarro, B. V., Macedo, A. F., Dos Santos, A. L. W., Floh, E. I. S. 2017. Elucidation of the polyamine biosynthesis pathway during Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seed development. Tree Physiol. 37(1):116-130.

de Oliveira, L.F., Macedo, A.F., dos Santos, A.L.W. and Floh, E.I.S. 2015. Polyamine levels, arginine and ornithine decarboxylase activity in embryogenic cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Acta Hortic. 1083, 419-425 DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1083.54.

Domoki, M., Györgyey, J., Biró, J., Pasternak, T. P., Zvara, A., Bottka, S., Puskás, L. G., Dudits, D., Fehér, A. 2006. Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells. Biochim Biophys Acta 1759:543–551.

dos Santos, A. L. W., Elbl, P., Navarro, B. V., de Oliveira, L. F., Salvato, F., Balbuena, T. S., Floh, E. I. S. 2016. Quantitative proteomic analysis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze cell lines with contrasting embryogenic potential. J Proteomics 130:180–189.

dos Santos, A. L. W., Gueddarri, N. E., Wiedholteher, N., Moerschbacher, B. M. 2006. Seed proteins of *Araucaria angustifolia*: Temporal expression of class IV chitinase and arabinogalactan proteins. Physiol Plant 127:138-148.

dos Santos, A. L. W., Silveira, V., Steiner, N., Maraschin, M., Guerra, M. P. 2010. Biochemical and morphological parametres during the growth of suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. Brazi Archi Bio/Tech. 53:497-504.

dos Santos, A. L. W., Silveira, V., Steiner, N., Vidor, M., Guerra, M. P. 2002. Somatic embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifollia* (Bert.) O. Kuntze). Braz. Arch. Biol. Technol. 45:97-106.

dos Santos, A. L. W., Steiner, N., Guerra, M. P., Zoglauer, K., Moerschbacher, B. M. 2008. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. Biol Plant 52:195-199.

Dowlatabadi, R., A.M. Weljie, T.A. Thorpe, E.C. Yeung and H.J. Vogel. 2009. Metabolic foot printing study of white spruce somatic embryogenesis using NMR spectroscopy. Plant Physiol. Biochem. 47:343–350.

Duarte, L. S., Dillenburg, L. R., Rosa, L. M. G. 2002. Assessing the role of light availability in the regeneration of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). Aust J Bot. 50:741-751.

Durzan, D. J. 2012. Female parthenogenetic apomixis and androsporogenetic parthenogenesis in embryonal cells of *Araucaria angustifolia*: interpolation of progenesis and asexual heterospory in an artificial sporangium. Sex Plant Reprod. 25:227-246.

Elbl, P., Campos, R. A., Lira, B. S., Andrade, S. C. S., Jo, L., dos Santos, A. L. W., Coutinho, L. L., Floh, E. I. S., Rossi, M. 2015a. Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. Plant Cell Tiss Organ Cult 120:903–915.

Elhiti, M., Stasolla, C., Wang, A. 2013. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 49:631–642.

Fehér, A. 2015. Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. Biochim Biophys Acta 1849:385-402.

Feirer, R. P. 1995. The biochemistry of conifer embryo development: amino acids, polyamines and storage proteins. In: Jain, S. M., Gupta, P. K., Newton, R. J. (eds) Somatic embryogenesis in woody plants, vol. 1. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; pp. 317-336.

Filonova, L. H., Bozhkov, P. V., Brukhin, V. B., Daniel, G., Zhivotovky, B., von Arnold, S. (2000) Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm Norway spruce. J Cell Sci 113:4399–4411.

Floh, E. I. S. dos Santos, A. L. W., Demarco, D. 2015. Embriogênese vegetal: abordagens básicas e biotecnológicas. In: Resende, R. R., Soccol, C. R. (eds.). 1ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 1, pp. 01-15.

Floh, I. E. S. 2007. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudo da morfogênese *in vitro*. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 13:1992-2001.

Garcia, R. J. F. 2002. Araucareaceae. In: Wanderley, M. G. L., Shepherd, G. J., Giulietti, A. M. (eds) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: Hucitec, v.2. Araucareaceae, p.1-4.

Garcia-Mendiguren, O., Montalbán, I. A., Stewart, D., Moncaleán, P., Klimaszewska, K., Rutledg, R. G. 2015. PLoSOne, Jun 3;10(6):e0128679.

Ge, C., Cui, X., Wang, Y., Hu, Y., Fu, Z., Zhang, D., Cheng, Z., Li, J. 2006. *BUD2*, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for Arabidopsis growth and development. Cell Res. 16:446-456.

Gemperlová, L., Fischerová, L., Cviková, M., Malá, J., Vondráková, Z., Martincová, O., Vágner, M. 2009. Polyamine profiles and biosynthesis in somatic embryo development and comparison of germinating somatic and zygotic embryos of Norway spruce. Tree Physiol 29:1287–1298.

Gifford, E. M., Foster, A. S. 1989. Morphology and evolution of vascular plants. New York: W. H. Freeman and Company.

Groppa, M. D., Benavides, M. P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids 34:35-45.

Guerra, M. P., Kemper, E. 1992. Tecnologias Futuras: Aplicação da poliembriogênese somática para a propagação massal de plantas elite de *Araucaria angustifolia* (Bert) O Ktze. Anais Congresso Nacional Sobre Essências, São Paulo, Brasil, pp 1233-1236.

Guerra, M. P., Silveira, V., Dos Reis, M. S., Schneider, L. 2002. Exploração, manejo e conservação da Araucária (*Araucaria angustifolia*). In: Simões, L. L., Lino, C. F. (eds) Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais. São Paulo: Editora Senac. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*), p.85-101.

Guerra, M. P., Silveira, V., Santos, A. L. W., Astarita, L.V., Nodari, R.O. 2000. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: Jain, S., Gupta, P., Newton, R. (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Kluwer Academic Publishers, Amsterda 457-478.

Guerra, M. P., Steiner, N., Farias-Soares, F. L., Vieira, L. do N., Fraga, H. P., Rogge-Renner, G. D., Maldonado, S. B. 2016. Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). In: Germana, M. A., Lambardi, M. (eds) In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, 1359:439-50

Guerra, M. P., Steiner, N., Mantovani, A., Nodari, R. O., Dos Reis, M. S., dos Santos, K. L. 2008. Araucária. In: Barbieri, R. L., Stumpf, E. R. T. (eds). Origem e Evolução de Plantas Cultivadas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. Araucária, p.149-184.

Guerra, M. P., Torres, A. C., Teixeira, J. B. 1999. Embriogênese somática e semente sintética. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. (eds.) Cultura de Tecidos e Transformação de Plantas. Embrapa-SPI/CNPH vol.2, pp. 533-568.

Guerra, M. P., Torres, A. C., Teixeira, J. B. 1999. Embriogênese somática e semente sintética. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. (eds.) Cultura de Tecidos e Transformação de Plantas. Embrapa-SPI/CNPH vol.2, pp. 533-568.

Guo, Z., Tan, J., Zhuo, C., Wang, C., Xiang, B., Wang, Z. 2014. Abscisic acid, H_2O_2 and nitric oxide interactions mediated cold-induced S-adenosylmethionine synthetase in *Medicago sativa* subsp. *falcata* that confers cold tolerance through up-regulating polyamine oxidation. Plant Biotechnol. J. Epub 12:601-612.

Gupta, P.K., Pullman, G.S. 1991. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. *US patent* 5,036,007.

Haines, R. J., Prakasha, N. 1980. Proembryo development and suspensor elongation in *Araucaria* Juss. Aust. J. Bot. 28:511-522.

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.

Hakman, I., Fowke, L., von Arnold, S., Eriksson, T. 1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Sci. 38:53-59.

Hakman, I., Oliviusson, P. 2002. High expression of putative aquaporin genes in cells with transporting and nutritive functions during seed development in Norway spruce (*Picea abies*). Journal of Experimental Botany 53: 639-649.

Hakman, I., von Arnold, S. 1985. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in Picea abies (Norway spruce). J. Plant Physiol. 121:149-158.

Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M. J., Burtin, D., Michael, A. J. 2001. Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. Plant J 27:551–560.

Harada, J. J., Belmonte, M. F., Kwong, R. W. 2010. Plant Embryogenesis (Zygotic and Somatic). eLS. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002042.pub2.

Haworth, M., Elliot-Kingston, C., McElwain, J. C. 2011. The stomatal CO_2 proxy does not saturate at high atmospheric CO_2 concentrations: evidence from stomatal index responses of Araucariaceae conifers. Oecologia 167: 11-19.

Högberg, K. A., Bozhkov, P. V., von Arnold, S. 2003. Early selection improves clonal performance and reduces intraclonal variation of Norway spruce plants propagated by somatic embryogenesis. Tree Physiol. 23:211-6.

Högberg, K. A., Ekberg, I., Norell, L., von Arnold, S. 1998. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programe: a case study with *Picea abies*. Canadian Journal of Forest Research. 28:1536-1545.

Hummel, I., Bourdais, G., Gouesbet, G., Couée, I., Malmber, R. L., Amrani, A. E. 2004 Differential gene expression of *ARGININE DECARBOXYLASE ADC1* and *ADC2* in Arabidopsis thaliana: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. New Phytol 163:519-531.

Ikeda, M., Umehara, M., Kamada, H. 2006. Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. Plant Biotech 23:153–161.

Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D. *et al.* 2004. Spermidine synthase genes are essential for survival of Arabidopsis. Plant Physiol 135:1565-1573.

Jain, S. M., Ishii, K. 1998. Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In: Mantell, S. H., Bruns, S., Tragardh, C., Viana, A. M. (eds) Recent advances in biotechnology for conservation and management. International Foundation for Science, Stockholm, p.214-231.

Jancewicz, A. L., Gibbs, N. M., Masson, P. H. 2016. Cadaverine's Functional Role in Plant Development and Environmental Response. Front Plant Sci. 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00870.

Jiménez-Bremont, J. F., Marina, M., Guerrero-González, M. L., Rossi, F. R., Sánchez-Rangel, D., Rodríguez-Kessler, M., Ruiz, O. A., Gárriz, A. 2014. Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. Front Plant Sci. 5, doi: 10.3389/fpls.2014.00095.

Jo, L. 2012. Estabelecimento de marcadores bioquímicos para embriogênese somática em *Araucaria angustifolia*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 116p.

Jo, L., dos Santos, A. L. W., Bueno, C. A., Barbosa, H. R., Floh, E. I. S. 2014. Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. Tree Physiol 34: 94–104.

Johansen, D. A. 1950. Chronica Botanica Company. Waltham, Massachusettes, pp.305.

Johnson, T., Cruse-Sanders, J. M., Pullman, G. S. 2012. Micropropagation and seed cryopreservation of the critically endangered species Tennessee yellow-eye grass, *Xyris tennesseensis* Kral. In Vitro Celll Dev Bio Plant. 48:369-376.

Kageyama, P. Y., Ferreira, M. 1975. Propagação vegetativa por enxertia com *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. IPEF 11:95-102.

Kakkar, R. K., Nagar, P. K., Ahuja, P. S., Rai, V. K. 2000. Polyamines and plant morphogenesis. Biologia Plantarum 43:1-11.

Karami, O., Saidi, A. 2010. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. Mol. Biol. Rep. 37:2493-2507.

Klimaszewska, K., Hargreaves, C., Lelu-Walter, M., Trontin, J. 2016. Advances in Conifer Somatic Embryogenesis since year 2000. In: Germana, M. A., Lambardi, M. (eds) In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, 1359, pp 131-166.

Klimaszewska, K., Morency, F., Jones-Overtona, C., Cooke, J. 2004. Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in

somatic embryos from different maturation treatments. Physiologia Plantarum 121:682–690.

Klimaszewska, K., Trontin, J. F., Becwar, M. R., Devillard, C., Park, Y. S., Lelu-Walter, M. A. 2007. Recent Progress in Somatic Embryogenesis of Four *Pinus* spp. Tree and Forestry Science and Biotechnology 1:11-25.

Kovács, Z., Simon-Sarkadi, L., Szücs, A., Kocsy, G. 2010. Differential effects of cold, osmotic stress and abscisic acid on polyamine accumulation in wheat. Amino Acids 38:623-631.

Kumar, A., Altabella, T., Taylor, M. A., Tiburcio, A. F. 1997. Recent advances in polyamine research. Trends in Plant Science 2:124-130.

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

Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T., Takahashi, Y. 2007. Advances in polyamine research in 2007. J Plant Res. 120:345-350.

Kuznetsov, V. L., Shevyakova, N. I. 2007. Polyamines and stress tolerance of plants. Plant Stress 1:50–71.

Larher, F. R., Aziz, A., Gibon, Y., Trotel-Aziz, P., Sulpice, R., Bouchereau, A. 2003. An assessment of the physiological properties of the so-called compatible solutes using in vitro experiments with leaf discs. Plant Physiol Bioch. 41:657-666.

Lasanajak, Y., Minocha, R., Minocha, S. C., Goyal, R., Fatima, T., Handa, A. K., Mattoo, A. K. 2014. Enhanced flux of substrates into polyamine biosynthesis but not ethylene in tomato fruit engineered with yeast S-adenosylmethionine decarboxylase gene. Amino Acids 46:729–742.

Lee, E. K., Cho, D. Y., Soh, W. Y. 2001. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. Plant Cell Rep 20:408–415.

Lelu-Walter, M. A., Bernier-Cardou, M., Klimaszewska, K. 2008. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Org. Cult. 92:31–45.

Lelu-Walter, M.A., Thompson, D., Harvengt, L., Sanchez, L., Toribio, M., Pâques, L.E. 2013. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: stateof-the-art, benefits, challenges and future direction. Tree Genet Genome 9:883–899.

Lipert, D., J. Zhuang, S. Ralph, D.E. Ellis, M. Gilbert, R. Olafson, K. Ritland, C.J. Douglas, J. Bohlmann. 2005. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in Picea glauca. Proteomics 5:461–473.

Liu, J. H., Wang, W., Wu, H., Gong, X., Moriguchi, T. 2015. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. Front Plant Sci. 6, doi: 10.3389/fpls.2015.00827.

Liu, Q., Chen, Y. Q. 2009. Insights into the mechanism of plant development: Interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. Biochem. Biophys. Res. Comm, 384:1–5.

Ma, X., Bucalo, K., Determann, R. O., Cruse-Sanders, J. M., Pullman, G. S. 2012. Somatic embryogenesis, plant regeneration and cryopreservation for *Torreya taxifolia*, a highly endangered coniferous species. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 48:324-334.

Majumdar, R., Barchi, B., Turlapati, S. A., Gagne, M., Minocha, R., Long, S., Minocha, S. C. 2016. Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: the pathway is regulated at the posttranscriptional level. Front Plant Sci 7:78.

Majumdar, R., Shao, L., Minocha, R., Long, S., Minocha, S. C. 2013. Ornithine: the overlooked molecule in the regulation of polyamine metabolism. Plant Cell Physiol 54:990–1004.

Malá, J., Cvikrová, M., Máchová, P., Martincová, O. 2009 Polyamines during somatic embryo development in Norway spruce (*Picea abies* [L.]). Journal of Forest Science 55:75–80.

Mantovani, A., Morellato, L. P. C., dos Reis, M. S. (2004) Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Rev Brasil Bot 27:787-796.

Mantovani, L. A., Morellato, P. C., dos Reis, M. S. 2006. Internal Genetic Structure and Outcrossing Rate in a Natural Population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. J Hered. 97:466–472.

Martin, L. B. B., Fei, Z., Giovanni, J. J., Rose, J. K. C. 2013. Catalyzing plant science research with RNA-seq. Front. Plant Sci. 4, doi.org/10.3389/fpls.2013.00066.

Martinelli, G., Moraes, M.A. 2013. Livro Vermelho da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 1100 p.

Martínez, L. E., Agüero, C. B., López, M. E., and Galmarini, C. R. 2000. Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. Plant Sci. 156:221–226.

Merkle, S. A., Parrott, W. A., Flinn, B. S. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (eds) In Vitro Embryogenesis in Plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 155-203.

Minocha, R., Majumdar, R., Minocha, S. C. 2014. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. Front. Plant Sci. 5, doi.org/10.3389/fpls.2014.00175.

Minocha, R., Minocha, S. C., Long, S. 2004. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* Sarg.). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 40:572-580.

Minocha, R., Smith, D. R., Reeves, C., Steele, K. D., Minocha, S. C. 1999. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. Physiol Plant 105:155–164.

Minocha, S. C., Minocha, R. 1995. Role of polyamines in somatic embryogenesis. In: Bajaj, Y. P. S. (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 55–72.

Montague, M., Koppenbrink, J., Jaworski, E. 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. Plant Physiol. 62:430-3.

Montalbán, I. A., De Diego, N., Moncalean, P. 2012. Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments. Acta Physiologiae Plantarum 34: 451–460.

Moschou, P. N., Wu, J., Cona, A., Tavladoraki, P., Angelini, R., Roubelakis-Angelakis, K. A. 2012. The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. Journal of Experimental Botany 63:5003-5015.

Nagmani, R., Bonga, J. M. 1985. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. Canadian Journal of Forest Research 15:1088-1091.

Nakagawa, R., Kurushima, M., Matsui, M., Nakamura, R., Kubo, T. and Funada, R. 2011. Polyamines promote the development of embryonal-suspensor masses and the formation of somatic embryos in *Picea glehnii*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Pl. 47:480-487.

Namasivayam, P. 2007. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult 90:1–8.

Neale, D. B., Kremer, A. 2011. Forest tree genomics: growing resources and applications. Nat Rev Genet 12:111-122.

Niemi, K., Sarjala, T., Chen, X., Häggman, H. 2002. Spermidine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone) affect maturation and endogenous polyamine content of Scots pine embryogenic cultures. J Plant Physiol 159:1155–1158.

Niskanen, A.-M., Lu, J., Seitz, S., Keinonen, K., von Weissenberg, K., Pappinen, A. 2004. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). Tree Physiology 24:1259–1265.

Norstog, K., Rhamstine, E. 1967. Isolation and culture of haploid and diploid cycad tissue. Phytomorphology 17:374-381.

Ochatt, S. J., Revilla, M. A. 2016. From Stress to Embryos: Some of the Problems for Induction and Maturation of Somatic Embryos. In vitro embryogenesis in higher plants 1359:523-536.

Page, A. F., Minocha, R., Minocha, S. C. 2012. Living with high putrescine: expression of ornithine and arginine biosynthetic pathway genes in high and low putrescine producing poplar cells. Amino Acids 42:295–308.

Pál, M., Szalai, G., Janda, T. 2015. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. Plant Sci. 237:16-23.

Perán-Quesada, R., Sánchez-Romero, C., Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F. 2004. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. Scientia Horticulturae 102:61-73.

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

Pullman, G. S., Xiaoyan, Z., Copeland-Kamp, B., Crockett, J., Lucrezi, J., May, S. W., Bucalo, K. 2015. Conifer somatic embryogenesis: improvements by supplementation of medium with oxidation-reduction agents. Tree Physiol 35:209-224.

Radoeva, T., Weijers, D. 2014. A roadmap to embryo identity in plants. Trend Plant Sci. 19:709-716.

Raghavan, V., Sharma, K. K. 1995. Zygotic embryogenesis in gymnosperms and angiosperms. In: Thorpe, T. A. (ed) In vitro embryogenesis in plants, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 73-115.

Rogge-Renner, G. D., Steiner, N., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., Farias, F. L., Guerra, M. P. 2013. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. Protoplasma 250:731-739.

Saha, J., Brauer, E. K., Sengupta, A., Popescu, S. C., Gupta, K., Gupta, B. 2015 Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. Front. Environ. Sci. 3, doi.org/10.3389/fenvs.2015.00021.

Salo, H. M., Sarjala, T., Jokela, A., Häggman, H., Vuosku, J. 2016. Moderate stress responses and specific changes in polyamine metabolism characterize Scots pine somatic embryogenesis. Tree Physiol 36:392–402.

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

Santa-Catarina, C., Silveira, V., Guerra, M. P., Steiner, N., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., dos Santos, A. L. W. 2013. The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. Curr. Opin. Plant Biol. 13:103-119.

Santa-Catarina, C., Silveira, V., Scherer, G. F. E., Floh, E. I. S. 2007. Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. Plant Cell Tiss Organ Cut 90:93-101.

Santolini, J., André, F., Jeandroz, S., Wendehenne, D. 2016. Nitric oxide synthase in plants: Where do we stand? Nitric Oxide, In Press, doi: 10.1016/j.niox.2016.09.005.

Santos, I. R. I. 2000. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. R. Bras. Fisiol. Veg. 12:70-84.

Schlogl, P. S., dos Santos, A. L. W., Vieira, L. N., Floh, E. I. S., Guerra, M. P. 2012a. Gene expression during early somatic embryogenesis in Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze). Plant Cell Tiss Org 108: 173-180.

Schlogl, P. S., dos Santos, A. L. W., Vieira, L. N., Floh, E. I. S., Guerra, M. P. 2012b. Cloning and expression of embryogenesis-regulating genes in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Brazilian Pine). Genet Mol Biol 35:172-181.

Schmidt, T., Ewald, A., Seyring, M., Hohe, A. 2006. Comparative analysis of cell cycle events in zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* indicates strong resemblance of somatic embryos to recalcitrant seeds. Plant Cell Rep 25:643–650.

Sghaier, B., Bahloul, M., Bouzid, R. G., Drira, N. 2008. Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: Comparative study. Scientia Horticulturae 116:169–175.

Shao, L., Bhatnagar, P., Majumdar, R., Minocha, R., Minocha, S. C. 2014. Putrescine over production does not affect the catabolism of spermidine and spermine in poplar and Arabidopsis. Amino Acids 46:743–757. doi:10.1007/s00726-013-1581-2.

Sharma, K. K., Thorpe, T. A. 1995. Asexual embryogenesis in vascular plants in nature. In: In vitro embryogenesis in plants. Thorpe, T. A. (eds) Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. p. 17-72.

Shimizu, J. Y., Jaeger, P., Sopchaki, S. A. 2000. Genetic variability in a remnant population of araucaria in the Iguaçu National Park, Brazil. Bol Pesq Florestais 41:18-36.

Shimoya, C. 1962. Contribuição ao estudo do ciclo biológico de *Araucaria angustifolia* (Bertolini) O. Ktze. Experientie 02:519-540.

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

Silveira, V., Floh, E. I. S., Handro, W., Guerra, M. P. 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76:53-60.

Silveira, V., Santa-Catarina, C., Balbuena, T. S., Moraes, F. M. S., Ricart, C. A. O., Sousa, M. V., Guerra, M. P., Handro, W., Floh, E. I. S. (2008) Endogenous abscisic acid levels and comparative proteome during seed development of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Biol Plantarum 52:101-104.

Silveira, V., Santa-Catarina, C., Tun, N. N., Scherer, G. F. E., Handro, W., Guerra, M. P., Floh, E. I. S. 2006. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Plant Science 171:91-98.

Singh H. Embryology of Gimnosperms. Encyclopedia of plant anatomy. Berlin:Gebruder Borntraeger; 1978.

Smertenko, A., Bozhkov, P. V. 2014. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. Journal of Experimental Botany 65:1343-1360.

Sousa, V. A., Hattemer, H. H. 2003a. Fenologia Reprodutiva da *Araucaria angustifolia* no Brasil. Bol. Pesq. Fl. 47:19-32.

Sousa, V. A., Hattemer, H. H. 2003b. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. Aust J Bot 51:309-317.

Souza, V. A., Aguiar, A. V. 2012. Programa de melhoramento genético de Araucária da Embrapa Florestas: situação atual e perspectivas. Embrapa Florestas, v1, 38 p.

Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E. C., Thorpe, T. A. 2002. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. In Vitro Cell Dev Biol Plant 38:93-105.

Stasolla, C., Yeung, E. C. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. Plant Cell Tissue Organ Cult. 74:15-35.

Steiner, N., Santa-Catarina, C., Andrade, J. B. R., Balbuena, T. S., Guerra, M. P., Handro, W., Floh, E. I. S., Silveira, V. 2008. *Araucaria angustifolia* Biotechnology. Functional Plant Science and Biotechnology 2:20-28.

Steiner, N., Santa-Catarina, C., Guerra, M. P., Cutri, L., Dornelas, M. C., Floh, E. I. S. 2012. A gymnosperm homologo of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cul 109:41-50.

Steiner, N., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Floh, E. I. S., Guerra, M. P. 2007. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. Plant Cell Tiss Organ Cult 89:55-62.

Sutton, B. 2002. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. Ann For Sci. 59:657-661.

Takeda, T., Hayakawa, F., Oe, K., Matsuoka, H. 2002. Effects of exogenous polyamine on embryogenic carrot cells. Biochem Eng J 12: 21–28.

Tautorus, T. E., Fowke, L. C., Dunstan, D. I. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. Canadian Journal of Botany 69:1873-1899.

Tavladoraki, P., Cona, A., Federico, R., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., Battaglia, V., Toninello, A., Agostinelli, E. 2012. Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. Amino Acids 42:411-426.

Tereso, S., Zoglauer, K., Milhinhos, A., Miguel, C., Oliveira, M. M. 2007. Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. Tree Physiology 27:661–669.

Thibaud-Nissen, F. O., Shealy, R. T., Khanna, A., Vodkin, L. O. 2003. Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. Plant Physiol 132:118–136.

Tiburcio, A. F., Altabella, T., Borrell, A., Masgrau, C. 1997. Polyamine metabolism and its regulation. Physiol Plantarum 100:664-674.

Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. I. S., Scherer, G. F. E. 2006. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant and Cell Physiology 47:346-354.

Urano, K., Hobo, T., Shinozaki, K. 2005. *Arabidopsis ADC* genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. FEBS Lett 579:1557–1564.

Vestman, D., Larsson, E., Uddenberg, D., Cairney, J., Claphan, D., Sundberg, E., von Arnold, S. 2011. Important process during differentiation and early development of somatic embryos of Norway spruce as revealed by changes in global gene expression. Tree Genetics & Genomes 7: 347-362.

Vieira, L. N., Santa-Catarina, C., Fraga, H. P. F., dos Santos, A. L. W., Steinmacher, D. A., Schlogl, P. S., Silveira, V., Steiner, N., Floh, E. I. S., Guerra, M. P. 2012. Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. Plant Science 195:80-87.

von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filanova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult 69:233-49.

Vuosku, J., Jokela, A., Läärä, E., Sääskilahti, M., Muilu, R., Sutela, S., Altabella, T., Sarjala, T., Häggman, H. 2006. Consistency of polyamine profiles and expression of arginine decarboxylase in mitosis during zygotic embryogenesis of Scots pine. Plant Physiology 142:1027-1038.

Vuosku, J., Suorsa, M., Ruottinen, M., Sutela, S., Muilu-Mäkelä, R., Julkunen-Tiitto, R., Sarjala, T., Neubauer, P., Häggman, H. 2012. Polyamine metabolismo during exponential growth transition in Scots pine embryogenic cell culture. Tree Physiol 32:1274–1287.

Vuosku, J., Sutela, S., Tillman-Sutela, E., Kauppi, A., Jokela, A., Sarjala, T., Häggman, H. 2009. Pine embryogenesis many licences to kill for a new life. Plant Signaling & Behavior 4:10, 928-932.

Wallace, H. M., Fraser, A. V., Hughes, A. 2003. A perspective of polyamine metabolism. Biochem. J. 376:1–14.

Walters, C., Wesley-Smith, J., Crane, J., Hill, L. M., Chmielarz, P., Pammenter N. W., Berjak, P. 2008. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds. pp. 465-484. In: Reed, B. M. (ed.) Plant Cryopreservation: A practical guide. Springer Publishing, New York, NY.

Wendling, I. 2011. Enxertia e florescimento precoce em *Araucaria angustifolia*. Comunicado Técnico 272:1-7.

Zimmerman, J. L. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. Plant Cell. 5:1411-1423.

Zonneveld, B. J. M. 2012. Genome sizes of all 19 Araucaria species are correlated with their geographical distribution. Plant Syst Evol 298:1249–1255.