LEONARDO LUCAS CARNEVALLI DIAS

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E ANÁLISE PROTEÔMICA
COMPARATIVA DURANTE A MATURAÇÃO, GERMINAÇÃO E CONVERSÃO EM
PLANTAS DE EMBRIÕES DE *Ocotea catharinensis* MEZ. (LAURACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

SÃO PAULO

2009

LEONARDO LUCAS CARNEVALLI DIAS

ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DURANTE A
MATURAÇÃO, GERMINAÇÃO E CONVERSÃO EM PLANTAS DE EMBRIÕES DE *Ocotea*
catharinensis MEZ. (LAURACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Eny lochevet Segal Floh

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Dias, Leonardo Lucas Carnevalli.

Aspectos fisiológicos, bioquímicos e análise proteômica comparativa durante a maturação, germinação conversão em plantas de embriões de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae) / Leonardo Lucas Carnevalli Dias. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Eny lochever Segal Floh.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Fisiologia vegetal.

Versão do título para o inglês: Physiological, biochemical aspects and comparative proteomic during maturation, germination and seedling conversion of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).

Descritores: 1. Embriogênese somática 2. Biotecnologia vegetal 3. Fisiologia vegetal 4. Bioquímica de plantas 5. Proteômica 6. Cultura de tecidos vegetais I. Floh, Eny lochever Segal II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB47/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Leonardo Lucas Carnevalli Dias.

Título da Tese: Aspectos fisiológicos, bioquímicos e análise proteômica comparativa durante a maturação germinação conversão em plantas de embriões de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).

Orientador(a): Eny lochever Segal Floh.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

“Não sou nada.

Nunca serei nada.

Não posso querer ser nada.

À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Álvaro de Campos (Fernando Pessoa)

A meus pais, Carlos Wagner e Cleide
Meu irmão Cláudio e minha irmã Mônica

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um privilégio! Só podemos agradecer por aquilo que vivenciamos e nos foi válido. Não importa o quão duro foi, nem pelo término que se aproxima, mas valeu por cada passo e cada minuto vivido. Por esses motivos agradeço:

A Deus pelo milagre cotidiano da vida;

A Universidade de São Paulo pela oportunidade e excelentes condições disponibilizadas;

A Fundação de Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela bolsa, essencial para minha estadia em São Paulo e por disponibilizar recursos para a pesquisa.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) pelo curso de doutorado e ao Instituto de Biociências (IB) por abrigar minha pesquisa.

A meus pais, Carlos Wagner e Cleide Terezinha, por me fornecer condições para caminhar com minhas próprias pernas.

A meu irmão Cláudio e minha irmã Mônica pela irmandade e carinho, mesmo distantes.

Aos familiares de São Paulo, meus tios-avós Mário, Luiz, Lúcia, Teresinha e Margarida, além de minhas primas Margaret e Marieta, pela carinhosa acolhida.

A profa. Eny lochevet Segal Floh, a quem fico em débito por esperar muito mais de minha pessoa, e a qual sou eternamente grato pela oportunidade oferecida.

Aos amigos, prof. Vanildo Silveira e profa. Claudete Santa-Catarina pela paciência nos ensinamentos e pela amizade construída.

As “meninas” do laboratório: Amanda Macedo, Julia Andrade, Juliana Souza e Yve Silva, pela convivência, amizade, brincadeiras, discussões e por tornarem mais suaves os dias que se apresentavam pesados, e especialmente à Fernanda Pieruzzi, pela fundamental ajuda na manutenção das culturas embriogênicas.

Ao grande amigo de doutorado e de corridas, Tiago Balbuena, pela ajuda na identificação das proteínas no Max Planck, por compartilhar bancada e pontos de vista, pelo exemplo de pessoa e pesquisador.

Aos demais amigos do BIOCEL e laboratórios associados, André Wendt, Leonardo Jo, Marcelo Bregola, Cíntia Sousa, Paula Videla, Renata Osti, Felipe e Roberta, pelos momentos compartilhados.

A técnica Carmem Silvia Freitas pelo importante apoio técnico no dia a dia do laboratório e pela amizade.

Aos amigos de USP, Valéria Carvalho, Marcelo Matsudo, Cíntia Baptistucci, Flávia Gehrke, Ana Azzuz, Carol Antunes e Ana Rachel.

Ao Instituto Florestal da Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Estado de São Paulo pela permissão para a coleta de sementes, e aos Srs. Antonio da Silva e Osny Tadeu de Aguiar pelo auxílio na identificação das plantas matrizes, e ao Sr. Hugo pela coleta das sementes.

Aos diversos laboratórios que auxiliaram nas tentativas de identificação de proteínas: Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (LVTA-UFMG) por meio do prof. Adriano Monteiro Pimenta; Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP-UnB) por meio do prof. Carlos André Ricart; Laboratório Max Feffer (ESALQ-USP), por meio do prof. Carlos Labate.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia: Eliana, Marcos e Fábria, pelo auxílio em todos os momentos, especialmente naqueles mais cruciais. Aos amigos de perto e de longe que indiretamente foram essenciais para a conclusão desta etapa.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

DIAS, L.L.C. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos e análise proteômica comparativa durante a maturação, germinação e conversão em plantas de embriões de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2009.

Diversos trabalhos têm demonstrado uma grande similaridade entre os eventos da embriogênese zigótica e somática. Esta semelhança permite com que sejam estabelecidos parâmetros para o acompanhamento destes dois processos de desenvolvimento. A embriogênese somática apresenta-se como uma ferramenta biotecnológica de grande valia na propagação de espécies recalcitrantes e de difícil propagação, tais como *Ocotea catharinensis*, uma arbórea nativa da Mata Atlântica que se encontra vulnerável de extinção. No presente trabalho foi estudada a embriogênese somática, nas fases de maturação e germinação, e a embriogênese zigótica, buscando-se a analogia entre os dois processos. Também foi estudado o processo germinativo da semente zigótica. Foram avaliados diferentes parâmetros bioquímicos como: ácido abscísico (ABA), ácido indol-acético (AIA), poliaminas (PAs) e aminoácidos livres, além da expressão diferencial de proteínas. Visando a maturação dos embriões somáticos foram testados tratamentos com indução de estresse osmótico (por meio da adição de polietileno glicol – PEG) e adição de ácido abscísico (ABA). O tratamento com adição de ABA + PEG apresentou variações semelhantes a apresentadas por embriões zigóticos no estágio de maturação, sendo observada uma redução na razão Put.(Spd + Spm)⁻¹, incremento nos níveis de ABA e incremento nos níveis de asparagina. Nos estudos visando a germinação dos embriões somáticos foram testados diferentes tratamentos com adição de ácido giberélico (GA₃) em combinações com auxina (ácido naftalacético – ANA) ou citocinina (benziladenina – BA), sendo que em parte dos tratamentos, os embriões somáticos foram submetidos a um estresse hídrico (desidratação por 4 dias em placa de Petri). Não observou-se a germinação para nenhum dos tratamentos testados, contudo verificou-se que o tratamento prévio com desidratação promoveu alterações bioquímicas importantes para o processo de germinação, indicando a necessidade deste tratamento na indução da maturação em embriões somáticos. Nos estudos proteômicos realizados com embriões somáticos submetidos aos

tratamentos visando a maturação e germinação, não foram observadas diferenças na expressão diferencial de proteínas, possivelmente decorrente da baixa expressão de proteínas diferenciais, ou da baixa sensibilidade dos embriões aos tratamentos testados. Com relação ao embrião zigótico, ao longo do processo germinativo, não foi observada a síntese de novas proteínas. Praticamente, 90% das proteínas expressas durante a emissão da radícula, já estavam presentes na semente madura. Os estudos proteômicos realizados ao longo do desenvolvimento da semente, permitiram a seleção de polipeptídeos com expressão diferencial. A identificação de treze proteínas por espectrometria de massas, possibilitou o melhor entendimento dos eventos durante a maturação em sementes recalcitrantes. Observou-se a expressão de proteases, proteínas relacionadas à síntese de reservas e proteínas do metabolismo oxidativo. Estes dois últimos grupos de proteínas apresentam potencial para a utilização como marcadores do desenvolvimento, uma vez que houve um expressivo incremento na abundância destas no embrião maduro. Os resultados obtidos no presente trabalho abrem perspectivas para a avaliação dos parâmetros fundamentais para a otimização da metodologia, e para a identificação de marcadores das diferentes etapas da embriogênese somática, para espécies com sementes recalcitrantes, como *O. catharinensis*.

Palavras-chave: *Ocotea catharinensis*; Embriogênese somática; Embriogênese zigótica; Proteômica vegetal; Germinação; Sementes recalcitrantes.

ABSTRACT

DIAS, L.L.C. **Physiological, biochemical aspects and comparative proteomic during maturation, germination and seedling conversion of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae).** Doctor's thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Several works have been demonstrating a great similarity among the events of zygotic and somatic embryogenesis. This likeness allows the establishment of parameters for accompaniment of these processes. The somatic embryogenesis is a biotechnological tool which can be used was worth in the propagation of recalcitrant species, such as *Ocotea catharinensis*, an arboreal native of the Atlantic Rain Forest that is vulnerable to extinction. In the present work it was studied the somatic embryogenesis, in the maturation and germination phases, and the zygotic embryogenesis, in order to screen analogies between both processes. It was also studied the germination process of the zygotic seed. The followed biochemical parameters were evaluated: abscisic acid (ABA), indol-acetic acid (IAA), polyamines (PAs) and free amino acids, besides the differential expression of proteins. Aiming the maturation of somatic embryos, treatments were tested through osmotic stress induction (addition of polyethylene glycol–PEG) and addition of abscisic acid (ABA). The treatment with addition of ABA + PEG presented similar variations for zygotic embryos in the maturation stage, being observed a reduction in the reason Put. (Spd + Spm)⁻¹, increment in the levels of ABA and asparagine levels. In the germination studies of the somatic embryos different treatments were tested through addition of gibberellic acid (GA₃) in combinations with auxin (naphtaleneacetic acid–NAA) or cytokinin (benzylaminopurine–BAP), and in part of the treatments, the somatic embryos were submitted to a water stress (dehydration for 4 days in Petri dishes). The germination was not observed in none of the treatments; however, it was verified that the previous treatment with dehydration promoted important biochemical alterations for the germination process, indicating the need of this treatment in the induction of mature somatic embryos. In the proteomic studies, carried out with somatic embryos submitted to the treatments for maturation and germination, differences were not observed in differential expression of proteins, possibly due to the low abundant of new expressed proteins, or of the low sensitivity of embryos to the tested treatments. With relation to the zygotic embryo, throughout the germination

process, the synthesis of new proteins was not observed. Practically, 90% of proteins expressed during the radicle emergence, were already present in the mature seed. The proteomic studies carried out throughout seed development, allowed the selection of polypeptides with differential expression. The identification of thirteen proteins from mass spectrometry assays, allowed a better understanding of the events during maturation in recalcitrant seeds. It was observed the proteases expression, seed storage proteins and proteins of the oxidative metabolism. Moreover, oxidative and storage related proteins present potential use as development markers, once there was an expressive increment in the abundance of these in the mature seed. The results obtained in the present work open perspectives for the evaluation of the fundamental parameters for the methodology optimization, and for the identification of markers of the different stages of the somatic embryogenesis, for species with recalcitrant seeds, like *O. catharinensis*.

Key words: *Ocotea catharinensis*; somatic embryogenesis; zygotic embryogenesis; plant proteomic; seed germination; recalcitrant seeds.

Sumário

CAPITULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	15
1.1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1.2 Embriogênese.....	16
1.1.1.1 Maturação.....	18
1.1.1.2 Germinação	19
1.1.2 Aspectos Bioquímicos	22
1.1.2 Proteômica.....	24
1.1.3 <i>Ocotea catharinensis</i> como sistema de estudo	27
1.2 OBJETIVOS	30
1.2.1 Objetivo Geral.....	30
1.2.2 Objetivos Específicos	30
 CAPITULO 2 - AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS E PROTEÔMICA COMPARATIVA EM CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>O. CATHARINENSIS</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE OSMÓTICO E ADIÇÃO DE ABA VISANDO A MATURAÇÃO.	 31
2.1 INTRODUÇÃO	32
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.2.1 Material vegetal	33
2.2.2 Estresse osmótico e adição de ABA na indução da maturação de embriões somáticos	34
2.2.3 Determinações bioquímicas	34
2.2.4 Análises Proteômicas	37
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
 CAPITULO 3 - AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS E ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA EM EMBRIÕES SOMÁTICOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE HÍDRICO E INDUÇÃO À GERMINAÇÃO.....	 50
3.1 INTRODUÇÃO	51
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.2.1 Material vegetal	52
3.2.3 Indução da germinação dos embriões somáticos	53
3.2.4 Determinações bioquímicas	53
3.2.5 Análises proteômicas.....	53
3.2.6 Análise dos resultados.....	54

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
--	-----------

CAPITULO 4 - AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS E ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DURANTE A GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>O. CATHARINENSIS</i>.....	73
--	-----------

4.1 INTRODUÇÃO	74
-----------------------------	-----------

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
-------------------------------------	-----------

<i>4.2.1 Material vegetal</i>	<i>75</i>
-------------------------------------	-----------

<i>4.2.2 Germinação das sementes.....</i>	<i>75</i>
---	-----------

<i>4.2.3 Determinações bioquímicas</i>	<i>76</i>
--	-----------

<i>4.2.4 Análise proteômica</i>	<i>76</i>
---------------------------------------	-----------

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
--	-----------

CAPÍTULO 5 - ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>O. CATHARINENSIS</i>.....	90
--	-----------

5.1 INTRODUÇÃO	91
-----------------------------	-----------

5.2 MATERIAL E MÉTODOS	92
-------------------------------------	-----------

<i>5.2.1 Material Vegetal.....</i>	<i>92</i>
------------------------------------	-----------

<i>5.2.2 Análise proteômica</i>	<i>92</i>
---------------------------------------	-----------

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
--	-----------

CAPITULO 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
---	------------

REFERÊNCIAS	111
--------------------------	------------

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.2 *Embriogênese*

A embriogênese é uma das etapas mais importantes no ciclo de vida das plantas. O processo se inicia com a dupla fertilização, em angiospermas, seguido pela determinação dos três eixos embrionários (longitudinal, lateral e radial), e uma sequência de alterações na morfologia do embrião, passando pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Subsequentemente, proteínas de reserva são acumuladas no embrião, e finalmente, estes passam pelo processo de desidratação e entram em dormência (IKEDA et al., 2006).

Na fase final do desenvolvimento da maioria das sementes, a maturação e a desidratação são eventos normais, após os quais, elas passam para um estado metabolicamente quiescente, podendo permanecer neste estado por anos, como é o caso das sementes ortodoxas (HOEKSTRA et al., 2001; GALLARDO et al., 2002). Entretanto, algumas sementes não toleram uma alta desidratação durante a maturação, e por isso não podem ser armazenadas por um longo período, perdendo a viabilidade após poucos meses de armazenamento (BEWLEY e BLACK, 1994). Estas sementes são consideradas como recalcitrantes segundo a classificação proposta por Roberts (1973).

Os processos que ocorrem ao longo da embriogênese são regulados por numerosos fatores, incluindo fitormônios, enzimas e outras substâncias importantes para esta rota morfogenética. Vários estudos têm sido conduzidos usando diversas técnicas experimentais com o objetivo de compreender os mecanismos de controle envolvidos no processo de embriogênese. Neste sentido, o sistema de embriogênese somática pode ser considerado como uma ferramenta biotecnológica e experimental amplamente empregada e eficiente para estudos nesse campo (IKEDA et al., 2006).

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 (Figura 1), bioquímicos e moleculares, incluindo a expressão protéica (HAKMAN, 1993; HVOSLEF-EIDE e CORKE, 1997; SGHAIER et al., 2008), gênica (THIBAUD-NISSEN et al., 2003; IKEDA e KAMADA, 2005; CAIRNEY et al., 2006; SCHMIDT et al., 2006) e diferentes metabólitos (KORMUTAK et al., 2003; JIMENEZ, 2005; TERESO et al., 2007; PESCADOR et al., 2008). 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).

Figura 1 – Similaridades morfológicas observadas durante a embriogênese zigótica e somática em *Pinus taeda* (OH et al., 2008).

Sistemas de embriogênese somática e micropropagação têm sido utilizados, com relativo sucesso, para diferentes sistemas vegetais, objetivando a multiplicação e conservação de espécies lenhosas (JAIN e ISHII, 1998). A aplicação de técnicas biotecnológicas, como é o caso da embriogênese somática, possibilita que sejam transpostas barreiras e dificuldades encontradas na propagação convencional de espécies nativas recalcitrantes. Os sistemas de embriogênese somática apresentam inúmeras vantagens sobre outros sistemas de propagação *in vitro*. Destacam-se as altas taxas de multiplicação clonal, o desenvolvimento dos meristemas caulinares e radiculares simultaneamente, a possibilidade de produção em larga escala em biorreatores, síntese de metabólitos secundários, e a produção de sementes sintéticas, apropriadas para a criopreservação (JAIN e ISHII, 1998; VIANA et al., 1999).

Em muitos sistemas vegetais, os principais entraves para a utilização da embriogênese somática em larga escala consistem nas baixas taxas de indução, maturação, germinação e conversão dos embriões somáticos em plantas normais (ARA et al., 2000; EL MESKAOUI et al., 2006).

1.1.1.1 Maturação

A maturação é considerada uma etapa fundamental do desenvolvimento do embrião, e para a subsequente germinação e desenvolvimento da plântula (PERÁN-QUESADA et al., 2004). No processo de embriogênese zigótica, a maturação é caracterizada pela síntese de substâncias de reserva, seguida pela desidratação, a qual promove uma redução gradual do metabolismo (VON ARNOLD et al., 2002). Durante o desenvolvimento embrionário, a deposição de substâncias de reserva é um processo chave, fornecendo os compostos que serão usados desde os estádios iniciais do desenvolvimento até a autotrofia, após a germinação (MERKLE et al., 1995).

Sementes ortodoxas apresentam uma maior tolerância à desidratação, ao passo que sementes recalcitrantes, tal como *Ocotea catharinensis*, são sensíveis a este processo, tanto ao longo do desenvolvimento quanto após se desprenderem da planta-mãe (BERJAK e PAMMENTER, 2007). Os mecanismos de tolerância à desidratação nas sementes recalcitrantes podem estar ausentes, ou então, presentes de maneira não funcional. Entretanto, informações a respeito das alterações bioquímicas e celulares produzidas pela desidratação em sementes recalcitrantes são muito escassas (BERJAK e PAMMENTER, 2003; FLORES, 2003), dificultando uma melhor compreensão dos eventos que ocorrem durante este processo.

A tolerância à desidratação está relacionada com a lenta perda de água pelas células, e inclui a capacidade destas em reidratar-se novamente (HOEKSTRA et al., 2001). Os mecanismos de tolerância estão baseados na troca da água por moléculas que formam pontes de hidrogênio, e que possibilitam a saída lenta de água, protegendo a membrana celular contra os danos ocasionados pela desidratação (HOEKSTRA et al., 2001). Esta tolerância está correlacionada com a presença de consideráveis quantidades de oligossacarídeos e proteínas específicas,

tais como proteínas LEA (“late embryogenesis abundant”), armazenadas na fase final da embriogênese, durante o processo de maturação (HOEKSTRA et al., 2001). A condição fisiológica e morfológica dos embriões maduros, como resultado do processo de maturação e desidratação, afeta diretamente a germinação e subsequentemente, o crescimento e desenvolvimento da plântula (GRIGA et al., 2007).

Muitas hipóteses são propostas para explicar as bases fisiológicas da recalcitrância em sementes (CONNOR e BONNER, 2001). Dois principais fatores propostos para a rápida perda da viabilidade das sementes recalcitrantes são: a) as consequências de um metabolismo desbalanceado durante a desidratação; e b) os danos promovidos pela desidratação “strictu sensu”, com a remoção da água essencial para a integridade das estruturas intercelulares (BERJAK e PAMMENTER, 2003).

Estudos demonstram que a maturação das sementes é controlada metabolicamente através da disponibilidade de nitrogênio, uma vez que a síntese de proteínas de reserva na semente é limitada pela capacidade de assimilação deste elemento (GUTIERREZ et al., 2007; WEIGETH et al., 2008). Vários genes codificadores de proteínas de reserva são regulados pelo conteúdo de nitrogênio (HERNANDEZ-SEBASTIA et al., 2005). Devido à importância deste elemento no processo de maturação, mudanças no metabolismo de nitrogênio, seguidas pelo acúmulo de proteínas de reserva, também ocorrem em resposta à suplementação de compostos ao meio de cultura, conhecidos como promotores de maturação, como o ácido abscísico (ABA) (STASOLLA et al., 2002).

Neste sentido, a maturação adequada dos embriões zigóticos e somáticos parece ser fator essencial para a sua eficiente conversão em plântula (GORBATENCKO e HAKMAN, 2001)

1.1.1.2 Germinação

A germinação é uma das etapas mais críticas do desenvolvimento vegetal, sendo resultado de um complexo controle espacial e temporal do metabolismo, onde vários hormônios atuam na regulação da expressão de múltiplos genes (BARENDSE e PEETERS, 1995; SHEORAN et al., 2005). Aparentemente todos os componentes

necessários para a atividade metabólica durante a germinação estão presentes em formas potencialmente ativas em sementes maduras dessecadas, incluindo mRNAs, proteínas ribossomais e fatores de iniciação ao alongamento. Evidenciando esta condição, sementes de *Arabidopsis* germinaram em presença de inibidores transcricionais, mas não em presença de inibidores traducionais (RAJJOU et al., 2004). Durante o processo germinativo ocorrem vários eventos (Figura 2), tais como: ativação da respiração (BEWLEY e BLACK, 1994), reparo de macromoléculas (OSBORNE, 1983), mobilização de reservas (GALLARDO et al., 2001), e re-iniciação do ciclo celular (VASQUEZ-RAMOS e SANCHEZ, 2003). Alguns eventos são exclusivos de sementes ortodoxas, uma vez que as sementes recalcitrantes e altamente recalcitrantes não apresentam tolerância à desidratação, sendo que estas suportam apenas pequenas reduções quanto ao seu grau de hidratação. (Figura 2).

Em condições favoráveis de umidade e temperatura, a semente, caso não apresente dormência, tem o seu metabolismo reativado e inicia o processo de germinação, que pode ser dividido em três fases: embebição, aumento da atividade metabólica e início do crescimento (BEWLEY e BLACK, 1994). Morfologicamente, o início da germinação corresponde à emergência da radícula e o subsequente crescimento é geralmente definido como crescimento da plântula (GALLARDO et al., 2002).

As alterações fisiológicas observadas durante a germinação são resultado do rigoroso controle transcricional e pós transcricional (CATUSSE et al., 2008). Durante o desenvolvimento da semente, o metabolismo é altamente anabólico, sendo caracterizado pela síntese e depósito de reservas. Em contraste, durante a germinação e crescimento inicial, ocorre a mobilização de energias para o crescimento da plântula (GALLARDO et al., 2001)

Sabe-se que o controle da germinação e o crescimento da plântula, são cruciais para a sobrevivência da futura geração, existindo pontos chave na transição da dormência para germinação, e da germinação para o crescimento (KERMODE, 2005). A natureza dos processos envolvidos na regulação precisa da ativação metabólica durante a maturação-desidratação e germinação, entretanto, permanece pouco esclarecida (GALLARDO et al., 2002), especialmente ao que se refere às espécies recalcitrantes.

Figura 2 – Eventos e alterações fisiológicas nas etapas de desidratação e posterior embebição, durante o desenvolvimento do embrião e germinação, considerando-se três tipos de sementes: ortodoxas, recalcitrantes e altamente recalcitrantes. Os eventos marcados (*) não ocorrem em sementes recalcitrantes e altamente recalcitrantes (adaptado de FARIA, 2004).

Aproximadamente 92% das espécies espermatófitas apresentam sementes tolerantes à desidratação, sendo uma característica comum a todas as espécies pioneiras (TWEDDLE et al., 2003). A maior frequência de sensibilidade a este processo ocorre em espécies não pioneiras de florestas tropicais, sendo que apenas 48% destas espécies apresentam sementes tolerantes à desidratação. As espécies com sementes recalcitrantes parecem ter origens a partir de locais mais úmidos e, portanto, adequados ao processo germinativo continuamente (BERJAK et al. 1984). Nos estádios finais da sucessão florestal, ocorre uma maior retenção de umidade pelo ambiente, o que é marcante nos sub-bosques de vegetações tropicais no estado clímax. Assim, a dispersão de sementes recalcitrantes contendo alto grau de

umidade e na ausência de dormência, em um ambiente com umidade e luz adequadas, culmina rapidamente no processo germinativo (DAVIDE et al., 2003).

Alguns estudos demonstram que as anormalidades apresentadas durante a conversão do embrião somático à plântula são bastante similares às observadas em culturas de embriões zigóticos imaturos (DAHMER, 1988¹ apud MOON e HILDEBRAND, 2003). Atribui-se a baixa taxa de germinação de embriões somáticos, possivelmente, como consequência de uma falha no processo de maturação, levando a deficiência no acúmulo de substâncias de reserva, danos durante a desidratação/rehidratação, ou ainda uma insuficiente tolerância a desidratação (MOON e HILDEBRAND, 2003). A mobilização de reservas é descrita como processo crucial no controle da germinação. Apesar de relacionadas temporalmente, a germinação e a mobilização de reservas são eventos distintos (PRITCHARD et al., 2002).

1.1.2 Aspectos Bioquímicos

Estudos indicam que nos sistemas vegetais, os processos de desenvolvimento resultam de um complexo controle espacial e temporal, no qual os hormônios apresentam papel crucial, atuando na regulação da expressão de múltiplos genes (BARENDSE e PEETERS, 1995). Estes compostos regulam e integram o crescimento de cada estrutura individualmente, permitindo o correto desenvolvimento da planta (GASPAR et al., 2003).

Dentre os hormônios, destaca-se as poliaminas (PAs), as quais atuam na regulação de vários processos, como a biossíntese de macromoléculas, divisão e diferenciação celular, organogênese e embriogênese (BOUCHEREAU et al., 1999; MINOCHA et al., 1999; KUSANO et al., 2008). As poliaminas estão relacionadas a respostas a estresses ambientais, tais como deficiências minerais, estresse osmótico e salino (PEREZ-AMADOR et al., 2002). As principais PAs encontradas nas plantas superiores são a Put (putrescina), a Spd (espermidina) e a Spm (espermina), ocorrendo na forma livre ou conjugada com ácidos fenólicos e

¹ DAHMER, M.L. **Accumulation of embryo storage products during *in vitro* embryogenesis of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]** Ph.D. (dissertation) - University of Kentucky, USA, 1988.

moléculas de baixo peso molecular (BOUCHEREAU et al., 1999; KUZNETSOV et al., 2006).

O interesse de pesquisas relacionando as poliaminas (PAs) com o processo de embriogênese somática (BAJAJ e RAJAM, 1996; YADAV e RAJAM, 1998; MINOCHA et al., 1999; SILVEIRA et al., 2006; SANTA-CATARINA et al., 2007) tem aumentado nos últimos anos, embora os mecanismos de ação ainda não estejam esclarecidos (WALDEN et al., 1997; KAKKAR et al., 2000). Adicionalmente, a maioria destes estudos relacionam o efeito da adição das diferentes PAs na resposta morfogênética, sendo ainda escassos na literatura, trabalhos que relacionam o metabolismo de PAs com o processo de maturação e germinação dos embriões somáticos. Os estudos existentes demonstram que baixos níveis de Put livre e conjugada, e altas quantidades de Spd livre e conjugada foram associadas às altas taxas de conversões de embriões somáticos em *Quercus petraea* (CVIKORVÁ et al., 1998). Recentes estudos demonstraram uma interação da ação das auxinas e poliaminas (LIU et al., 1997; NAG et al., 2001).

As auxinas influenciam vários eventos relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal. Dentre as auxinas, a mais amplamente encontrada nos vegetais é o AIA (ácido indol acético) (GASPAR et al., 1996). Esta substância está envolvida no controle do desenvolvimento da semente, em especial, na determinação da orientação do eixo embrionário nas fases iniciais da embriogênese (ROCK e QUATRANO, 1995; KONG et al., 1997; SANTA-CATARINA et al., 2006). Alguns estudos têm relatado a influência dos níveis endógenos de AIA no controle da maturação na embriogênese somática de espécies vegetais (KORLACH e ZOGLAUER, 1995; LIAO et al., 2008). Entretanto, avaliações da importância e do metabolismo de AIA durante o processo germinativo propriamente dito, ainda são escassos na literatura.

O ácido abscísico (ABA) é outro hormônio que regula diversos processos durante o desenvolvimento vegetal, sendo especialmente importante nos eventos chave relacionados com a formação da semente, tais como: deposição de substâncias de reserva, a aquisição de tolerância a desidratação, a prevenção da germinação precoce, e a indução da dormência primária (KERMODE, 2005). Dentre os hormônios envolvidos na germinação, o ABA atua em diferentes fases durante este processo (BEWLEY e BLACK, 1994). Estudos demonstram que embriões maduros e desidratados, para uma grande variedade de espécies, apresentam o

acúmulo de ABA, o qual impõe um estado de dormência (ROCK e QUATRANO, 1995). Informações sobre os níveis endógenos de ABA permitem que se tenha conhecimento sobre o estágio de desenvolvimento do embrião somático, possibilitando o monitoramento de sua evolução morfogênética.

Além dos hormônios, outros compostos como os aminoácidos, são importantes para o desenvolvimento vegetal. Nas sementes, os níveis de aminoácidos apresentam alterações ao longo do desenvolvimento. Estas alterações refletem mudanças entre a produção e a utilização destas moléculas, onde pequenas variações na taxa da síntese protéica podem causar grandes flutuações nos níveis dos aminoácidos (MACNICOL, 1983). Segundo Durzan e Chalupa (1976), as flutuações nos níveis de aminoácidos livres, durante a embriogênese, sugerem um efetivo controle genético quanto ao metabolismo do nitrogênio, determinando forma de crescimento, volume e massa seca da semente. Adicionalmente, os aminoácidos armazenados durante o desenvolvimento da semente são utilizados no processo de germinação, servindo como nutrientes e substrato para o desenvolvimento inicial da plântula (ROCK e QUATRANO, 1995; DIAS et al., 2009).

1.1.2 Proteômica

Nas últimas décadas os códigos genéticos de diversos organismos foram completamente seqüenciados, representando um importante avanço do conhecimento na área da genômica. Contudo, a obtenção da seqüência de nucleotídeos do genoma de um organismo, por si só, representa apenas o primeiro passo para a realização de diversos estudos a respeito do entendimento da regulação da expressão gênica. No contexto das “ômicas” grande ênfase tem-se dado à genômica funcional, que visa a identificação da seqüência e função dos genes e proteínas, por meio de estudos do transcriptoma e proteoma dos organismos vivos. O uso de tecnologias pós genômicas, como a proteômica, permite uma melhor compreensão das bases moleculares dos processos de desenvolvimento (CATUSSE et al., 2008).

Estudos proteômicos podem revelar dinâmicas biológicas, além de propiciar informações funcionais sobre processos biológicos para diferentes fenótipos, os quais seriam inacessíveis ou difíceis de prever, empregando-se outras

metodologias de pesquisa, tais como a transcriptômica ou a genômica (CHEN e HARMON, 2006). Os estudos em proteômica apresentam quatro justificativas importantes: 1) a função gênica é levada à “ação” pelas proteínas, 2) a maior parte dos genes identificados (em torno de 85%) não tem nenhuma função conhecida, 3) a informação obtida usando a investigação pelo transcriptoma é incompleta, reflexo das modificações pós-traducionais e as interações proteína-proteína, 4) a correlação entre mRNA e níveis de proteína é inexplicavelmente baixa (JORRIN et al., 2006).

A eletroforese bidimensional (2-DE) é um método amplamente utilizado em estudos de proteômica comparativa, no qual o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, pois mesmo com as limitações inerentes a técnica, gera dados em um formato que possibilita uma fácil avaliação visual e permite comparações físico-químicas e quantitativas (CÁNOVAS et al., 2004). A 2-DE associada à espectrometria de massas MS/MS é uma das técnicas mais utilizadas para estudos em sistemas vegetais (Figura 3).

Tecidos vegetais apresentam uma série de dificuldades para estudos proteômicos por possuírem grande quantidade de água e baixa relação proteína/matéria fresca. Adicionalmente, possuem substâncias que interferem na análise protéica, como compostos fenólicos, enzimas proteolíticas e oxidativas, terpenóides, pigmentos, ácidos orgânicos, íons inibitórios e carboidratos. Após a extração, geralmente as proteínas devem ser precipitadas em soluções salinas, tamponantes e/ou solventes orgânicos, visando a eliminação da maioria destes interferentes (CARPENTIER et al., 2005).

Atualmente, uma das maiores dificuldades da proteômica vegetal é a capacidade de identificação de proteínas em espécies cujos genomas ainda não foram seqüenciados. A identificação e caracterização de proteínas são aceleradas pela disponibilidade de seqüências genômicas e de seqüências expressas (EST, Expressed Sequence Tags) (DIAS et al., 2007).

Figura 3 – Etapas da análise proteômica em plantas, utilizando-se a interface eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massas MS/MS (adaptado de CÁNOVAS et al., 2004).

Dentre as abordagens de estudos proporcionada pela proteômica, a proteômica comparativa é uma eficiente estratégia pois permite o estudo da expressão protéica ao longo de diferentes estádios de desenvolvimento, possibilitando a identificação de proteínas estágio-específicas, cuja expressão possa ser utilizada como marcadoras do desenvolvimento. Estudos proteômicos sobre o processo germinativo têm sido realizados por diferentes grupos, com enfoque especialmente, em proteínas que possam ser utilizadas como marcadoras do processo germinativo (GALLARDO et al., 2001; FINNIE et al., 2002; SHEORAN et al., 2005; BONSAGER et al., 2007).

A abordagem dos estudos do proteoma realizados neste trabalho objetivou compreender a associação entre o metabolismo de proteínas, com os processos de desenvolvimento embrionário, maturação e germinação, *in vitro* e *ex vitro*. Estas abordagens são diferenciadas, pois não tem como objetivo sequenciar todo o proteoma, num dado momento, mas abordar as implicações fisiológicas e

bioquímicas por meio da proteômica comparativa entre estádios de desenvolvimento.

1.1.3 *Ocotea catharinensis* como sistema de estudo

A Mata Atlântica é considerada um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em termos de diversidade biológica do planeta, sendo de fundamental importância sua conservação (MYERS et al., 2000). Ao longo do tempo, os recursos florestais envolvendo espécies arbóreas nativas têm sido amplamente explorados de maneira extrativista. Poucos foram os plantios de reposição realizados com estas espécies, dando-se prioridade aos reflorestamentos com espécies exóticas, principalmente as do gênero *Pinus* e *Eucalyptus*. A médio e longo prazo é inevitável a necessidade de um programa de recuperação e reposição de espécies nativas, com finalidades de proteção e de produção de madeiras nobres e/ou outros produtos comerciais. Programas desta natureza, entretanto, têm esbarrado em vários problemas, especialmente quando se utilizam os métodos de propagação tradicionais. A impossibilidade de formação de mudas em épocas distintas das que são produzidas as sementes em seu habitat, é um obstáculo na inclusão de espécies arbóreas tropicais em programas voltados à recuperação de áreas nativas degradadas (FONSECA e FREIRE, 2003). O estudo e pesquisa acerca da biologia da semente e da tolerância das plântulas aos estresses ambientais em áreas perturbadas tornam-se essenciais para programas de reflorestamento (SANCHEZ-CORONADO et al., 2007).

Ocotea catharinensis é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica e que faz parte da lista de espécies ameaçadas de extinção, na categoria de vulnerável (IUCN – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources – www.iucnredlist.org). Sua importância econômica está relacionada com a produção de madeira, sendo o principal produto a madeira serrada e roliça, muito valorizada na construção civil, naval e moveleira, e com a produção de quantidades significativas de óleos essenciais (CARVALHO, 1994). Esta espécie também produz lignanas e neolignanas, que são compostos biologicamente ativos, com efeito citotóxico em células tumorais (FUNASAKI, 2006). A irregularidade de frutificação e a baixa produção de sementes, associada às características recalcitrantes como a

ausência da dormência e o curto período de viabilidade, dificultam a propagação convencional desta espécie (SILVA, 1997; VIANA e MANTELL, 1999). Das 100 espécies florestais brasileiras estudadas por Carvalho (1994), *O. catharinensis* é aquela que apresenta um dos menores ritmos de crescimento em altura.

Como estratégia de reprodução e conservação desta espécie, a embriogênese somática é considerada uma alternativa bastante atraente. Vários aspectos do sistema de embriogênese somática em *O. catharinensis* foram estudados, tais como: o crescimento das culturas e a caracterização morfológica, citoquímica e bioquímica dos embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento (SANTA-CATARINA, 2005); o estabelecimento e manutenção de suspensões celulares a partir de culturas embriogênicas na fase de agregados celulares (MOSER et al., 2004); os fatores que promovem a embriogênese repetitiva no estágio cotiledonar inicial (SANTA-CATARINA et al., 2004a); a análise da competência embriogênica por meio da expressão do gene *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) em agregados celulares mantidos em diferentes meios de cultura e na presença ou ausência do 2,4-D (SANTA-CATARINA et al., 2004b), o efeito de PAs no desenvolvimento dos embriões somáticos e na síntese de óxido nítrico (SANTA-CATARINA et al., 2007), a estabilidade genética das culturas nas fases de agregados celulares e de embriões somáticos diferenciados (HANAI et al., 2009), e a germinação de embriões somáticos (VIANA e MANTELL, 1999).

Ressalta-se que o principal fator limitante para este sistema é a baixa taxa de conversão em plantas, decorrente das etapas de maturação e germinação dos embriões somáticos (Figura 4). Neste sentido, estudos visando compreender os eventos bioquímicos e moleculares associados aos processos de maturação e germinação de embriões somáticos e zigóticos de *O. catharinensis* são fundamentais para a melhoria do processo de embriogênese somática, e sua utilização como técnica biotecnológica e ferramenta para a propagação e conservação desta espécie arbórea ameaçada de extinção.

Figura 4 – Embriogênese somática em *O. catharinensis*. Em destaque no quadrado pontilhado as etapas de maturação e germinação. (Adaptado de Viana e Mantell, 1999)

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi o estudo dos eventos bioquímicos e moleculares associados aos processos de maturação e germinação de embriões somáticos e zigóticos de *O. catharinensis*.

1.2.2 Objetivos Específicos

A) Embriogênese somática:

- avaliar o efeito de estresse osmótico e adição de ABA na indução da maturação em culturas embriogênicas, e a variação dos níveis endógenos de ácido abscísico (ABA), ácido indol-acético (AIA), perfis de poliaminas (PAs), aminoácidos livres e proteínas;
- avaliar o efeito do estresse hídrico e de reguladores de crescimento, nos níveis endógenos de ácido abscísico (ABA), ácido indol-acético (AIA), perfis de poliaminas (PAs), aminoácidos livres e proteínas, em meios de cultura, visando a indução da germinação de embriões somáticos;
- correlacionar o perfil protéico apresentado pelos embriões somáticos submetidos a diferentes tratamentos, visando a maturação, com o perfil apresentado na embriogênese zigótica.

B) Embriogênese zigótica e germinação:

- determinar os níveis endógenos de AIA, ABA, perfis de PAs e aminoácidos livres ao longo do processo germinativo;
- identificar proteínas diferencialmente expressas por meio da análise proteômica ao longo do processo germinativo;
- identificar proteínas diferencialmente expressas nas diferentes fases da embriogênese zigótica, visando a escolha de marcadores estágio-específicos

CAPITULO 2

**AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS E PROTEÔMICA COMPARATIVA EM CULTURAS
EMBRIOGÊNICAS DE *O. catharinensis* SUBMETIDAS AO ESTRESSE
OSMÓTICO E ADIÇÃO DE ABA VISANDO A MATURAÇÃO.**

2.1 INTRODUÇÃO

A maturação de embriões somáticos é uma etapa crítica para o sucesso de protocolos de embriogênese somática, especialmente em espécies arbóreas. A identificação e caracterização de marcadores moleculares, durante este processo, possibilitará a otimização dos protocolos atualmente existentes (GORBATENCKO e HAKMAN, 2001). Vários estudos têm sido desenvolvidos visando a obtenção de embriões somáticos com maior viabilidade, utilizando baixo potencial osmótico no meio que induz a maturação (ATTREE e FOWKE, 1993). Esta condição mimetiza o efeito do estresse hídrico, que naturalmente ocorre nas sementes, durante os estádios finais da maturação, permitindo que os embriões sobrevivam ao processo de desidratação (BEWLEY e BLACK, 1994).

Diferentes agentes osmóticos, incluindo compostos de baixo (sais inorgânicos, aminoácidos e açúcares) e alto peso molecular (polietileno glicol – PEG), são comumente utilizados para reduzir o potencial osmótico do meio de cultura. Dentre estes compostos, o PEG é o agente osmótico preferido em relação aos agentes plasmolisantes (sacarose, sais, manitol), devido ao seu caráter não-plasmolisante (TAUTORUS et al., 1991; ATTREE e FOWKE, 1993; STASOLLA e YEUNG, 2003). Ressalta-se ainda, que o estresse osmótico induzido pelo PEG, se aproxima mais do estresse hídrico observado em células de embriões zigóticos sujeitas às condições de desidratação (VON ARNOLD et al., 2002). Segundo Faria (2004), a utilização de PEG, no sistema *Inga vera*, permitiu que células submetidas a desidratação temporária fossem capazes de reconstruir a rede de microtúbulos, bem como manter a integridade do DNA, propiciando uma melhor adequação às condições de estresse hídrico.

Dentre os reguladores de crescimento, a adição de ácido abscísico (ABA) ao meio de cultura durante as fases finais do desenvolvimento dos embriões somáticos promove a maturação, e ao mesmo tempo, previne a germinação precoce em diferentes espécies (MAURI e MANZANERA, 2004; GARCIA-MARTIN et al., 2005). O ABA é considerado um pré-requisito no controle da maturação do embrião somático, sendo necessário para o seu desenvolvimento, e o acúmulo de substâncias de reserva nos cotilédones (LABEL e LELU, 2000). A síntese e deposição de proteínas de reserva e proteínas LEA (late abundant embryogenesis) é

frequentemente regulada por ABA e pela expressão de genes induzidos por estresse hídrico (DODEMAN et al., 1997). Vários estudos têm demonstrado que a adição de ABA ao meio de maturação em diferentes concentrações promove o desenvolvimento normal de embriões somáticos, em diferentes espécies vegetais (BERTOSSI et al., 2001; STASOLLA e YEUNG, 2003).

O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações bioquímicas e o perfil proteômico, em embriões somáticos de *O. catharinensis*, submetidos aos tratamentos visando a maturação por meio da adição de ABA e estresse osmótico.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Foram utilizados embriões somáticos de *O. catharinensis* (Figura 1) estabelecidos conforme a metodologia descrita por Moura-Costa et al. (1993) e Viana e Mantell (1999), e mantidos por embriogênese repetitiva. As culturas foram mantidas em condições de sala de cultura com fotoperíodo de 16h, fluxo fotônico de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 26 ± 1 . Foram realizados subcultivos em períodos de 25 dias de cultura.

Figura 1 – Cultura embriogênica (A) e embrião somático maduro de *O. catharinensis* (B). A seta indica um embrião no estágio cotiledonar formado através de embriogênese secundária.

2.2.2 Estresse osmótico e adição de ABA na indução da maturação de embriões somáticos

Os embriões somáticos foram mantidos em meio de cultura WPM (Wood Plant Medium, LLOYD e McCOWN, 1981), suplementado com sacarose (20 g.L⁻¹), sorbitol (22 g.L⁻¹), glutamina (0,4 g.L⁻¹) e phytigel® (2 g.L⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de phytigel. Posteriormente, o material foi autoclavado por 15 minutos, à 121 °C e 1,5 atm.

Visando induzir a maturação das culturas embriogênicas, embriões somáticos foram inoculados nos seguintes tratamentos de maturação: A) controle; B) 100 µM de ABA; C) 9% de PEG; D) 100 µM de ABA + 9% de PEG. As culturas foram iniciadas com a inoculação de embriões somáticos no estágio globular, com matéria fresca (MF) correspondente a 8,5 mg. Após a inoculação, estas foram mantidas em sala de cultura, com fotoperíodo de 16 h, fluxo fotônico de 35 µmol.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 26±1 °C no período de luz, e 25±1 °C no período de escuro.

Foram utilizados cinco tubos de ensaio para cada tratamento. Após quatro semanas de cultura foi determinado o crescimento em MF, em gramas (g), e o número de embriões secundários formados, nos diferentes tratamentos com adição de ABA e PEG. Também foram coletadas amostras para a avaliação do conteúdo de AIA e ABA, perfis de PAs e aminoácidos, e análise proteômica.

2.2.3 Determinações bioquímicas

2.2.3.1 Ácido Abscísico (ABA) e Ácido Indol-acético (AIA)

A metodologia para a determinação de AIA e ABA baseou-se naquela descrita por Silveira et al. (2004a). Amostras (1g de MF) foram maceradas com tampão de extração (etanol 80% + 1% polivinipirrolidona-40), sendo [³H]AIA e [³H]ABA radioativos utilizados como padrão interno para a determinação do rendimento do processo. O extrato foi agitado por 90 min, no escuro a 4°C, e centrifugado a 15.500 g por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi concentrado em "speed vac" a 45 °C, até atingir 20% do volume inicial (≤ 1,0 mL). O volume da amostra foi ajustado para 3 mL (p/v) com água, e o pH foi ajustado para 2,5 com a adição de HCl (1N). As amostras

foram particionadas duas vezes, usando-se éter etílico como solvente orgânico. A fase orgânica, contendo AIA e ABA, foi coletada e seca em "speed vac", a 45 °C. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 200 µL de metanol 100% e transferidas para tubos do tipo eppendorf e armazenadas a -80° C, para análises posteriores em HPLC.

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

2.2.3.2 Aminoácidos

A metodologia para a determinação de aminoácidos baseou-se naquela descrita por Astarita et al. (2003). As amostras (200 mg MF, cada) foram maceradas com 6 mL de etanol 80% (v/v) e concentradas em "speed vac" até eliminação do etanol. Os volumes das amostras foram ajustados para 2 mL com água e centrifugadas a 20.000 g, por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 20 µm e utilizado para determinação dos aminoácidos. Alíquotas de 20 µL do filtrado e 60 µL da solução OPA-borato, utilizadas para a derivatização dos aminoácidos à temperatura ambiente, foram homogeneizadas por 2 min e a seguir analisadas por HPLC.

A identificação e quantificação dos aminoácidos por HPLC foram realizadas utilizando-se uma coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS®).

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

2.2.3.3 Poliaminas (PAs)

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

As PAs livres e conjugadas foram em seguida derivatizadas, misturando-se 40 µL da amostra contendo PAs, 100 µL de cloreto de dansil (5 mg.mL⁻¹ em acetona), 50 µL de solução saturada de carbonato de sódio (NaHCO₃) e 20 µL de 1,7-diaminoheptano (DAH), que foi utilizado como padrão interno. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min, a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 µL

de prolina (100 mg.mL^{-1}) com posterior incubação por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, as PAs derivatizadas foram particionadas com 200 μL de tolueno, e a fase apolar (tolueno), que contém as PAs, foi coletada (175 μL), seca sob jato de nitrogênio, e ressuspensa em 175 μL de acetonitrila.

A identificação e quantificação das PAs foram realizadas utilizando-se HPLC, com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Acetonitrila absoluta e acetonitrila 10% em água (pH 3,5 ajustado com HCl 1N) foram utilizadas como solventes. A mudança na proporção de acetonitrila absoluta em relação a acetonitrila 10% definiu o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65%, durante os primeiros 11 min, de 65 a 100% entre 11 e 25 min, e 100% até 35 min com fluxo de 1 mL.min^{-1} , a 40°C . O detector de fluorescência foi ajustado para excitação em 340 nm e emissão em 510 nm. Foram injetados 20 μL da amostra derivatizada com cloreto de dansil. As áreas e tempos de retenção de cada PA foram avaliados por comparação com as PAs com concentrações conhecidas: putrescina (Put), espermidina (Spd), espermina (Spm) e DAH.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas utilizando-se três repetições.

2.2.4 Análises Proteômicas

2.2.4.1 Extração das proteínas

A metodologia utilizada para a extração foi baseada naquela descrita por Natarajan et al. (2005), utilizando-se o tampão uréia:tiouréia. Três repetições de cada tratamento foram maceradas em presença de nitrogênio líquido, sendo o material pulverizado (500 mg) ressuspensa em 1 mL de tampão de extração. O tampão consistiu de 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 1% de dithiothreitol (DTT), 2% de triton 100, 0,5% de Pharmalyte[®] (GE Healthcare[®]), 1 mM de fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) e 5 μM de pepstatina. O material foi vortexado por 15 min e posteriormente centrifugado por 5 min a 12000 g a 4°C .

Visando a eliminação de interferentes, os extratos protéicos foram precipitados com TCA 10% de acordo com Silveira et al. (2008). Foram adicionados 0,111 mL de TCA 100% (p/v) em 1,0 mL de extrato protéico para atingir a

concentração final de TCA 10% (v/v). Após a incubação por 30 min a 4 °C, a amostra foi centrifugada por 10 min a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado protéico foi lavado três vezes com acetona gelada intercaladas por centrifugações de 5 min a 12.000 g. Em seguida o “pellet” foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de extração uréia: tiouréia e vortexado por 5 min, a 4 °C.

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

2.2.4.2 Determinação de proteínas

A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método do 2D-Quanti Kit (GE-Healthcare[®]) usando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.2.4.3 Eletroforese bidimensional (2-DE)

Alíquotas do extrato protéico contendo 40 µg de proteína foram incorporadas ao tampão de amostra 2-DE (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 2% CHAPS, 0,5% IPG Buffer (pH 4-7), 1% de DTT, 0,002% de azul de bromofenol), tendo-se um volume final de 375 µL. A reidratação e carregamento da amostra na tira de gel IPG (gradiente imobilizado pH) foi realizada com esta solução, com a aplicação sob a tira de gel IPG (SILVEIRA et al., 2008). Foram utilizados IPG de 18 cm com faixa linear de separação de pH 4-7 (GE-Healthcare[®]). Após 12h de reidratação, foi iniciada a focalização isoeétrica (IEF) em uma unidade IPGPhor (GE-Healthcare[®]), em condições de corrida específicas ao IPG utilizado. Antes de iniciar a segunda dimensão, as tiras de gel IPG foram reduzidas com solução de equilíbrio (50mM Tris-HCl, 6M de uréia, 30% de glicerol, 2% de SDS, 0,002% de azul de bromofenol) adicionado de 125mM de DTT e posteriormente alquiladas (125mM de iodoacetamida). Na segunda dimensão, as tiras de gel foram dispostas horizontalmente na extremidade superior do gel de poliacrilamida 12%, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A separação eletroforética foi conduzida com

corrente constante de 25 mA por gel em um sistema vertical Protean II (Bio-Rad®), conectado a um sistema de resfriamento a 15°C em MultitempII (GE-Healthcare®). Foi utilizado um padrão de peso molecular (Bio-Rad®) com 6 bandas de proteína entre 14 e 97 kDa.

As proteínas foram visualizadas pela coloração com prata de acordo com Schevchenko et al. (1996) com modificações. Os géis foram fixados “overnight” em solução de fixação, contendo 50% de metanol, 12% de ácido acético e 0,05% de formaldeído. Após duas lavagens de 30 min em solução de 50% de etanol, os géis foram incubados por 2 min em solução de tiosulfato de sódio (0,02%) e na seqüência foram lavados três vezes em água. Em seguida os géis foram incubados por 20 min em solução 0,2% de nitrato de prata (AgNO_3) e 0,075% de formaldeído e na seqüência foram lavados três vezes em água. A revelação foi realizada com a incubação dos géis em solução 6% de carbonato de sódio (Na_2CO_3), 0,16% de tiosulfato de sódio e 0,05% de formaldeído. Após a visualização dos polipeptídeos (“spots”), a reação de revelação foi interrompida com a incubação dos géis na solução de fixação descrita anteriormente, e armazenados em solução 1% de ácido acético até a análise de imagens.

2.2.4.4 Análise do gel

Os géis foram digitalizados com ImageScanner e analisados no programa Image Master Platinum (GE-Healthcare®). A autenticidade e o contorno de cada “spot” de proteína foram validados por inspeção visual e editados quando necessário. As análises foram realizadas em triplicatas sendo avaliados o número de “spots” e a resolução dos géis. O gel de cada estágio que apresentou maior número de spots foi selecionado como referência na análise comparativa. Foram avaliados o número de “spots” por estágio, a expressão diferencial de proteínas baseada no volume médio dos “spots” e a distribuição diferencial das proteínas de acordo com o peso molecular e ponto isoelétrico.

2.2.5 Análise dos resultados

Os resultados referentes às determinações bioquímicas foram avaliados a partir da média e do seu respectivo desvio padrão (SOKAL e ROHLF, 1995).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Crescimento

O processo de maturação, que promove o desenvolvimento normal dos embriões e a sua conversão em plântulas em várias espécies, está na dependência da presença de ABA, combinado ou não com agentes osmóticos (GAWRONSKA et al., 2000; BERTOSSI et al., 2001; STASOLLA e YEUNG, 2003). No presente trabalho, a suplementação do meio de cultura com PEG 9%, e a combinação PEG 9% + ABA (100 μ M), promoveram uma redução no crescimento e no número de embriões somáticos secundários (Tabela 1), quando comparado com o controle, e com o tratamento contendo ABA (100 μ M) isoladamente. Possivelmente, a redução na osmolaridade do meio promovida pela adição de PEG, combinada com a suplementação de ABA (tratamento ABA+PEG) tenha efeito na redução da taxa de divisão celular e promoção do acúmulo de substâncias de reserva no final do desenvolvimento embrionário. Esta situação sugere que os tratamentos de maturação utilizados neste trabalho podem ter promovido a indução da maturação nos embriões somáticos de *O. catharinensis*. Esta hipótese está de acordo com o observado por diferentes autores ao demonstrar que esta condição induz a uma redução do crescimento e possível maturação dos embriões somáticos (STASOLLA et al., 2002; GARCÍA-MARTIN et al., 2005).

Adicionalmente, foi sugerido que o ABA possa atuar na redução da embriogênese secundária (NUUTILA et al., 1991). No presente trabalho, entretanto, esta redução foi expressiva somente no tratamento com a combinação de ABA + PEG (Tabela 1), sugerindo que esta combinação é essencial para esta resposta quando comparado aos tratamentos isoladamente. Verificou-se ainda que o aspecto morfológico dos embriões somáticos foi similar nos diferentes tratamentos testados.

Tabela 1- Efeito do ABA e PEG no crescimento (mg) e no número de embriões somáticos de *O. catharinensis*, após 4 semanas de cultura. Inóculo inicial = 8,5 mg (média $\pm$ desvio padrão, n=5).

Tratamentos	Crescimento (mg)	Número de embriões
Controle	621 $\pm$ 37	43,3 $\pm$ 10,1
ABA (100 μ M)	707 $\pm$ 38	38,0 $\pm$ 10,5
PEG (9%)	247 $\pm$ 50	17,3 $\pm$ 3,1
PEG (9%) + ABA (100 μ M)	174 $\pm$ 51	15,3 $\pm$ 6,7

2.3.2 Avaliações bioquímicas de AIA, ABA, PAs e aminoácidos livres

Em todos os tratamentos realizados observou-se um incremento no conteúdo endógeno de ABA, onde a combinação de PEG+ABA, resultou no maior acúmulo quando comparado com os demais tratamentos e o controle. Este resultado sugere que a combinação de ABA e do agente osmótico propicie as condições necessárias para a maturação de embriões somáticos em *O. catharinensis*, conforme também sugerido por STASOLLA et al. (2002) para várias coníferas, como *Larix*, *Picea* e *Pinus*. A aplicação exógena de ABA para o desenvolvimento do embrião somático simula a situação observada durante a embriogênese zigótica, onde o ABA é suplementado pelo tecido do megagametófito ou endosperma (STASOLLA et al., 2002).

Nas sementes os níveis de ABA aumentam no final da embriogênese, durante a maturação. Nesta etapa ocorre o acúmulo de substâncias de reserva e a expressão de mRNAs específicos no embrião, alguns deles envolvidos na proteção das células contra a desidratação (INGRAM e BARTELS, 1996; BRAY, 1997). Diferentes estudos indicam que durante a maturação ocorrem dois picos de acúmulo de ABA: um de origem materna e um de origem do embrião (KARSSSEN et al., 1983). O primeiro pico ocorre poucos dias após a polinização e tem como função finalizar a fase de divisão celular do embrião prevenindo a germinação prematura (FINKELSTEIN et al., 2002).

Diferentemente ao observado em relação aos níveis de ABA, o conteúdo endógeno de AIA foi similar nos vários tratamentos de maturação (tabela 2). Os tratamentos utilizados não apresentaram alterações no conteúdo endógeno deste hormônio durante o processo de maturação das culturas embriogênicas de *O.*

catharinensis. Possivelmente este comportamento esteja correlacionado com uma redução na taxa de divisões celulares, observadas freqüentemente durante a etapa de maturação. Apesar de vários trabalhos demonstrarem a importância deste hormônio, no processo de divisão e estabelecimento do eixo bilateral e dos cotilédones nos estádios iniciais de desenvolvimento dos embriões somáticos, poucos são os relatos correlacionando os níveis de AIA com o processo de maturação.

Tabela 2- Efeito do ABA e PEG nos níveis endógenos de AIA e ABA em embriões somáticos de *O. catharinensis*, após 4 semanas de cultura (média $\pm$ desvio padrão, n=3).

Tratamentos	AIA (ng.g ⁻¹ de MF)	ABA (μg.g ⁻¹ de MF)
Controle	210,3 $\pm$ 11,5	0,11 $\pm$ 0,03
ABA (100 μM)	182,2 $\pm$ 26,4	10,8 $\pm$ 2,02
PEG (9%)	193,3 $\pm$ 5,8	0,22 $\pm$ 0,03
PEG (9%) + ABA (100 μM)	184,6 $\pm$ 49,6	65,9 $\pm$ 2,45

No presente trabalho, observou-se que a suplementação ao meio de cultura com PEG+ABA resultou no maior acúmulo de PAs totais (livres + conjugadas) (Figura 3A) e na menor relação Put.(Spd+Spm)⁻¹ (Figura 3B). O maior acúmulo de PAs totais podem estar relacionado com a indução de estresse osmótico promovido pelo PEG. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados em diferentes sistemas vegetais, os quais demonstram que as condições de estresse osmótico, incluindo o estresse salino, podem induzir um aumento no conteúdo endógeno de PAs (BOUCHEREAU et al., 1999; BAIS e RAVISHANKAR, 2002; KUZNETSOV et al., 2006).

Neste trabalho, observou-se que a adição de PEG, isoladamente ou em combinação com ABA, promoveu um aumento nos conteúdos de Spd e Spm livres (Figura 3B) e conjugadas (Figura 3C), quando comparado com o controle e com o tratamento contendo ABA isoladamente. Danin et al. (1993) demonstraram que o início da embriogênese em aipo (*Apium graveolens*) é caracterizada por um alto conteúdo de Put, enquanto um decréscimo de sua síntese, e um aumento no conteúdo de Spd e Spm, são necessários no final do desenvolvimento do embrião e crescimento da plântula.

Durante a embriogênese somática de *Pinus radiata*, a fase de multiplicação das culturas é acompanhada por um alto conteúdo de Put comparado com os de Spd e Spm (SARJALA et al., 1997; MINOCHA et al., 1999). A posterior transferência para o meio de maturação resulta em um aumento do conteúdo de Spd ou Spm em relação ao de Put, alterando a relação $\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}$ na linhagem celular determinada para a embriogênese somática (MINOCHA et al., 1999). Este padrão de variação parece similar ao observado para as culturas embriogênicas de *O. catharinensis* (SANTA-CATARINA, 2005). O tratamento de maturação, PEG+ABA, resultou em uma redução na relação $\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}$ (Figura 3D), semelhante ao apresentado no desenvolvimento de embriões zigóticos desta espécie (SANTA-CATARINA et al. 2006).

Figura 3- Efeito da adição de ABA e PEG ao meio de cultura, nos níveis endógenos ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) de MF) de PAs totais (A), livres (B), conjugadas (C) e na relação de Put/Spd+Spm (D) em embriões somáticos de *O. catharinensis*, após 4 semanas de cultura (média $\pm$ desvio padrão; n=3).

Em todos os tratamentos objetivando a maturação, observou-se um incremento no conteúdo de aminoácidos livres. A suplementação do meio de cultura

com PEG (9%) resultou no maior conteúdo endógeno de aminoácidos livres totais, seguido pelo tratamento com a combinação PEG+ABA (Tabela 3). Diferentes estudos sugerem que durante a maturação ocorre um acúmulo de substâncias de reserva e a síntese de proteínas de reserva e LEA (BEWLEY e BLACK, 1994; BERTOSSI et al., 2001; STASOLLA et al., 2002; STASOLLA e YEUNG, 2003). O acúmulo de aminoácidos induzido pelo agente osmótico PEG pode estar relacionado com a síntese destas proteínas na fase de maturação. As proteínas sintetizadas poderiam ser utilizadas pelos embriões como fonte de nitrogênio durante a germinação (FAIT et al., 2006).

Joy et al. (1997) observaram que, a transferência dos embriões somáticos para o meio de maturação contendo ABA, resultou num aumento na concentração dos aminoácidos ácido glutâmico, glutamina e arginina, enquanto os níveis de alanina decresceram. Em *O. catharinensis*, a suplementação do meio de maturação com ABA isoladamente induziu a síntese de diferentes aminoácidos livres, entretanto, o efeito foi mais intenso ao adicionar o PEG, isoladamente, ou em combinação com ABA (Tabela 3). Dentre os vários aminoácidos, alanina foi observado em maior concentração no tratamento PEG, seguido pelos aminoácidos Gaba, ácido glutâmico, glutamina, serina e arginina (Tabela 3). O Gaba é acumulado em uma grande variedade de tecidos, em diferentes condições de estresse ambiental, tais como, injúria, choque térmico e estresse hídrico (SERRAJ et al., 1998; BOWN et al., 2006). Assim, pode-se supor que os altos níveis de Gaba observados neste trabalho sejam decorrentes de um estresse osmótico, ocasionado pela adição de PEG ao meio de cultura. Destaca-se que o Gaba é um aminoácido não protéico, formado a partir do ácido glutâmico, e que pode funcionar como um armazenador de nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos, como por exemplo, de alanina, sob condições de estresse (SATYA-NARAYAN e NAIR, 1990). O Gaba pode também participar no metabolismo de PAs, sendo sintetizado a partir da Put (HAUSMAN et al., 1997). Assim, os altos conteúdos de alanina observados nas culturas embriogênicas de *O. catharinensis* podem ser decorrentes do alto conteúdo e da disponibilidade de Gaba.

Tabela 3 - Efeito do ABA e PEG nos níveis endógenos de aminoácidos em embriões somáticos de *O. catharinensis*, após 4 semanas de cultura (média $\pm$ desvio padrão; n=3).

Aminoácidos	Tratamentos			
	Controle	ABA (100 μ M)	PEG (9%)	PEG (9%) + ABA (100 μ M)
Ácido aspártico	4,21 $\pm$ 0,04	6,73 $\pm$ 0,99	48,19 $\pm$ 12,98	31,81 $\pm$ 8,48
Ácido glutâmico	54,29 $\pm$ 4,01	94,67 $\pm$ 15,43	346,87 $\pm$ 8,22	308,97 $\pm$ 79,67
Asparagina	2,41 $\pm$ 0,10	4,23 $\pm$ 1,27	38,38 $\pm$ 10,01	28,68 $\pm$ 4,02
Serina	9,58 $\pm$ 0,63	29,39 $\pm$ 4,55	130,99 $\pm$ 16,93	102,10 $\pm$ 23,83
Glutamina	5,99 $\pm$ 0,20	15,94 $\pm$ 3,96	226,14 $\pm$ 25,27	38,85 $\pm$ 8,34
Histidina	5,49 $\pm$ 1,16	14,12 $\pm$ 3,32	49,89 $\pm$ 3,28	18,75 $\pm$ 6,68
Glicina	1,00 $\pm$ 0,29	1,74 $\pm$ 0,57	13,92 $\pm$ 2,83	9,64 $\pm$ 2,63
Arginina	2,62 $\pm$ 0,62	4,62 $\pm$ 0,85	64,82 $\pm$ 10,37	31,71 $\pm$ 7,29
Citrulina	0,51 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,24	4,08 $\pm$ 0,55	1,74 $\pm$ 0,41
Treonina	2,09 $\pm$ 0,11	3,89 $\pm$ 0,52	18,33 $\pm$ 1,19	13,64 $\pm$ 3,53
Alanina	15,54 $\pm$ 2,41	116,16 $\pm$ 11,64	1069,91 $\pm$ 167,32	444,98 $\pm$ 4,65
Gaba	4,73 $\pm$ 1,31	42,04 $\pm$ 5,33	401,89 $\pm$ 7,82	234,21 $\pm$ 130,78
Tirosina	2,20 $\pm$ 0,43	4,05 $\pm$ 0,55	13,87 $\pm$ 3,22	9,97 $\pm$ 1,70
Triptofano	3,13 $\pm$ 0,33	3,50 $\pm$ 0,50	9,12 $\pm$ 2,39	6,38 $\pm$ 1,14
Metionina	2,09 $\pm$ 0,32	2,40 $\pm$ 0,25	6,53 $\pm$ 1,91	3,69 $\pm$ 0,66
Valina	2,66 $\pm$ 0,22	5,24 $\pm$ 0,41	20,20 $\pm$ 4,23	13,04 $\pm$ 3,18
Fenilalanina	6,79 $\pm$ 0,94	7,09 $\pm$ 2,56	19,38 $\pm$ 2,05	16,42 $\pm$ 3,24
Isoleucina	2,47 $\pm$ 0,25	5,93 $\pm$ 2,34	8,77 $\pm$ 1,18	7,37 $\pm$ 1,79
Leucina	2,27 $\pm$ 0,24	5,05 $\pm$ 1,47	11,87 $\pm$ 2,03	9,47 $\pm$ 2,09
Ornitina	1,81 $\pm$ 0,09	0,76 $\pm$ 0,13	1,64 $\pm$ 0,71	1,46 $\pm$ 0,08
Lisina	4,70 $\pm$ 1,05	5,65 $\pm$ 0,29	55,55 $\pm$ 4,24	44,61 $\pm$ 2,18
Total	136,60 $\pm$ 7,4	374,07 $\pm$ 27,3	2560,33 $\pm$ 198,7	1377,49 $\pm$ 287,4

Os aminoácidos ácido glutâmico e glutamina são considerados os principais precursores dos demais aminoácidos (CORUZZI e LAST, 2000). A importância do acúmulo destes aminoácidos, na fase de maturação, pode estar relacionada com a sua utilização como fonte de nitrogênio para a síntese dos demais aminoácidos durante o processo de germinação. Segundo Lai et al. (1992), a glutamina pode ter um papel preponderante ao desempenhado pelo ABA e sacarose no estímulo à síntese de proteínas de reserva.

O aminoácido arginina, além de servir como precursor na síntese de outros aminoácidos (CORUZZI e LAST, 2000), é um dos principais precursores na biossíntese de PAs (BAIS e RAVISHANKAR, 2002; KUZNETSOV et al., 2006), tendo sua síntese aumentada com a suplementação do meio de cultura com PEG, isoladamente ou em combinação com ABA (Tabela 3). Os aminoácidos ornitina e metionina também são aminoácidos importantes na rota de biossíntese de PAs (BOUCHEREAU et al., 1999; KUZNETSOV et al., 2006), e uma maior concentração nos tratamentos PEG e PEG+ABA também foi identificada. Assim, uma possível correlação entre o metabolismo de PAs e aminoácidos, mais especificamente para arginina, ornitina, Gaba e metionina, na síntese e acúmulo destas substâncias devem ser consideradas para a compreensão e otimização do processo de maturação em *O. catharinensis*.

2.3.3 Conteúdo e perfil protéico

Foram observadas pequenas diferenças com relação as concentrações de proteínas totais apresentadas pelo embriões somáticos submetidos aos diferentes tratamentos visando a maturação (Figura 4). Observou-se incremento nas concentrações de proteínas nos tratamentos com adição de PEG isoladamente ou em combinação com ABA. Este incremento provavelmente está relacionado com a resposta ao estresse osmótico, produzido pelo PEG e pela desidratação, induzindo a síntese de proteínas LEA e HSP (“heat shock proteins”).

Figura 4 – Proteínas totais (mg.g⁻¹ MF) nos embriões somáticos submetidos a diferentes tratamentos com adição de ABA e PEG (Média ± desvio padrão; n=3)

Figura 5 – Perfis proteômicos em embriões somáticos submetidos aos tratamentos visando a maturação. A) Controle; B) ABA 100µM; C) PEG 9%; D) ABA 100µM + PEG 9%.

Não foram observadas diferenças nos perfis protéicos dos embriões somáticos submetidos aos diferentes tratamentos utilizando o PEG como agente indutor de estresse osmótico e a adição de ABA (Figura 5). Também foram realizados mapas proteômicos nas faixas de 3-10 e 6-11, não sendo constatada expressão diferencial de proteínas (dados não apresentados).

Campalans et al. (2000), observaram que, em resposta à ação do ABA e do estresse osmótico no embrião maduro, houve a expressão de proteínas

tipo deidrinas e LEA, sendo que este grupo de proteínas têm sido utilizado como marcadores do processo de maturação (GARELLO et al., 2000). Entretanto, tal como o observado em nossos estudos, Moraes (2006) observou apenas 16 spots com expressão diferencial, em seus estudos proteômicos com embriões somáticos de *O. catharinensis*, em diferentes estádios de desenvolvimento.

Analisando-se a distribuição dos spots quanto ao seu peso molecular (Figura 6), observou-se um predomínio de polipeptídeos com peso molecular na faixa de 54,8 a 65,2 kDa. Proteínas relacionadas a manutenção celular como enolase e, relacionadas à respostas a estresses também encontram-se nesta faixa de peso molecular (BONSAGER et al., 2008)

Figura 6 - Distribuição dos spots em classes de peso molecular (kDa). A definição do número de classes foi estabelecida pela fórmula de Sturges (1926).

A adição do PEG ao meio de indução de maturação pode ser fundamental não apenas pela indução de proteínas LEA, mas também por promover a alteração da morfologia das culturas embriogênicas, e o incremento na expressão de genes envolvidos na formação do embrião e controle do meristema apical (STASOLLA et al., 2003).

É importante ressaltar que as sementes com características recalcitrantes, como é o caso de *O. catharinensis*, apresentam alto teor hídrico e metabolismo ativo. Este metabolismo é caracterizado por uma taxa de respiração ininterrupta

durante o estágio quiescente, entre a maturação e a germinação, além de uma contínua síntese de macromoléculas (VASQUEZ-YANES e OROZCO-SEGOVIA, 1993). Assim, pode-se supor que os tratamentos visando a maturação com adição de ABA e estresse osmótico não tenham estimulado uma síntese diferencial de proteínas, como observado no presente trabalho.

*Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o tratamento contendo ABA+PEG resultou em alterações no metabolismo de PAs, aminoácidos e ABA, sendo indicado para a indução da maturação em embriões somáticos, uma vez que estas alterações se assemelham as observadas durante a maturação em embriões zigóticos de *O. catharinensis*.*

CAPITULO 3

AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS E ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA EM EMBRIÕES SOMÁTICOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE HÍDRICO E INDUÇÃO À GERMINAÇÃO

3.1 INTRODUÇÃO

Sistemas de embriogênese somática têm sido desenvolvidos para várias espécies arbóreas (VIANA e MANTELL, 1999; CORREDOIRA et al., 2008; PINTO et al., 2008; RAI et al., 2008). Entretanto, um sério limitante da aplicação prática deste processo, como técnica biotecnológica alternativa para a micropropagação, refere-se a baixa taxa de germinação do embrião somático e sua conversão em plântula (MARTINEZ et al., 2008). Várias alternativas são utilizadas para reduzir esta limitação, como a incorporação de hormônios ao meio de cultura e a desidratação dos embriões somáticos.

A desidratação dos embriões somáticos, em diferentes velocidades, induzindo a condição normalmente existente ao fim do desenvolvimento do embrião zigótico, tem sido utilizada com relativo sucesso para maturação e conversão à plântula (GORBATENKO e HAKMAN, 2001; VAHDATI et al., 2008). Estudos indicam que diferentes graus de estresse hídrico, resultante da desidratação, podem servir como iniciadores de rápidas mudanças bioquímicas possibilitando incremento na regeneração de plantas (CORREDOIRA et al., 2008). A desidratação dos embriões somáticos promove a germinação e melhor vigor às plântulas formadas (VIANA e MANTELL, 1999; VAHDATI et al. 2008).

A emergência da radícula requer tanto a redução da resistência mecânica dos tecidos externos quanto o incremento da força interna para a expansão do embrião. Durante a germinação de *Arabidopsis*, o ácido giberélico (GA) é importante para ativação da expressão de genes envolvidos na indução da divisão celular e modificação e expansão da parede celular, tais como xiloglucano endotransferase/hidrolases, expansinas e pectinas metilesterases (FINKELSTEIN et al., 2008). Sabe-se que um adequado equilíbrio entre os níveis de GA e ABA são fundamentais para a germinação de sementes (DEBEAUJON e KOORNNEEF; 2000).

Um sistema de embriogênese somática de alta frequência foi desenvolvido para *O. catharinensis*, o qual inclui as fases de indução, multiplicação e germinação dos embriões somáticos (VIANA e MANTELL, 1999). Entretanto, um fator limitante é a baixa taxa de conversão de embriões somáticos em plantas (VIANA, 1998). Viana e Mantell (1999) obtiveram taxas de germinação dos embriões somáticos variando

de 30 a 40% após moderada desidratação, por 4 a 6 dias em placas de Petri contendo papel de filtro. Este tratamento provoca uma redução de aproximadamente 25% do peso da matéria fresca dos embriões.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes reguladores de crescimento e do estresse hídrico na germinação e conteúdo endógeno de AIA, ABA e proteínas, e os perfis de PAs e aminoácidos livres em embriões somáticos maduros de *O. catharinensis*. Também foram realizados mapas proteômicos dos embriões somáticos submetidos aos diferentes tratamentos buscando-se polipeptídeos que sirvam como marcadores do processo germinativo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Foram utilizados embriões somáticos maduros, determinados pelo tamanho ($\geq$ a 5 mm) e pela coloração amarelo leitosa, que difere do amarelo translúcido característico dos estádios de desenvolvimento anteriores (globular a cotiledonar inicial), com quatro semanas de cultivo em meio de cultura WPM (Wood Plant Medium, LLOYD e McCOWN, 1981), suplementado com sacarose (20 g.L^{-1}), sorbitol (22 g.L^{-1}), glutamina ($0,4 \text{ g.L}^{-1}$) e phytigel® (2 g.L^{-1}), sendo o pH do meio ajustado para 5,8 antes da adição de phytigel. Posteriormente, o material foi autoclavado por 15 minutos, à 121°C e 1,5 atm.

3.2.2 Desidratação dos embriões somáticos

Estudos de desidratação dos embriões somáticos foram realizados, segundo a metodologia proposta por Viana e Mantell (1999). Assim, para a maturação por meio da desidratação lenta, foram utilizados embriões somáticos maduros com quatro semanas de cultivo. O material foi transferido para placas de Petri (3 cm de diâmetro) contendo papel de filtro, e mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h, fluxo fotônico de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ no

período de luz, e 25 ± 1 °C no período de escuro. Após quatro dias nestas condições, os embriões somáticos foram coletados para análises bioquímicas e proteômica.

3.2.3 Indução da germinação dos embriões somáticos

Para os estudos de germinação foram utilizados embriões somáticos maduros desidratados e não desidratados.

Os embriões somáticos foram transferidos para o meio de cultura B5 (GAMBORG et al., 1968), contendo sacarose (20 g.L^{-1}), carvão ativado (0,15%), phytigel (2 g.L^{-1}) e suplementado com os fitohormônios ácido giberélico (GA_3), ácido naftaleno acético (ANA) e benzilaminopurina (BAP), em diferentes concentrações, resultando nos tratamentos: 1) controle, sem adição de fitohormônios, 2) $4\text{ }\mu\text{M}$ de ANA + $4\text{ }\mu\text{M}$ de GA_3 ; 3) $40\text{ }\mu\text{M}$ de ANA + $40\text{ }\mu\text{M}$ de GA_3 ; 4) $4\text{ }\mu\text{M}$ de BAP + $4\text{ }\mu\text{M}$ de GA_3 ; 5) $40\text{ }\mu\text{M}$ de BAP + $40\text{ }\mu\text{M}$ de GA_3 . O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da adição de fitagel. As culturas foram mantidas em sala de cultura em condições controladas, com fotoperíodo de 16h de luz, fluxo fotônico de $35\text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 26 ± 1 °C no período de luz e 25 ± 1 °C no período de escuro. Após 30 dias de cultivo foi avaliada a taxa de germinação, considerando a protusão da radícula, e foram coletadas amostras para as análises bioquímicas.

3.2.4 Determinações bioquímicas

As determinações bioquímicas de AIA, ABA, PAs e aminoácidos livres foram realizadas de acordo com as metodologias descritas no item 2.4 do capítulo 2.

3.2.5 Análises proteômicas

Os estudos proteômicos foram realizados de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 2.5 do capítulo 2.

3.2.6 Análise dos resultados

Os resultados referentes a determinações bioquímicas foram analisados e apresentados a partir da média e seu respectivo desvio padrão (SOKAL e ROHLF, 1995).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito do estresse hídrico na indução da maturação de culturas embriogênicas

3.3.1.1 Avaliações no conteúdo de AIA, ABA, PAs e aminoácidos livres

Tratamentos com emprego da desidratação visando a maturação de culturas embriogênicas, são utilizados para vários sistemas vegetais, e podem ser uma alternativa à aplicação de ABA. A exposição prolongada ao ABA pode reduzir a frequência de germinação, devido ao papel do ABA na prevenção da degradação de substâncias de reserva e prevenção da germinação precoce (GUTMANN et al., 1996; GARCIARRUBIO et al., 1997).

O efeito promotor da desidratação no processo germinativo em embriões somáticos de *O. catharinensis* foi demonstrado por VIANA (1998). De acordo com a autora, a desidratação lenta por quatro a seis dias em placa de Petri, contendo uma camada de papel filtro, foi importante para promover a germinação, sendo observada uma taxa de 30 a 40%, superior ao tratamento sem desidratação (5%).

No presente trabalho, o tratamento de desidratação promoveu aumento nos níveis de ABA endógeno e redução nos níveis de AIA nos embriões somáticos, em relação ao controle (Tabela 1). Estes resultados são semelhantes aos observados durante a fase de maturação de embriões zigóticos de *O. catharinensis* (SANTA-CATARINA et al., 2006), sugerindo que este efeito de estresse hídrico pode ser importante para a maturação dos embriões somáticos desta espécie. Estudos demonstram que o papel do ABA no processo de maturação refere-se a tolerância à

desidratação pela indução da síntese de proteínas LEA (GARCIARRUBIO et al., 1997).

Tabela 1- Efeito do estresse hídrico nos níveis endógenos de AIA e ABA em embriões somáticos maduros de *O. catharinensis* (média $\pm$ desvio padrão, n=3).

Tratamentos	AIA	ABA
	(ng.g ⁻¹ de MF)	(μg.g ⁻¹ de MF)
Controle	559,1 $\pm$ 63,5	0,43 $\pm$ 0,21
Desidratado	354,1 $\pm$ 20,0	1,65 $\pm$ 0,10

Com relação ao conteúdo e perfil de PAs, pode-se verificar que o conteúdo de PAs totais é similar nos embriões desidratados e não desidratados (Figura 1A). Entretanto, a relação de PAs Put.(Spd+Spm)⁻¹ foi menor nos embriões desidratados (Figura 1B), devido a uma redução nos níveis de Put, e aumento de Spm (Figura 1C). Este resultado demonstra que a desidratação promove uma alteração no padrão endógeno de PAs nos embriões somáticos, e que pode ser um importante fator para a maturação dos embriões. O maior valor da relação de PAs, observada em embriões não desidratados, está relacionada com os maiores níveis de Put livre em relação aos de Spd e Spm (Figura 1C). Embriões desidratados apresentaram um aumento do conteúdo endógeno de Spd e Spm em relação ao de Put. Resultados semelhantes foram verificados nos diferentes tratamentos com a adição dos promotores de maturação ABA e PEG, os quais proporcionaram um menor valor da razão comparado com o controle como resultado de um incremento nos níveis de Spd e Spm. Estudos têm demonstrado que sob condições de estresse osmótico é observada uma menor relação Put.(Spd + Spm)⁻¹, possivelmente em decorrência do envolvimento das PAs Spd e Spm na estabilidade das membranas, bem como na homeostase celular (GROPPA e BENAVIDES, 2008).

Os resultados obtidos indicam que durante os processos de maturação e desidratação dos embriões somáticos, a participação das PAs é efetiva, e evidenciada por alterações nos seus perfis. É interessante observar a correlação entre a redução nos níveis de AIA e Put nos tratamentos estudados, uma vez que ambos estão envolvidos em tecidos com alta atividade mitótica. O processo de maturação também é caracterizado pela expansão celular (WEIGETH et al., 2008),

no qual as células em alongamento apresentam uma menor relação $\text{Put.}(\text{Spd}+\text{Spm})^{-1}$, ocasionada um por incremento nos níveis de Spd e Spm (KAKKAR et al., 2000).

Figura 1 - Efeito da desidratação no conteúdo endógeno ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF) de PAs em embriões somáticos maduros de *O. catharinensis*. A) PAs totais; B) relação de PAs ($\text{Put.}(\text{Spd}+\text{Spm})^{-1}$); C) PAs livres; D) PAs conjugadas (média $\pm$ desvio padrão, $n=3$).

Com relação aos aminoácidos livres, verificou-se que a desidratação dos embriões somáticos maduros resultou num decréscimo nos níveis endógenos de aminoácidos totais, sendo observada uma elevação apenas para asparagina e histidina (Tabela 2). A asparagina pode atuar de maneira semelhante a prolina em relação à resposta ao estresse hídrico, com incremento em suas concentrações sob esta condição (LEA et al., 2007). Adicionalmente, estudos com soja sugerem que os conteúdos de asparagina durante o desenvolvimento dos cotilédones podem ser determinantes para a biossíntese de proteínas de reserva (HERNÁNDEZ-SEBASTIA et al., 2005).

Tabela 2 - Efeito da desidratação, durante 4 dias, no conteúdo de aminoácidos livres totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF) em embriões somáticos maduros de *O. catharinensis* (média $\pm$ desvio padrão, n=3).

Aminoácido	Embriões somáticos maduros	
	Não desidratado	Desidratado
Ácido aspártico	10,09 $\pm$ 1,48	6,16 $\pm$ 1,44
Ácido glutâmico	65,87 $\pm$ 16,03	25,91 $\pm$ 7,53
Asparagina	4,02 $\pm$ 1,58	21,34 $\pm$ 1,79
Serina	24,58 $\pm$ 4,84	4,34 $\pm$ 1,16
Glutamina	49,97 $\pm$ 1,87	3,74 $\pm$ 0,88
Histidina	9,74 $\pm$ 2,21	15,65 $\pm$ 2,80
Glicina	2,99 $\pm$ 0,54	0,44 $\pm$ 0,07
Arginina	12,21 $\pm$ 1,84	2,34 $\pm$ 0,75
Citrulina	2,96 $\pm$ 0,50	0,34 $\pm$ 0,10
Treonina	3,96 $\pm$ 0,89	2,66 $\pm$ 0,44
Alanina	193,06 $\pm$ 9,84	3,17 $\pm$ 0,97
Gaba	36,28 $\pm$ 6,49	1,93 $\pm$ 0,15
Tirosina	8,87 $\pm$ 1,51	1,60 $\pm$ 0,58
Triptofano	6,88 $\pm$ 0,82	1,02 $\pm$ 0,29
Metionina	6,11 $\pm$ 0,87	1,28 $\pm$ 0,41
Valina	8,32 $\pm$ 1,71	3,36 $\pm$ 1,26
Fenilalanina	10,74 $\pm$ 2,43	4,40 $\pm$ 1,92
Isoleucina	3,42 $\pm$ 0,75	4,15 $\pm$ 1,54
Leucina	5,48 $\pm$ 1,29	5,03 $\pm$ 0,57
Ornitina	1,09 $\pm$ 0,40	0,97 $\pm$ 0,09
Lisina	14,08 $\pm$ 3,39	6,03 $\pm$ 2,54
Total	480,71 $\pm$ 34,39	115,86 $\pm$ 19,25

Normalmente o período de desidratação é associado ao incremento significativo nos níveis de vários aminoácidos livres, bem como em um número de ácidos orgânicos e açúcares (FAIT et al., 2006). Este comportamento foi observada nos tratamentos de maturação com a adição de ABA e PEG aos meios de cultura de embriões somáticos de *O. catharinensis* (capítulo 2). Entretanto, quando utilizada a desidratação nos embriões somáticos, observou-se uma redução nos níveis de aminoácidos livres acompanhado de aumento na concentração de proteínas totais (Figura 2). Pode-se sugerir que estes aminoácidos foram alocados para a síntese de proteínas relacionadas às respostas ao estresse, associado com a síntese de proteínas de reserva. Deve-se considerar também que, a desidratação lenta dos

embriões somáticos, em placas de Petri, pode causar não apenas o estresse hídrico, mas também o estresse nutricional (VON ADERKAS e BONGA, 2000² apud CORREDOIRA et al., 2008). Esta situação promoveria uma alocação dos aminoácidos livres como intermediários metabólicos para a síntese de energia, levando a redução nos níveis.

Vários modelos de estudo do metabolismo de sementes sugerem que o processo de desidratação favorece: a redução da relação C/N; o acúmulo de proteínas de reserva; a produção de metabólitos secundários derivados do ácido chiquímico associados com a defesa e a biossíntese de AIA, sendo estes fatores, essenciais para a germinação (FAIT et al., 2006).

3.3.1.2 Conteúdo e perfil protéico

As proteínas estão entre as principais substâncias de reserva acumuladas durante o desenvolvimento embrionário (BEWLEY e BLACK, 1994). Na embriogênese zigótica, o aumento no conteúdo ocorre como resultado da síntese de proteínas de reserva e proteínas LEA. Estas proteínas têm grande afinidade com as moléculas de água, atuando na proteção à desidratação da semente (BEWLEY e BLACK, 1994). Em girassol (*Helianthus annuus*), as deidrinas e outros dois grupos de LEA, além de outras proteínas de baixo peso molecular, foram identificadas durante a dormência dos embriões (GARELLO et al., 2000). Campalans et al. (2000) estudando os eventos moleculares envolvidos na aquisição de tolerância à desidratação, observou a indução de novos polipeptídeos durante a desidratação de embriões de *Prunus amygdalus*. A eficiência da mobilização de reservas durante a germinação e posterior estabelecimento da plântula, aparentemente é dependente do acúmulo de reservas durante a maturação (FAIT et al., 2006), evidenciando as condições ideais de maturação como fator essencial para o sucesso do processo de propagação via embriogênese somática.

O conteúdo de proteínas totais nos embriões somáticos submetidos ou não a desidratação encontram-se na figura 2. Observou-se incremento nas concentrações de proteínas no tratamento com desidratação por quatro dias. Este incremento

² VON ADERKAS, P.; BONGA, J.M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiol.**, v. 20, p. 921-928; 2000.

provavelmente está relacionado com a resposta ao estresse hídrico, produzido pela desidratação, induzindo a síntese de proteínas LEA e HSP.

Figura 2 – Proteínas totais (mg.g⁻¹ MF) nos embriões somáticos maduros de *O. catharinensis* no tratamentos controle e desidratados (média ± desvio padrão, n=3)

Com relação aos perfis protéicos, não foram observadas diferenças nos embriões somáticos submetidos ou não ao estresse hídrico (Figura 3). Também foram realizados mapas proteômicos nas faixas de 3-10 e 6-11, não sendo constatada expressão diferencial (dados não apresentados). Esta similaridade nos padrões e perfis sugere que não houve uma síntese diferencial de proteínas durante o estresse hídrico estimulado pela desidratação dos embriões somáticos de *O. catharinensis*.

Figura 3 – Perfis proteômicos apresentados por embriões somáticos maduros de *O. catharinensis* (A) e submetidos a 4 dias de desidratação (B).

Uma das limitações da proteômica refere-se a inexistência de uma tecnologia semelhante a PCR (“polymerase chain reaction”) que permita a amplificação de proteínas expressas em baixa abundância, tais como fatores de transcrição e proteínas de sinalização (ZIVY e VIENNE, 2000). Possivelmente, proteínas induzidas pelos diferentes tratamentos visando a maturação foram expressas em níveis muito baixos, não tendo sido detectadas pela 2-DE.

Os resultados sugerem que o tratamento com desidratação por quatro dias possibilita ao embrião somático características bioquímicas observadas na maturação de embriões zigóticos, tais como uma baixa relação $\text{Put. (Spd + Spm)}^{-1}$, incremento nos níveis de ABA e maiores conteúdos de asparagina, que em conjunto podem sugerir uma indução da maturação destes embriões. Entretanto, o estresse hídrico não afetou o conteúdo de proteínas e perfil protéico nestes embriões somáticos.

3.3.2 Indução da germinação em embriões somáticos

Não foi observada a emissão da radícula ou desenvolvimento da parte aérea em nenhum dos tratamentos de germinação utilizados. Uma das possíveis causas seria o fato de que os embriões somáticos não se encontravam no mesmo estágio de desenvolvimento tal qual o apresentado nos estudos realizados por Viana e Mantell (1999), onde observou-se uma taxa de germinação de 40% quando submetidos a desidratação e inoculados em meio de cultura B5 (GAMBORG et al., 1968). Alguns trabalhos sugerem que o emprego da encapsulação dos embriões somáticos, antes da indução da maturação, permite uma melhor qualidade do embrião e maior taxa de germinação, pela redução na intensidade dos estresses (UTOMO et al., 2008).

Observou-se um enverdecimento em alguns embriões quando de sua inoculação nos tratamentos para germinação. Segundo Moon e Hildebrand (2003) há uma correlação inversa entre a coloração verde e a eficiência de germinação, uma vez que embriões que apresentem altos níveis de clorofila, não apresentaram um ajuste fisiológico adequado durante a maturação. Por outro lado, é descrito que o aspecto branco/opaco dos embriões, muitas vezes está associado à maturação, enquanto embriões translúcidos podem refletir um baixo acúmulo de proteínas de reserva e amido, e conseqüentemente, não são considerados maduros (VAHDATI et al., 2008).

3.3.2.1 Padrão de variação de AIA, ABA, PAs e aminoácidos livres

Em todos os tratamentos de germinação testados, verificou-se que os embriões somáticos não desidratados apresentaram valores menores para a relação $\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}$ quando comparado com os embriões desidratados (Figura 4B). Nos embriões não desidratados, e nos tratamentos contendo ANA (tratamentos 2 e 3) ocorreram maiores relações de PAs, quando comparado com os tratamentos suplementados com BAP (tratamentos 4 e 5) e o controle. Verificou-se que o ANA pode estar relacionada com um aumento no conteúdo endógeno de PAs, especialmente de Put, enquanto a citocinina BAP estaria envolvida num decréscimo de Put e acréscimo de Spd e/ou Spm (Figura 4C).

O maior valor da razão de PAs observada em embriões não desidratados inoculados em todos os tratamentos de germinação está relacionada com os maiores níveis de Put livre em relação aos de Spd e Spm (Figura 4C). Embriões desidratados apresentaram um aumento do conteúdo endógeno de Spd e Spm em relação ao de Put (Figura 4D). Resultados semelhantes foram verificados nos embriões somáticos de *O. catharinensis* submetidos a diferentes tratamentos de maturação, onde a adição dos promotores ABA e PEG proporcionaram um menor valor da razão comparado com o controle, resultado de um decréscimo nos níveis de Put e incremento nos níveis de Spm (resultados apresentados no capítulo 2). Glória et al. (2005) verificaram que um aumento significativo de PAs no momento da protusão da radícula durante a germinação de sementes de *Glycine max* está relacionado com o aumento na multiplicação e crescimento celular neste período. Os resultados obtidos indicam que durante os processos de maturação e desidratação dos embriões somáticos, os quais antecedem a germinação, seja necessário uma alteração no perfil de PAs.

Nos estudos realizados durante o processo germinativo em embriões zigóticos de *O. catharinensis* verificou-se uma alteração no padrão endógeno de PAs, ocorrendo um aumento no conteúdo de Put nos primeiros 15 dias, seguido por um decréscimo até o final da germinação (60 dias), e os níveis de Spd e Spm decresceram durante todo o período (DIAS et al., 2009).

No presente trabalho, sugere-se que novos tratamentos de germinação, combinando concentrações de auxinas e poliaminas, e/ou pulso de ANA no início do processo, possam ser realizados com o objetivo de verificar uma alteração no perfil de PAs semelhante ao observado durante a germinação de embriões zigóticos (DIAS et al., 2009).

Figura 4- Efeito dos diferentes tratamentos de germinação no conteúdo endógeno de PAs em embriões somáticos maduros de *O. catharinensis* desidratados e controle, após 30 dias de cultivo. A) PAs totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF); B) relação de PAs ($\text{Put.}(\text{Spd}+\text{Spm})^{-1}$); C) PAs livres ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF) em embriões somáticos não desidratados; D) PAs livres ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF) em embriões somáticos desidratados (média $\pm$ desvio padrão, $n=3$). Tratamentos: 1) controle, 2) 4 μM de ANA + 4 μM de GA_3 ; 3) 40 μM de ANA + 40 μM de GA_3 ; 4) 4 μM de BAP + 4 μM de GA_3 ; 5) 40 μM de BAP + 40 μM de GA_3

Os aminoácidos regulam a síntese de vários compostos, como proteínas, e por sua vez, alterações nos níveis de proteínas durante a embriogênese refletem um efetivo controle genético quanto ao metabolismo do nitrogênio, determinando forma de crescimento, volume e massa seca da semente (DURZAN e CHALUPA; 1976; SHEWRY et al., 1995). Durante as fases de maturação e desidratação, usualmente, ocorre um aumento no conteúdo de proteínas de reserva e LEAs (FAIT et al., 2006), as quais estão relacionadas com a tolerância a desidratação. Os aminoácidos são essenciais no processo germinativo, uma vez que são transportadores e doadores

de nitrogênio para a biossíntese de um grande número de compostos essenciais durante este processo (RADWANSKI e LAST, 1995; VON WETTSTEIN et al., 1995).

Ao inocular os embriões somáticos desidratados no meio de cultura com diferentes tratamentos visando a germinação verificou-se, após 30 dias de cultivo um aumento no conteúdo de aminoácidos livres totais, especialmente no controle e nos tratamentos 2 e 5 (Figura 5). Pode-se observar um possível efeito de baixas concentrações de ANA (tratamento 2) e altas concentrações de BAP (tratamento 5) no acúmulo de aminoácidos nestes embriões somáticos desidratados. Entretanto, embriões somáticos não desidratados apresentaram um decréscimo nos valores de aminoácidos livres totais em todos os tratamentos de germinação testados, após 30 dias de cultivo (Figura 5). Estudos realizados durante a maturação de embriões somáticos de *O. catharinensis* demonstraram um aumento no conteúdo endógeno de aminoácidos livres totais no tratamento que promoveu a maturação, contendo ABA e PEG, sugerindo que os processos de maturação e desidratação requerem um acúmulo de aminoácidos totais.

Figura 5- Efeito dos diferentes tratamentos de germinação no conteúdo endógeno de aminoácidos livres ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF) em embriões somáticos maduros de *O. catharinensis* não desidratados e desidratados, após 30 dias de cultivo. Tratamentos: 1) controle, 2) 4 μM de ANA + 4 μM de GA_3 ; 3) 40 μM de ANA + 40 μM de GA_3 ; 4) 4 μM de BAP + 4 μM de GA_3 ; 5) 40 μM de BAP + 40 μM de GA_3 (média $\pm$ desvio padrão, $n=3$).

Dentre os aminoácidos analisados, verificou-se que embriões somáticos desidratados, inoculados nos diferentes tratamentos objetivando a germinação,

apresentaram maiores valores para os aminoácidos, ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, serina, glutamina e Gaba (Tabela 3), independentemente do tratamento de germinação, quando comparado com os embriões não desidratados (Tabela 4). Durante a germinação de embriões zigóticos de *O. catharinensis*, o ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glutamina também foram encontrados em maior concentração que os demais aminoácidos, apresentando valores maiores na semente madura e no final da germinação (DIAS et al., 2009). Segundo FAIT et al., (2006), é observado um incremento nos níveis de asparagina durante a fase de embebição no processo germinativo de sementes de *Arabidopsis*. Adicionalmente, aminoácidos não protéicos, como ornitina, Gaba e taurina, são armazenados nas sementes e são fundamentais por serem intermediários na biossíntese de aminoácidos protéicos (RODRIGUEZ et al., 2008).

Tabela 3- Efeito dos diferentes tratamentos de germinação no conteúdo de aminoácidos livres totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF) em embriões somáticos maduros desidratados de *O. catharinensis* após 30 dias de cultivo (Média $\pm$ desvio padrão, n=3).

Aminoácidos	Tratamentos de germinação				
	1 controle	2 4 μM de ANA + 4 μM de GA_3	3 40 μM de ANA + 40 μM de GA_3	4 4 μM de BAP + 4 μM de GA_3	5 40 μM de BAP + 40 μM de GA_3
Ácido aspártico	44,25 $\pm$ 12,84	74,62 $\pm$ 10,51	19,61 $\pm$ 0,76	15,88 $\pm$ 1,09	56,00 $\pm$ 9,60
Ácido glutâmico	74,85 $\pm$ 12,41	87,51 $\pm$ 4,08	28,81 $\pm$ 1,34	19,27 $\pm$ 1,20	87,43 $\pm$ 15,01
Asparagina	710,52 $\pm$ 95,07	1770,29 $\pm$ 235,14	227,76 $\pm$ 31,17	284,78 $\pm$ 21,92	1319,31 $\pm$ 324,47
Serina	59,75 $\pm$ 19,94	16,45 $\pm$ 1,80	8,84 $\pm$ 2,00	9,05 $\pm$ 1,92	15,91 $\pm$ 1,82
Glutamina	72,46 $\pm$ 14,88	15,17 $\pm$ 2,24	6,01 $\pm$ 1,57	4,07 $\pm$ 0,65	18,40 $\pm$ 3,01
Histidina	10,87 $\pm$ 3,47	18,99 $\pm$ 0,61	1,73 $\pm$ 0,55	3,31 $\pm$ 0,22	12,00 $\pm$ 6,01
Glicina	8,95 $\pm$ 1,75	3,77 $\pm$ 1,15	2,71 $\pm$ 0,76	2,86 $\pm$ 0,30	4,24 $\pm$ 0,73
Arginina	13,95 $\pm$ 2,83	6,02 $\pm$ 0,08	2,71 $\pm$ 0,42	1,32 $\pm$ 0,46	2,09 $\pm$ 0,28
Treonina	8,92 $\pm$ 1,14	8,22 $\pm$ 0,81	3,76 $\pm$ 0,34	2,13 $\pm$ 0,21	12,63 $\pm$ 0,51
Alanina	29,48 $\pm$ 5,66	6,60 $\pm$ 0,12	4,58 $\pm$ 0,91	3,22 $\pm$ 0,30	13,30 $\pm$ 0,81
Gaba	43,54 $\pm$ 1,52	145,00 $\pm$ 6,56	36,53 $\pm$ 0,98	10,51 $\pm$ 3,32	75,60 $\pm$ 9,32
Tirosina	5,17 $\pm$ 1,82	5,17 $\pm$ 0,49	0,93 $\pm$ 0,29	0,80 $\pm$ 0,21	2,29 $\pm$ 0,28
Triptofano	3,25 $\pm$ 0,82	3,25 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,21	0,70 $\pm$ 0,30	2,40 $\pm$ 0,57
Metionina	1,97 $\pm$ 0,05	1,97 $\pm$ 0,26	2,24 $\pm$ 0,46	2,20 $\pm$ 0,37	2,50 $\pm$ 0,55
Valina	7,32 $\pm$ 2,57	7,32 $\pm$ 0,51	0,94 $\pm$ 0,18	0,81 $\pm$ 0,35	2,92 $\pm$ 0,27
Fenilalanina	8,29 $\pm$ 5,79	8,29 $\pm$ 0,19	1,15 $\pm$ 0,38	0,71 $\pm$ 0,10	2,99 $\pm$ 0,14
Isoleucina	4,59 $\pm$ 0,49	4,59 $\pm$ 0,20	0,47 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,16	1,96 $\pm$ 0,31
Leucina	29,20 $\pm$ 6,70	29,20 $\pm$ 19,34	8,39 $\pm$ 0,22	11,35 $\pm$ 0,09	94,63 $\pm$ 28,08
Ornitina	1,61 $\pm$ 0,05	2,42 $\pm$ 0,33	3,42 $\pm$ 1,14	1,61 $\pm$ 3,10	3,50 $\pm$ 0,45
Lisina	5,00 $\pm$ 2,19	7,65 $\pm$ 1,84	3,12 $\pm$ 1,22	2,07 $\pm$ 0,08	2,94 $\pm$ 0,84
Total	1145,31 $\pm$ 91,56	2224,60 $\pm$ 212,05	364,34 $\pm$ 33,59	377,18$\pm$18,80	1733,80$\pm$355,96

Tabela 4- Efeito dos diferentes tratamentos de germinação no conteúdo de aminoácidos livres totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de MF) em embriões somáticos maduros não desidratados (controle) de *O. catharinensis*, após 30 dias de cultivo (Média $\pm$ desvio padrão, n=3).

Aminoácidos	Tratamentos de germinação				
	1 controle	2 4 μM de ANA + 4 μM de GA ₃	3 40 μM de ANA + 40 μM de GA ₃	4 4 μM de BAP + 4 μM de GA ₃	5 40 μM de BAP + 40 μM de GA ₃
Ácido aspártico	3,32 $\pm$ 0,17	2,81 $\pm$ 1,04	1,36 $\pm$ 0,20	3,93 $\pm$ 2,10	65,06 $\pm$ 17,70
Ácido glutâmico	4,77 $\pm$ 1,77	18,64 $\pm$ 5,52	7,67 $\pm$ 1,44	11,79 $\pm$ 13,08	6,36 $\pm$ 2,71
Asparagina	4,42 $\pm$ 0,44	17,84 $\pm$ 3,55	8,45 $\pm$ 0,70	39,15 $\pm$ 9,55	3,41 $\pm$ 0,69
Serina	3,82 $\pm$ 0,64	6,99 $\pm$ 2,17	4,02 $\pm$ 0,64	4,36 $\pm$ 0,24	3,77 $\pm$ 0,82
Glutamina	5,25 $\pm$ 1,46	16,97 $\pm$ 6,18	7,53 $\pm$ 1,29	5,72 $\pm$ 1,12	1,64 $\pm$ 0,22
Histidina	1,10 $\pm$ 0,06	3,20 $\pm$ 0,40	1,96 $\pm$ 0,39	2,21 $\pm$ 0,73	0,79 $\pm$ 0,02
Glicina	2,36 $\pm$ 0,27	2,94 $\pm$ 0,38	3,36 $\pm$ 0,40	2,56 $\pm$ 0,35	2,86 $\pm$ 0,63
Arginina	2,16 $\pm$ 0,17	4,62 $\pm$ 0,95	2,74 $\pm$ 0,14	1,70 $\pm$ 0,36	2,39 $\pm$ 0,36
Treonina	0,69 $\pm$ 0,26	1,40 $\pm$ 0,15	1,04 $\pm$ 0,13	3,02 $\pm$ 0,39	0,85 $\pm$ 0,17
Alanina	4,60 $\pm$ 2,12	11,00 $\pm$ 1,20	4,39 $\pm$ 0,55	4,55 $\pm$ 0,79	4,08 $\pm$ 1,48
Gaba	8,75 $\pm$ 0,73	49,29 $\pm$ 6,42	21,82 $\pm$ 2,15	16,63 $\pm$ 4,24	15,48 $\pm$ 7,57
Tirosina	0,57 $\pm$ 0,13	1,37 $\pm$ 0,38	0,98 $\pm$ 0,15	0,72 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,06
Triptofano	0,32 $\pm$ 0,11	0,46 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,10	0,28 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,03
Metionina	2,13 $\pm$ 0,12	2,66 $\pm$ 0,02	3,40 $\pm$ 0,04	1,89 $\pm$ 0,14	3,11 $\pm$ 0,55
Valina	0,92 $\pm$ 0,18	1,36 $\pm$ 0,03	1,41 $\pm$ 0,24	1,09 $\pm$ 0,19	1,06 $\pm$ 0,21
Fenilalanina	0,43 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,13	0,78 $\pm$ 0,15	0,93 $\pm$ 0,32	0,52 $\pm$ 0,07
Isoleucina	0,61 $\pm$ 0,16	0,74 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,08	0,75 $\pm$ 0,13	0,59 $\pm$ 0,06
Leucina	0,56 $\pm$ 0,18	6,07 $\pm$ 1,95	1,35 $\pm$ 0,07	4,58 $\pm$ 0,90	0,89 $\pm$ 0,20
Ornitina	2,87 $\pm$ 0,63	1,57 $\pm$ 0,10	2,36 $\pm$ 0,40	1,75 $\pm$ 0,02	1,89 $\pm$ 0,13
Lisina	4,31 $\pm$ 0,76	5,13 $\pm$ 0,92	4,11 $\pm$ 1,24	2,77 $\pm$ 0,40	2,48 $\pm$ 0,20
Total	54,00 $\pm$ 5,16	156,62 $\pm$ 23,44	80,57 $\pm$ 4,64	110,79 $\pm$ 7,78	118,97 $\pm$ 17,66

Para os tratamentos visando a germinação nos quais houve desidratação por 4 dias em placa de Petri, observou-se um expressivo incremento nos níveis de AIA e ABA, com exceção do tratamento 5, onde as concentrações de AIA foram semelhantes independente da desidratação (Figura 6). É importante ressaltar que apesar do incremento nos níveis de AIA e ABA, em parte se dever ao menor teor hídrico dos embriões somáticos, observa-se que os incrementos foram na ordem de 10 vezes superiores ao observado nos embriões sem desidratação, confirmando a influência da desidratação no acréscimo dos níveis.

Figura 6 – Efeito dos diferentes tratamentos visando a germinação, sobre o conteúdo endógeno de AIA e ABA, com desidratação prévia por 4 dias (A e B) e sem desidratação (C e D). Tratamentos: 1) controle, 2) 4 μM de ANA + 4 μM de GA₃; 3) 40 μM de ANA + 40 μM de GA₃; 4) 4 μM de BAP + 4 μM de GA₃; 5) 40 μM de BAP + 40 μM de GA₃ (média ± desvio padrão, n=3).

Com relação aos níveis de ABA observa-se que o conteúdo nos diferentes tratamentos foi semelhante, tanto para os embriões somáticos desidratados quanto para aqueles que não sofreram desidratação (Figura 6B e D). Esta situação sugere que os diferentes tratamentos utilizados para a germinação não afetaram o padrão no conteúdo deste hormônio nos embriões somáticos de *O. catharinensis*.

O incremento nos níveis de AIA é esperado em embriões ao longo do processo de germinação, uma vez que se tem a reativação das divisões celulares (HOLDSWORTH et al., 2008). O tratamento 3, nos quais há combinação de ANA e GA₃ nas maiores concentrações, associado à desidratação, apresentou os maiores níveis endógenos de AIA (Figura 6C) comparado aos demais tratamentos. Por outro lado, o tratamento 5 apresentou níveis semelhantes de AIA, independente do tratamento de desidratação.

O resultado observado no tratamento 3 sugere que a combinação dos hormônios ANA e GA₃, e a desidratação induzem um incremento no conteúdo endógeno de AIA. Estudos mostram que o uso de fitormônios, como GA, é importante para promover a conversão de embriões por acelerar a hidrólise de amido, estimulando a atividade de α -amilase (KEPCZYNSKA e ZIELINSKA; 2006), enquanto a desidratação é importante para a germinação de embriões somáticos por estar relacionado com a quebra de proteínas de reserva (GRIGA et al., 2007).

É interessante observar que o tratamento envolvendo desidratação promoveu características associadas a maturação dos embriões somáticos, tais como, a diminuição da relação Put. (Spd + Spm)⁻¹, o incremento nos níveis de ABA e de asparagina, tal como pode ser observado anteriormente no capítulo 2. O aumento no conteúdo de ABA apresentado pelos embriões somáticos de *O. catharinensis*, em decorrência da desidratação, pode ter um forte efeito inibitório na germinação, impedindo a conversão de plântulas como observado também por Ara et al. (2000).

3.3.2.3 Estudos proteômicos

Uma melhor compreensão dos fatores associados a embriogênese em plantas também pode ser obtida na interface entre os modelos de embriogênese somática e zigótica (SILVEIRA et al., 2008). Neste sentido, estudos com os modelos *in vivo* durante o desenvolvimento da embriogênese zigótica permitem uma inferência sobre os resultados esperados no modelo *in vitro*, que possibilitem a longo prazo aperfeiçoar o sistema de embriogênese somática em plantas. Dentre vários compostos, a análise proteômica comparativa tem sido estudada, visando identificar proteínas marcadoras deste processo.

Não foram observadas diferenças na concentração de proteínas apresentadas pelos embriões somáticos submetidos a diferentes tratamentos visando a germinação (Figura 7), bem como nos perfis proteômicos dos embriões somáticos (Figura 8). Os tratamentos com desidratação apresentaram o mesmo comportamento dos tratamentos sem desidratação, não sendo observada a expressão diferencial de proteína.

Possivelmente as concentrações e condições testadas não foram suficientes para promover alterações significativas no perfil de proteínas. Um outro fator seria

uma possível diminuição da sensibilidade dos embriões somáticos pelo avançado tempo de cultivo *in vitro*.

Figura 7 – Proteínas totais (mg.g⁻¹ MF) nos embriões somáticos de *O. catharinensis* submetidos a diferentes tratamentos visando a germinação. Tratamentos: 1) controle, 2) 4 µM de ANA + 4 µM de GA₃; 3) 40 µM de ANA + 40 µM de GA₃; 4) 4 µM de BAP + 4 µM de GA₃; 5) 40 µM de BAP + 40 µM de GA₃ (média ± desvio padrão, n=3).

Figura 8 – Mapas proteômicos obtidos de embriões somáticos submetidos a diferentes tratamentos visando a germinação *in vitro*.
 A) Controle; B) ANA 4 μM + GA 4 μM ; C) ANA 40 μM + GA 40 μM ; D) BAP 4 μM + GA 4 μM ; E) BAP 40 μM + GA 40 μM .

É interessante ressaltar que diversos estudos tem evidenciado a necessidade do tratamento prévio com desidratação. Corredoira et al. (2008) observaram um efeito positivo da desidratação na germinação, havendo uma correlação entre o estresse e a morfogênese. Segundo os autores, este efeito é especialmente verdadeiro para o meristema apical, onde a diferenciação de meristemas axilares cotiledonares devem estar envolvidos. A qualidade dos embriões somáticos e sua germinabilidade são dependentes do correto desenvolvimento e funcionamento dos meristemas (YEUNG, 1995), sendo que a baixa conversão dos embriões somáticos é geralmente caracterizada pela baixa organização dos meristemas apicais (BELMONTE et al., 2005).

No presente estudo não foi observada a germinação de embriões somáticos desidratados e não desidratados, inoculados nos diferentes tratamentos de germinação testados. Entretanto, estes resultados são fundamentais para o entendimento fisiológico e bioquímico do processo de germinação, permitindo uma posterior otimização dos protocolos de embriogênese somática nesta espécie. Uma das possíveis razões para a não conversão dos embriões pode ser a idade avançada das culturas, uma vez que as mesmas se encontram em recultivo a aproximadamente 10 anos. Neste sentido, o estabelecimento de novas culturas embriogênicas in vitro é fundamental para a continuidade deste estudo, visando a obtenção de embriões somáticos novos, que possam ser utilizadas para estudos de germinação.

CAPITULO 4

AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS E ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DURANTE A GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *O.* *CATHARINENSIS*³

³ Parte deste capítulo encontra-se no prelo para publicação. "DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; PIERUZZI, F.P.; FLOH, E.I.S. Polyamines, amino acids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. **Seed Sci Technol.**, v. 37, p. 42-51, 2009."

4.1 INTRODUÇÃO

Estudos relacionados com as alterações fisiológicas ao longo do processo germinativo em sementes recalcitrantes são bastante escassos. As informações existentes referem-se a espécies temperadas, as quais apresentam padrões de recalcitrância diferenciados, em relação às sementes tropicais e subtropicais (VASQUEZ-YANES e OROZCO-SEGOVIA, 1993), como é o caso de *O. catharinensis*.

O processo germinativo se inicia quando a semente é exposta a condições apropriadas de temperatura e umidade, associada com a degradação e mobilização de reservas, acumuladas durante a fase de maturação (PENFIELD et al., 2005). Este processo envolve a transição de um estágio desidratado e de baixa atividade metabólica, para um estágio hidratado e de alta atividade metabólica. O processo germinativo se inicia com a ativação do embrião, sem que ocorra nenhuma alteração morfológica aparente, e finaliza com a iniciação do alongamento da radícula, etapa esta onde ocorre uma significativa alteração na fisiologia do embrião. Em muitos casos, a semente somente germina se a respiração e a produção de ATP forem adequadas, criando um requerimento de oxigênio (FLORES, 2003).

O. catharinensis apresenta germinação do tipo hipógea, tendo o desenvolvimento da plântula classificado como criptocotilar, com os dois cotilédones, ricos em reservas, próximos ao solo durante o desenvolvimento (FLORES, 2003). Até o presente não existem estudos que apresentem as alterações bioquímicas e moleculares durante o processo germinativo nesta espécie.

Neste capítulo foram avaliados os níveis endógenos de AIA e ABA, e perfis de PAs e aminoácidos livres, além do estudo da expressão diferencial de proteínas ao longo do processo germinativo em sementes de *O. catharinensis*. Estes estudos, além de importantes para a compreensão da fisiologia da germinação zigótica, podem proporcionar parâmetros para o acompanhamento deste processo *in vitro*.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Foram utilizadas sementes maduras de *O. catharinensis* coletadas no Instituto Florestal - Parque Estadual da Cantareira – SP (23°24'S / 46°35'W).

4.2.2 Germinação das sementes

Após a coleta, as sementes foram removidas dos frutos, com posterior estratificação com a retirada do hipanto e o pericarpo (Figura 1). Um total de 100 sementes compostas por embrião e testa, foram colocadas para germinar em substrato contendo vermiculita (100%) previamente esterilizada, e mantidas em sala de germinação com condições fotoperiódicas de 16 h e temperatura de 27 °C. Foram coletadas amostras após 15, 30 e 60 dias de semeadura, numa tentativa de correspondência com as fases propostas por Bewley e Black (1994), ou seja: fase 1: embebição (15 dias), fase 2: aumento da atividade metabólica (30 dias) e fase 3: início do crescimento emergência da radícula (Figura 2) (60 dias). O material foi lavado com água destilada, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a – 80 °C para as determinações dos conteúdos endógenos de ABA, AIA, perfis de PAs e aminoácidos livres, e análise proteômica.

Figura 1 - Fruto de *O. catharinensis* com hipanto (seta) (A), sem o hipanto (B) e semente escarificada (C). (Adaptado de Dias et al., 2009).

4.2.3 Determinações bioquímicas

As determinações bioquímicas de AIA, ABA, PAs e aminoácidos livres foram realizadas de acordo com as metodologias descritas no item 2.4 do capítulo 2.

4.2.4 Análise proteômica

As análises proteômica foram realizadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 2.5 do capítulo 2.

4.2.5 Análise dos resultados

Os resultados referentes às determinações bioquímicas foram analisados e apresentados a partir da média e seu respectivo desvio padrão (SOKAL e ROHLF, 1995).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 apresenta o aspecto morfológico das sementes de *O. catharinensis* durante as diferentes fases após a semeadura. Após 60 dias, verificou-se que 40% das sementes apresentaram emergência da radícula e desenvolvimento de plântulas, e 40% apresentaram apenas a emergência da raiz. A ausência de germinação propriamente dita foi observada nos 20% restantes, onde ocorre apenas o entumescimento dos cotilédones. Esta situação confirma os dados obtidos por Carvalho (1994), que ao estudar a germinação em *O. catharinensis*, verificou que a emergência inicia-se entre 30 e 120 dias após a semeadura, com uma taxa de germinação baixa, variando entre 40 e 70%.

Figura 2 – Aspectos morfológicos de sementes de *O. catharinensis* em diferentes fases do processo germinativo: tempo zero, fase 1 (15 dias após semeadura), fase 2 (30 dias após semeadura), fase 3 (60 dias após semeadura).

4.3.1 Aminoácidos

Os aminoácidos estão relacionados com o metabolismo primário e secundário nos vegetais, controlando direta e/ou indiretamente vários aspectos ligados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (CORRUZI e LAST, 2000). Durante o desenvolvimento da semente, os aminoácidos são armazenados na forma de proteínas, e a taxa de síntese controlada, principalmente, pela disponibilidade dos aminoácidos ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico e asparagina, ou pela taxa de conversão destes em outros aminoácidos nos tecidos de reserva (BEWLEY e BLACK, 1994). O catabolismo de aminoácidos ocorre durante os estádios iniciais de germinação, servindo como fonte de energia e nutrientes para o desenvolvimento dos novos tecidos. O suplemento de aminoácidos é de fundamental importância para o controle da germinação, sendo controlado, especialmente, pelo ABA e ácido giberélico (GA) (ANZALA et al., 2006).

Os maiores níveis de aminoácidos totais (Tabela 1) foram observados nas sementes maduras (tempo 0) e posteriormente, aos 60 dias de semeadura (fase 3). Estes resultados demonstram que ocorre uma redução nos níveis de aminoácidos totais armazenados ao longo do processo germinativo até a protusão da radícula. Esta redução pode estar relacionada com a utilização destes aminoácidos no metabolismo de nitrogênio durante o processo germinativo, e na síntese de outros compostos, conforme proposto por Corruzi e Last (2000). Vários trabalhos utilizando ^{14}C demonstraram que, durante a germinação, os aminoácidos contribuem expressivamente como substrato de carbono para o sistema respiratório e a síntese

de açúcares (GLEVAREC et al., 2004). Por outro lado, o acréscimo significativo no conteúdo de aminoácidos totais observado aos 60 dias, quando ocorre a emergência da radícula e o início do crescimento da plântula, pode estar relacionado com a síntese *de novo* de aminoácidos pela plântula (CORRUZI e LAST, 2000).

Tabela 1- Conteúdo de aminoácidos livres durante a germinação de sementes de *O. catharinensis* (Média $\pm$ desvio padrão, n=3).

Aminoácidos	Semente	Dias após semeadura
	0	15	30	60
Ácido aspártico	129,62 $\pm$ 26,6	18,09 $\pm$ 2,31	41,3 $\pm$ 9,28	74,74 $\pm$ 18,18
Ácido glutâmico	140,73 $\pm$ 18,03	25,94 $\pm$ 2,87	29,26 $\pm$ 5,72	94,28 $\pm$ 9,46
Asparagina	498,38 $\pm$ 60,79	137,25 $\pm$ 23,19	296,37 $\pm$ 38,88	1495,07 $\pm$ 131,22
Serina	16,27 $\pm$ 2,45	6,33 $\pm$ 1,55	6,43 $\pm$ 2,16	39,34 $\pm$ 0,80
Glutamina	166,83 $\pm$ 58,97	6,44 $\pm$ 1,16	2,66 $\pm$ 1,27	2,89 $\pm$ 1,27
Histidina	12,95 $\pm$ 3,66	22,97 $\pm$ 0,30	19,34 $\pm$ 4,82	18,31 $\pm$ 0,08
Glicina	1,82 $\pm$ 0,18	0,84 $\pm$ 0,19	1,15 $\pm$ 0,17	2,22 $\pm$ 0,56
Arginina	8,21 $\pm$ 0,25	5,19 $\pm$ 1,87	26,70 $\pm$ 0,96	11,38 $\pm$ 2,22
Citrulina	1,69 $\pm$ 0,17	2,36 $\pm$ 0,34	2,42 $\pm$ 0,36	3,63 $\pm$ 0,13
Treonina	3,68 $\pm$ 0,34	2,15 $\pm$ 0,61	5,38 $\pm$ 0,57	2,44 $\pm$ 2,59
Alanina	13,62 $\pm$ 3,03	8,40 $\pm$ 1,34	3,27 $\pm$ 0,61	1,72 $\pm$ 0,08
Gaba	6,39 $\pm$ 1,66	2,73 $\pm$ 0,21	3,50 $\pm$ 0,27	5,55 $\pm$ 0,15
Tirosina	3,01 $\pm$ 0,14	1,15 $\pm$ 0,25	3,54 $\pm$ 0,30	3,34 $\pm$ 0,11
Triptofano	4,48 $\pm$ 0,38	0,32 $\pm$ 0,01	1,35 $\pm$ 0,27	5,97 $\pm$ 1,43
Metionina	0,46 $\pm$ 0,06	0,81 $\pm$ 0,07	0,80 $\pm$ 0,21	2,12 $\pm$ 0,12
Valina	1,98 $\pm$ 0,49	1,97 $\pm$ 0,36	3,30 $\pm$ 1,36	10,04 $\pm$ 1,54
Fenilalanina	3,31 $\pm$ 0,43	1,94 $\pm$ 0,31	2,72 $\pm$ 1,08	8,50 $\pm$ 1,23
Isoleucina	1,56 $\pm$ 0,55	1,52 $\pm$ 0,27	2,84 $\pm$ 0,03	4,24 $\pm$ 0,51
Leucina	25,89 $\pm$ 9,69	30,42 $\pm$ 3,01	19,96 $\pm$ 0,23	67,60 $\pm$ 5,44
Ornitina	4,76 $\pm$ 1,64	1,73 $\pm$ 0,37	3,06 $\pm$ 0,27	4,59 $\pm$ 0,06
Lisina	3,71 $\pm$ 0,18	4,49 $\pm$ 0,46	11,04 $\pm$ 0,65	10,86 $\pm$ 2,50
Total	1049,30 $\pm$ 144,48	283,04 $\pm$ 33,05	486,40 $\pm$ 62,38	1883,62 $\pm$ 130,78

Dentre os aminoácidos, o ácido aspártico, o ácido glutâmico, a asparagina e a glutamina foram os que apresentaram maiores concentrações. Observou-se uma expressiva redução aos 15 dias de semeadura, sendo que posteriormente houve aumento nas concentrações até os 60 dias. Neste período, a asparagina foi observada em maior concentração, sendo o aminoácido predominante durante todo o período de germinação (Tabela 1). O ácido aspártico, apesar de estar envolvido na translocação de nitrogênio, é também o precursor na síntese de asparagina, treonina, metionina, lisina e isoleucina (LAM et al., 1995). O ácido glutâmico possui um papel central na inter-conversão dos aminoácidos durante a germinação (GLEVAREC et al., 2004).

Apenas as concentrações de histidina e lisina apresentam incremento nas fases iniciais do processo germinativo. A biossíntese de lisina possui papel fundamental no desenvolvimento vegetal regulando a biossíntese de treonina, isoleucina e metionina, e desempenhando papel regulatório no pH celular (STEPANSKY et al., 2006). Uma maior velocidade de germinação e crescimento pós germinativo é acompanhado por altas taxas de síntese e catabolismo de metionina e treonina (ANZALA et al., 2006), sendo a lisina, um bom candidato para o monitoramento do crescimento e desenvolvimento (ZHU e GALILI, 2004).

A dinâmica da concentração e tipo de aminoácidos durante o processo germinativo de sementes de *O. catharinensis* permite um acompanhamento do processo germinativo nesta espécie. Estes resultados poderão ser úteis em estudos futuros, no sistema de embriogênese somática nesta espécie pela incorporação de aminoácidos ao meio de cultura para indução da germinação.

4.3.2 Poliaminas (PAs)

A importância das PAs durante o processo embriogênico tem sido objeto de estudo de diferentes sistemas vegetais (KAKKAR et al., 2000; SONG et al., 2001; SHOEB et al., 2001; PAPADAKIS et al., 2005; GROPPA e BENAVIDES, 2008). Entretanto pesquisas sobre o perfil destes compostos durante o processo germinativo são praticamente inexistentes (GALLARDO et al., 1992; PUGA-HERMIDA et al., 2006).

No presente trabalho observou-se um decréscimo no conteúdo de PAs totais (livres + conjugadas), entre 30 e 60 dias após a semeadura (Fase 2 e 3) (Figura 3A). Estudos com plântulas de *Arabidopsis* demonstraram que o conteúdo de PAs livres e conjugadas são maiores no início da germinação, durante o período de embebição, e decrescem quando há protusão da radícula (PUGA-HERMIDA et al., 2006). Ao final da germinação, em sementes de *Arachis hypogea*, ocorre uma diminuição do conteúdo de todas as PAs, nos cotilédones, concomitantemente a um aumento no conteúdo destas no eixo embrionário (SAVITHRAMMA e SWAMY, 1989), sugerindo uma relação entre fonte e dreno de PAs nos diferentes órgãos.

Figura 3 - Conteúdo de PAs durante o processo germinativo das sementes de *O. catharinensis*. (tempo 0) e após 15, 30 e 60 dias de semeadura: PAs totais ($\mu\text{g.g}^{-1}$ MF) (Livres+conjugadas) (A); PAs livres ($\mu\text{g.g}^{-1}$ MF)(B), relação Put/(Spd+Spm) (C) e PAs conjugadas ($\mu\text{g.g}^{-1}$ MF) (D) (média $\pm$ desvio padrão; n=3).

Freqüentemente, o alongamento e a diferenciação celular estão relacionados com altos níveis de Spd e Spm. Um aumento na relação Put.(Spd+Spm) $^{-1}$ está relacionada com os tecidos em intensa atividade mitótica, enquanto valores baixos para esta relação estão associados com a taxa de alongamento celular em órgãos de plântulas em desenvolvimento (PAPADAKIS et al., 2005). No presente trabalho, observou-se um

aumento na relação $\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}$ nos primeiros 15 dias, mantendo-se estável até os 60 dias de germinação (Figura 3C). Este aumento na relação aos 15 dias pode estar relacionado com o aumento no conteúdo de Put, associada a divisão celular.

É interessante salientar que os aminoácidos arginina e ornitina são precursores diretos, enquanto a metionina é um precursor indireto, da rota de biossíntese de PAs em plantas (BOUCHEREAU et al., 1999; KUSANO et al., 2008). Durante a germinação da semente de *O. catharinensis*, observa-se uma possível relação entre o conteúdo das PAs, com os níveis de arginina, ornitina e metionina. Observou-se que os níveis de arginina e ornitina (Tabela 1) apresentaram uma correlação inversa com os conteúdos de Put (Figura 3B), sendo que nos primeiros 15 dias (fase 1), houve uma redução dos níveis de arginina e ornitina, e um aumento no conteúdo de Put. Posteriormente, observou um aumento nos níveis destes aminoácidos até aos 60 dias (fase 2), com redução no conteúdo de Put. Estes resultados sugerem que a variação no conteúdo destes aminoácidos pode estar relacionada com a sua utilização na biossíntese de Put durante a germinação nesta espécie.

Em relação a metionina (Tabela 1), observou-se um aumento no conteúdo deste aminoácido, acompanhado de redução no conteúdo de Spd e Spm durante todo o período de germinação das sementes de *O. catharinensis*. Esta situação sugere que o aumento no conteúdo de metionina possa estar associado com a sua não utilização na síntese de Spd e Spm.

Embora o conteúdo de PAs conjugadas solúveis possa variar durante o ciclo celular, o seu significado fisiológico nas plantas ainda não é bem conhecido (BOUCHEREAU et al., 1999, KUZNETSOV et al., 2006). Durante a germinação de sementes de *O. catharinensis*, somente a Spm foi a PA observada na forma conjugada e em concentrações crescentes a partir de 30 dias (fase 2) (Figura 3D). A não conjugação das PAs, Put e Spd, pode estar relacionada com a intensa utilização destas PAs durante os eventos germinativos em *O. catharinensis*.

4.3.3 Ácido Indol Acético (AIA)

Embora vários estudos descrevam a importância do AIA durante o desenvolvimento do embrião (BEWLEY e BLACK, 1994; SANTA-CATARINA et al., 2006; SUÁREZ e BOZHKO, 2008), pouco é conhecido sobre o efeito do AIA, no processo germinativo propriamente dito.

Durante a germinação das sementes de *O. catharinensis*, observou-se uma tendência de aumento no conteúdo de AIA até os 15 dias (fase 1), seguido de decréscimo e estabilização até os 60 dias, quando da protusão da radícula (fase 3) e início do desenvolvimento da plântula. Resultados semelhantes foram observados por Ljung et al. (2001) em *Pinus sylvestris*, no qual observaram que os níveis de AIA são maiores nos estádios iniciais da germinação, durante a fase de embebição, e decrescendo quando do alongamento da raiz.

O aminoácido triptofano é considerado como principal precursor de AIA (BANDURSKI et al., 1995; LJUNG et al., 2001). No presente trabalho, observou-se um decréscimo no conteúdo de triptofano durante a germinação (Tabela 1) e um aumento no conteúdo de AIA (Figura 4A), nos primeiros 15 dias. Este resultado sugere uma possível utilização do aminoácido triptofano para a síntese de AIA durante os 15 dias iniciais, nas sementes de *O. catharinensis*.

4.3.4 Ácido Abscísico (ABA)

O ABA desencadeia uma rota importante na regulação hormonal durante o desenvolvimento da semente, atuando na síntese de proteínas de reserva e lipídios, na promoção da tolerância a desidratação e dormência, e inibindo a transição do crescimento embriogênico para o germinativo (FINKELSTEIN et al., 2002; NAMBARA e MARION-POLL, 2005; CHRISTMANN et al., 2006). Nas sementes, o ABA é sintetizado em tecidos de diferentes origens: a testa, de origem materna, e o endosperma e embrião, ambos resultado da fertilização. Em geral, o ABA de origem materna promove o acúmulo de reserva, enquanto o ABA proveniente do embrião promove a dormência da semente e tolerância à desidratação (FINKELSTEIN et al., 2002; LEFEBVRE et al., 2006).

Durante a germinação dos embriões zigóticos de *O. catharinensis*, observou-se um decréscimo no conteúdo endógeno de ABA nos primeiros 15 dias, seguido de uma estabilização com valores muito próximos até 60 dias (Figura 4B). Embriões zigóticos de *O. catharinensis* apresentam alto conteúdo de ABA, no final da fase de maturação, possivelmente relacionado com a dormência e recalcitrância (SANTA-CATARINA et al., 2006). A necessidade de uma redução no conteúdo endógeno de ABA para o início do processo germinativo pode ser um fator determinante e responsável pelo longo período necessário para a germinação destas sementes nesta espécie. A ação do ABA é reconhecida, favorecendo a maturação e inibindo a germinação (FINKELSTEIN et al., 2002; KOORNNEEF et al., 2002).

Figura 4 - Conteúdo de AIA (A) e ABA (B) no processo germinativo das sementes maduras (tempo 0) de *O. catharinensis* e após 15, 30 e 60 dias de sementeira (média±desvio padrão; n=3).

A figura 5 representa um resumo dos resultados obtidos no presente trabalho, em relação ao conteúdo endógeno de AIA, ABA, perfis de PAs e aminoácidos totais. Estes resultados podem ser utilizados como parâmetros nos estudos de germinação em embriões somáticos.

Figura 5 – Conteúdo endógeno de AIA, ABA, PAs totais, Put livre, Spd + Spm livres e aminoácidos totais, nas sementes de *O. catharinensis*, em diferentes períodos de semeadura.

4.3.5 Proteômica

O conteúdo de proteínas (Figura 6A) e o número de polipeptídeos expressos (Figura 6B) apresentaram uma redução ao longo do processo de germinação. Aproximadamente, 80% das proteínas de reserva sintetizadas durante o desenvolvimento da semente são completamente consumidas durante a germinação e desenvolvimento da plântula (FINNIE et al., 2004). Durante o período de germinação, as proteínas de reserva são degradadas por uma variedade de proteases sendo convertidas e hidrolisadas em aminoácidos livres provendo energia e dando suporte ao crescimento do eixo embrionário (RAMAKRISHNA et al., 2006).

Nas etapas próximas à protusão da radícula, verifica-se um predomínio das proteínas de baixo peso molecular (Figura 7). Nos estádios iniciais observa-se predomínio dos polipeptídeos de alto peso molecular, os quais podem estar relacionados com proteínas de reserva, uma vez que com o desenvolvimento há mobilização deste grupo. Proteínas inibidoras de tripsinas, envolvidas em resposta

contra herbivoria, também são abundantes nas sementes maduras e decrescem rapidamente durante a germinação (FINNIE et al., 2004).

Figura 6 – Conteúdo de proteínas totais (mg.g⁻¹MF) em sementes de *O. catharinensis* em diferentes períodos após a sementeira (A) e número de spots nos géis de eletroforese bidimensional (2-DE) nos diferentes tempos de sementeira (B). (Média ± desvio padrão n=3).

Um grupo de polipeptídeos, com peso molecular de aproximadamente 51kDa, apresenta alta expressão na semente madura, tendo sua expressão reduzida, e não sendo mais visualizadas durante a protusão da radícula. As principais alterações no padrão de expressão de proteínas, nos primeiros estádios da germinação estão relacionados às proteínas de reserva e LEAs, e aquelas envolvidas na indução de ABA (BONSAGER et al., 2007).

O grupo de polipeptídeos mais expressivo ao longo da germinação foi o grupo com peso molecular de aproximadamente 25 kDa, possivelmente envolvido em atividades de proteases e hidrolases. Estas proteínas podem ser, sintetizadas ou ativadas, pela mobilização ou modificação dos componentes da parede celular (CHIBANI et al., 2006). Durante o alongamento da radícula, as sementes respondem às variações referentes aos estresses oxidativo, salino e osmótico, através de alterações na glicólise e ciclo do ácido cítrico, e hidrólise das substâncias de reserva (BONSAGER et al., 2007).

Figura 7 – Distribuição dos spots em classes de peso molecular (kDa), nos diferentes períodos após a semeadura. A definição do número de classes foi estabelecida pela fórmula de Sturges (1926).

Observa-se que ocorre uma síntese bastante reduzida de novas proteínas ao longo da germinação. Praticamente 90% dos polipeptídeos expressos durante a protusão da radícula, estão presentes durante todo o processo germinativo (Figura 8). O processo de germinação está associado com modificações na abundância de um pequeno número de proteínas, dando suporte a idéia de que as sementes desidratadas estão prontas para germinar (BOVE et al., 2001). Gallardo et al. (2001) identificaram 1300 polipeptídeos, dos quais apenas 74 spots apresentaram variação ao longo do processo germinativo em *Arabidopsis*, e sendo que apenas 12 spots estavam relacionados com funções regulatórias. Fu et al. (2005) observaram que cerca de 67% das proteínas identificadas em todos os estádios da germinação, eram classificadas como “housekeeping”, sendo que não houve expressão de novas proteínas ao longo do processo germinativo.

Durante o desenvolvimento da semente, o metabolismo é altamente anabólico, sendo caracterizado pela síntese e depósito de reservas. Em contraste, durante a germinação e crescimento inicial, ocorre a mobilização de energias para o crescimento da plântula (GALLARDO et al., 2001). A germinação é inicialmente

caracterizada pelo alongamento celular, possibilitando que o embrião rompa seu envoltório (MANSFIELD e BRARTY, 1996). Em sementes ortodoxas, após a reativação do metabolismo basal, o início da germinação requer dois processos: o acúmulo de osmóticos no eixo embrionário, e o afrouxamento da parede celular pelo influxo de prótons do citoplasma (crescimento ácido). O alongamento é acompanhado por um incremento proporcional na expressão de proteínas 14-3-3, uma vez que este grupo está envolvido na regulação da atividade da H⁺ATPase (OBRUCHEVA, 2008).

Figura 8 – Perfis protéicos (2-DE) na semente madura e após 15, 30 e 60 dias após semeadura. Os retângulos destacam as regiões com maior variação na expressão.

A sensibilidade das sementes recalcitrantes à desidratação pode ser resultado da ausência de desidrinas, contudo verificou-se a presença destas proteínas em espécies arbóreas recalcitrantes de clima temperado (GUMILEVSKAYA e AZARKOVICH, 2007). Em sementes ortodoxas, as proteínas LEA e desidrinas, correspondem a 30% das proteínas não relacionadas a reserva, e desaparecem rapidamente durante o processo germinativo (AZARKOVICK e

GUMILEVSKAYA, 2006). Trabalhos recentes também demonstraram a presença de proteínas hsp (heat shock proteins) em sementes recalcitrantes, contudo ainda não se conhece qual seria sua função. (BERJAK; PAMMENTER, 2007).

O conhecimento acerca das alterações bioquímicas durante o processo germinativo em espécies com sementes recalcitrantes, possibilitará a elaboração de estratégias para a conservação e armazenagem deste tipo de sementes, além de fornecer subsídios para o estabelecimento de um sistema de embriogênese somática. Técnicas, como a espectrometria de massas, apresentam-se como uma ferramenta analítica essencial para as ciências biológicas modernas, não apenas pela sua alta sensibilidade, mas principalmente pelo conteúdo de informação total gerada pela técnica (NEWTON et al., 2004). A futura identificação das proteínas que apresentaram maior variação durante o processo germinativo observadas no presente trabalho permitirá o estabelecimento de proteínas marcadoras para o acompanhamento do processo in vitro.

CAPÍTULO 5

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *O. CATHARINENSIS*⁴

⁴ O manuscrito referente a este capítulo encontra-se em redação.

5.1 INTRODUÇÃO

A identificação de proteínas específicas para os diferentes estádios de desenvolvimento do embrião zigótico é uma tendência nos estudos atuais em proteômica, pois permite a sua utilização como marcadores bioquímicos (SILVEIRA et al., 2008).

A dinâmica de proteínas em um sistema vivo é influenciada por diversos fatores internos e externos. Fatores epigenéticos determinam modificações pós-traducionais e a conformação das proteínas, sendo o estudo e caracterização de mapas protéicos de diferentes estádios de desenvolvimento importantes ferramentas associadas aos estudos de genômica (WONG e ABUBAKAR, 2005). Nos últimos anos vários estudos têm focado a caracterização da dinâmica de proteínas ao longo do desenvolvimento vegetal, associada à caracterização do genoma e transcriptoma (ROBERTS, 2002; HEAZLEWOOD e MILLAR, 2003; CHEN e HARMON, 2006; ROSSIGNOL et al., 2006).

A análise proteômica oferece a oportunidade de examinar, simultaneamente, alterações e classificar padrões temporais de acúmulo de proteínas, que ocorrem durante o desenvolvimento da semente, possibilitando a identificação de proteínas marcadoras estágio específicas (SKYLAS et al., 2000; BOVE et al., 2001; FINNIE et al., 2002; DIAS et al., 2007). Para algumas coníferas, como *Picea abies*, foi demonstrado que o padrão de acúmulo de proteínas de reserva nos embriões zigóticos e somáticos é similar. Assim, sugeriu-se a possibilidade de utilização de proteínas de reserva como marcadores moleculares do padrão de desenvolvimento (HAKMAN, 1993).

O estudo proteômico em plantas é dificultado pela presença de proteases e compostos que podem interferir na análise proteômica (CHEN e HARMON, 2006). Adicionalmente, a identificação e caracterização de proteínas em genomas não seqüenciados, como o caso de *O. catharinensis*, torna-se laborioso, uma vez que este processo é acelerado pela disponibilidade de seqüências genômicas e de seqüências expressas (EST) (DIAS et al., 2007), associado ao fato de que as proteínas vegetais compartilham quantidade significativa de identidade/homologia (VAN WIJK, 2001).

O objetivo deste trabalho foi estudar a expressão diferencial de proteínas nos diferentes estádios do desenvolvimento do embrião zigótico de *O. catharinensis*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material Vegetal

Frutos de *O. catharinensis* foram coletados no Parque Estadual da Cantareira – SP em três épocas: 24, 32 e 40 semanas após a floração, representando os embriões nos estádios de desenvolvimento cotiledonar inicial, cotiledonar e maduro (Figura 1), respectivamente. As sementes foram estocadas a -80°C até as análises.

Figura 1 – Aspectos morfológicos e cortes longitudinais dos estádios de desenvolvimento dos frutos de *Ocotea catharinensis*. **A)** cotiledonar inicial; **B)** cotiledonar; **C)** maduro. C= cotilédone. As setas indicam o eixo embrionário. (Adaptado de Santa-Catarina et al., 2006)

5.2.2 Análise proteômica

A análise proteômica foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 2.5 do capítulo 2. Primeiramente os géis foram corados utilizando-se a metodologia com prata. Posteriormente, objetivando-se a identificação de

polipeptídeos diferencialmente expressos, foi utilizada a metodologia com Coomassie Coloidal, uma vez que esta metodologia permite melhores resultados na identificação por espectrometria de massas, além de permitir estudos semi-quantitativos na expressão diferencial de proteínas.

5.2.2.1 Coloração com Coomassie Coloidal

Os spots foram visualizadas pela coloração com Coomassie coloidal de acordo com a metodologia descrita por Neuhoff et al. (1985), com modificações. Para tanto, os géis foram fixados “overnight” em solução contendo 40% etanol e 10% ácido acético. Posteriormente os géis foram lavados em água por 10 min e corados por 12 h em solução contendo 20% de etanol, 0,08% de Coomassie G-250, 1,6% ácido orto-fosfórico e 8% de sulfato de amônio. Finalmente, os géis foram lavados em 1% ácido acético por 5 h.

5.2.2.2 Identificação de proteínas por nanoLC-MS/MS

Para a identificação de proteínas diferencialmente expressas ao longo do desenvolvimento, os spots foram digeridos *in gel* com tripsina como descrito por Schevchenko et al. (2006). As misturas peptídicas, resultantes do processo de digestão, foram analisadas por nanoLC-MS/MS em um cromatógrafo líquido Ultimate (Dionex[®]) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo LTQ (ThermoFisher Scientific[®]). Para tal, os peptídeos trípticos foram ressolubilizados em 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) e eluídos em uma pré-coluna de carregamento C18 PepMAP100 (1 mm x 300 µm, 5 µm) (Dionex[®]) sob um fluxo de 20 µL.min⁻¹ de 0,05% de TFA.

Após o carregamento, concentração e lavagem (4 min), os peptídeos foram separados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando uma nano-coluna C18 PepMAP100 (15 cm x 75 µm, 3 µm) (Dionex[®]). Foram utilizados como solventes uma solução de 5% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e uma solução de 80% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico (solvente B). A separação foi realizada sob um fluxo de 200 nL.min⁻¹ e a mudança na proporção do solvente B em relação ao solvente A definiu o gradiente de corrida, conforme descrito a seguir: de 5 a 20% nos primeiros 20 min, de 20 a 50% de 20 a 36 min, de

50 a 100% de 36 a 41 min, 100% de 41 a 51 min e 5% entre 51 e 56 min. Após a separação em HPLC, os peptídeos foram injetados em tandem no espectrômetro de massas utilizando um sistema de nanospray (ThermoElectron Corp[®]) equipado com uma agulha de sílica de 10 µm de diâmetro interno (New Objective[®]). A voltagem do spray utilizada foi de 1,8 kV e a temperatura do capilar de transferência iônica foi ajustada a 200 °C. O espectrômetro de massas operou no modo dependente de dados (DDA) e cada ciclo de aquisição consistiu de varredura entre 350-1000 *m/z* seguido de fragmentação dos três precursores mais intensos, utilizando energia relativa de colisão de 35%. O controle de ganhos automáticos (AGC) de espectros consistiu de uma varredura para seleção de precursores e 3 varreduras para os espectros de MS/MS. Íons de carga igual a 1 foram excluídos dos eventos de MS/MS e as *m/z* dos íons precursores fragmentados foram inseridos em uma lista de exclusão por 60 segundos.

Os espectros obtidos foram convertidos em um único arquivo tipo .mgf utilizando o programa BioWorks 3.2 (Thermo Electron Corp.[®]). Previamente às buscas por MASCOT e MSBLAST, espectros não peptídicos foram filtrados contra um banco de espectros de produtos de fragmentação de queratina e tripsina através do programa Eagle Eye (<http://genetics.bwh.harvard.edu/cgi-bin/msfilter/eagleeye.cgi>).

As buscas foram realizadas no banco de dados NCBI nr através do programa MASCOT v.2.2 (Matrix Science Ltd[®]) instalado em dois servidores locais. As configurações de busca foram: 2 Da para tolerância de massas do íon precursor e 0.5 Da para os íons filhos, foi permitido uma falha na fragmentação e carbamidometilação da cisteína, oxidação de metionina e acetilação de N-proteínas foram adicionadas como modificações variáveis. Foram consideradas identificações as proteínas com pelo menos três peptídeos de escore maior que 20. Para identificações a partir de somente um ou dois espectros, ao menos um peptídeo deve possuir escore acima de 50.

Paralelamente à busca restrigente por MASCOT, sequenciamento *de novo* automatizado foi realizado a partir dos espectros obtidos. Para tal, o programa PepNovo foi utilizado e apenas seqüências candidatas com escore acima de 6 foram consideradas (FRANK e PEVZNER, 2005). Nas buscas por MS BLAST, todas as seqüências peptídicas selecionadas foram combinadas em uma única entrada e as buscas foram realizadas no NCBI nr através do sítio

<http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>. A confirmação/identificação de proteínas foi realizada de acordo com a tabela de identificação via MS BLAST proposta por Habermann et al. (2004). Quando as buscas através de MASCOT e MS BLAST resultaram em proteínas com mesmo ID, porém com diferentes números de acesso, as sequências candidatas foram alinhadas, utilizando o algoritmo bl2seq/blastp, e a homologia reportada.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os mapas proteômicos dos diferentes estádios do embrião de *O. catharinensis* encontram-se na Figura 2. A análise destes resultados permitiu a caracterização da dinâmica de proteínas envolvidas no desenvolvimento embrionário, evidenciando-se as proteínas específicas e expressas diferencialmente em cada estágio, bem como aquelas comuns ao longo da embriogênese zigótica de *O. catharinensis* (Figura 3).

Com relação aos mapas proteômicos obtidos nos diferentes estádios de desenvolvimento de *O. catharinensis*, pode-se observar que:

a) Os spots específicos do estágio cotiledonar inicial (70 polipeptídeos), possivelmente estão relacionados com proteínas envolvidas na divisão celular tais como tubulinas e anexinas. Neste período, o embrião está em desenvolvimento apresentando alta atividade mitótica, fase em que, desempenham um importante papel na separação das várias estruturas celulares, incluindo os cromossomos (GALLARDO et al., 2003);

b) O estágio cotiledonar, por sua vez, caracteriza-se pela expressão transiente de proteínas, provavelmente relacionadas a mobilização de energia, de síntese de globulinas, vicilinas (proteínas de reserva) e enzimas envolvidas na biossíntese de metionina (GALLARDO et al., 2003). A metionina é metabólico fundamental, não apenas para a síntese de aminoácidos, mas também por ser precursor do etileno e doador primário do grupamento aminopropil para a biossíntese das poliaminas espermidina e espermina (GALLARDO et al., 2003);

c) Os spots específicos do estágio maduro (91 polipeptídeos), possivelmente, estão relacionados com as proteínas LEA e proteínas reserva, ambas sintetizadas no final do desenvolvimento embrionário. As proteínas LEA têm grande afinidade

com as moléculas de água, atuando na proteção à desidratação da semente (TUNNACLIFFE e WISE, 2007), enquanto que as proteínas de reserva são as principais constituintes protéicas das fases tardias do desenvolvimento (HADJUCH et al., 2005).

Figura 2 – Perfis protéicos (2-DE) dos estádios cotiledonar inicial (A), cotiledonar (B) e maduro (C) da embriogênese zigótica de *O. catharinensis*. Em destaque, regiões nas quais se observa maior diferença no padrão de expressão de proteínas.

Figura 3 – Expressão diferencial de proteínas, em número de polipeptídeos, durante diferentes estádios da embriogênese zigótica em *O. catharinensis*. Valores entre parênteses representam o número total de proteínas do estágio de desenvolvimento.

Balbuena et al. (2009) observaram um maior número de spots específicos durante o estágio cotiledonar maduro em embriões zigóticos de *Araucaria angustifolia*, enquanto em nossos estudos o maior número de “spots” foi observado no estágio cotiledonar. É importante salientar que apesar da diminuição no número de “spots” apresentado no estágio maduro, há um aumento no conteúdo total das proteínas (Figura 4). Esta situação pode ter sido ocasionada pelo aumento de proteínas específicas do estágio de maturação e desidratação do embrião, tais como proteínas LEA e reserva, e proteínas relacionadas a proteção contra insetos praga (SHEORAN et al., 2005).

Santa-Catarina et al. (2006) observaram que durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *O. catharinensis* há um aumento na concentração de proteínas insolúveis apenas nos estádios finais, enquanto as proteínas solúveis apresentam um acréscimo constante ao longo do desenvolvimento. Estudos mostram que durante os estádios finais do desenvolvimento há uma absorção intensa de aminoácidos pelos cotilédones, demandando um aumento da síntese de proteínas de reserva durante nesta fase de desenvolvimento (WEBER et al., 1997).

Figura 4 – Conteúdo de proteínas totais (mg.g⁻¹ MF) em embriões zigóticos de *O. catharinensis* nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Diversos estudos relatam a síntese e acúmulo de proteínas de reserva nos diferentes estádios da embriogênese (CHATAI e MISRA, 1998; SILVEIRA et al., 2008). O acúmulo destas proteínas durante a fase final do desenvolvimento é fundamental, uma vez que estas serão degradadas e utilizadas durante o processo de germinação do embrião, fornecendo aminoácidos livres para o início do desenvolvimento da plântula (SHEWRY et al., 1995). A última fase do desenvolvimento da semente refere-se a fase de maturação e inclui os processos acúmulo de reservas e aquisição de tolerância à desidratação (LI et al., 2005). Proteínas associadas aos estádios tardios da embriogênese apresentam funções protetoras e são reguladas não apenas durante a fase de maturação mas também durante as fases tardias de germinação (FINNIE et al., 2002; DELL'AQUILA, 2004).

Em relação ao número de polipeptídeos nas diferentes faixas de peso molecular (Figura 5) pode-se observar que com o desenvolvimento da semente há uma redução no número de proteínas de baixo peso molecular, e um aumento das proteínas de alto peso molecular. O aumento da expressão das proteínas de alto peso molecular é fundamental para o desenvolvimento embrionário, uma vez que estas estão relacionadas com atividades de manutenção e reserva, enquanto as proteínas de baixo peso molecular estão relacionadas com processos de síntese (VENSEL et al., 2005). A maior parte das proteínas encontra-se na faixa com ponto isoelétrico (*pI*) em torno de 5 e 6, para todos os estádios. Foram realizados géis com

diferentes faixas de gradiente de pH (pH 3-10 e pH 6-11) entretanto, não foram identificadas proteínas nas faixas extremas de pH (dados não apresentados).

Figura 5 – Distribuição do número de proteínas, de acordo com peso molecular (MW), em géis bidimensionais nos diferentes estádios da embriogênese zigótica de *O. catharinensis*.

Observou-se que os perfis proteômicos obtidos para os embriões somáticos nos estudos visando maturação e germinação (capítulo 2 e 3), demonstraram uma similaridade com o apresentado por embriões zigóticos no estágio globular (Figura 2A). Esta condição demonstra que não está ocorrendo a indução de proteínas relacionadas a maturação nos embriões somáticos, uma vez que Madakadze et al. (2000), observaram que 80% das proteínas de reserva expressas no embrião zigótico de *Pelargonium hortorum*, estavam presentes nos embriões somáticos maduros. Klimaszewska et al. (2004) demonstrou que em meio de maturação suplementado com 6% de sacarose, os embriões apresentaram maiores concentrações nas principais proteínas de reserva, quando comparado com o meio suplementado com 3% de sacarose. O mesmo comportamento foi observado por Winkelmann et al. (2006) em *Cyclamen persicum*, onde o tratamento suplementado com 6% de sacarose, também promoveu incremento na tolerância à desidratação.

Estudos proteômicos buscando relacionar diferentes proteínas de reserva com estádios específicos do desenvolvimento das sementes foram realizados por diferentes grupos (SALLANDROUZE et al., 2002; SILVEIRA et al., 2004; BALBUENA et al., 2009). Silveira et al., (2004), identificaram três proteínas expressas diferencialmente no embrião maduro de *A. angustifolia*, não presentes no embrião

no estágio torpedo. Dentre as três proteínas, uma delas foi identificada como uma proteína tipo LEA do grupo 3, enquanto a outra corresponde a uma proteína de reserva tipo vicilina 7S.

Buscando-se um melhor entendimento das alterações no metabolismo durante o desenvolvimento da semente, foram realizadas a identificação por espectrometria de massas (MS/MS), de oito “spots” diferencialmente expressos (Figura 6), obtendo-se a identificação de 13 proteínas (Tabela 1).

Figura 6 – Polipeptídeos diferencialmente expressos, observados no estágio maduro de *O. catharinensis*, selecionados para identificação por espectrometria de massas.

Tabela 1 – Lista de proteínas identificadas em embriões zigóticos maduros de *O. catharinensis* através de busca restrigente por MASCOT e sequenciamento de novo seguido de busca por MS BLAST

	MASCOT					MASCOT/MSBLAST (bl2seq)	MSBLAST				
	ID	Espécie	Número de acesso	Escore	Peptídeos Únicos	Identities (%) / positivas (%)	ID	Espécie	gi	HSPs	aas
2	BiP	<i>Glycine max</i>	BAD95470	79	4	91/95	Luminal-binding protein 5 (BiP 5)	<i>Nicotiana tabacum</i>	729623	2	30
	GDP-mannose - epimerase	<i>Malpighia glabra</i>	ABB53472	74	3	100/100	GDP mannose-epimerase	<i>Malpighia glabra</i>	80973462	1	12
5	Threonine endopeptidase	<i>Arachis hypogaea</i>	ACF74359	112	2	88/95	Proteasome beta subunit A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	79325892	1	11
6	Granule bound starch synthase	<i>Malus domestica</i>	ACB97678	435	7	73/85	Granule-bound starch synthase	<i>Manihot esculenta</i>	2833388	20	206
7	ATP synthase beta subunit	<i>Triticum aestivum</i>	CAA52636	165	7	80/82	ATP synthase beta chain	<i>Gossypium hirsutum</i>	5045070	1	12
8	Enoyl-ACP reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA74175	317	1	100/100	Enoyl-ACP reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2204087	18	216
9	UDP-glucose pyrophosphorylase	<i>Bambusa oldhamii</i>	AAO48422	208	4	100/100	UDP-glucose pyrophosphorylase	<i>Bambusa oldhamii</i>	37729658	5	59
	Hypothetical protein	<i>Citrus paradise</i>	CAB09799	171	1	100/100	Hypothetical protein	<i>Citrus paradise</i>	2213425	12	133
	Unnamed protein product	<i>Vitis vinifera</i>	CAO21229	212	5	80/89	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	125602450	13	137
10	Probable glutathione-S-transferase	<i>Capsicum annuum</i>	AAX20044	78	1	100/100	Probable glutathione-S-transferase	<i>Capsicum annuum</i>	60459397	1	13
	Vacuolar ATPase subunit B	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	CAD27443	76	2	100/100	Vacuolar ATPase subunit B	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	26986106	1	13
	Cytosolic ascorbate peroxidase	<i>Fragaria ananassa</i>	AAD41405	62	1	100/100	Cytosolic ascorbate peroxidase	<i>Fragaria ananassa</i>	5257552	1	13
11	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Persea americana</i>	CAB77243	169	3	100/100	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Persea americana</i>	10800924	3	27

A fase de maturação é caracterizada pela síntese de reserva, sendo os três tipos principais: proteínas, lipídeos e carboidratos. Dos oito “spots” identificados em *O. catharinensis*, verificou-se que três estão relacionados diretamente com a síntese de reservas.

As proteínas BiP (Luminal binding protein) (spot 2) são membros da família HSP70, sendo encontradas no retículo endoplasmático, estando envolvidas na translocação e processamento de proteínas (HATANO et al. 1997). Altos níveis de expressão de BiP estão associados com o acúmulo de intermediários protéicos e a síntese e mobilização de proteínas de reserva (HATANO et al. 1997; FORWARD et al. 2002). A proteína identificada no spot 6, a Granule-bound starch synthase I, é a responsável pela síntese de amilose, com a formação de cadeias extra-longas (HANASHIRO et al., 2008; STENSBALLE et al., 2008). Durante a embriogênese, a proteína enoyl-ACP redutase (spot 8) é sintetizada durante todo o período de biossíntese e deposição de lipídeos (POGHOSYAN et al., 2005). Os genes associados com a biossíntese de ácidos graxos é expressa em taxas molares constantes, contudo em diferentes níveis absolutos (O’HARA et al., 2002). Estas proteínas evidenciam a síntese de reservas durante a maturação, especialmente as proteínas BiP que apresentam expressivo incremento na abundância ao longo do desenvolvimento da semente. Silva et al. (1998) já haviam constatado que as sementes de *O. catharinensis* apresentam uma concentração de proteínas igual à de carboidratos.

UDP-glicose-pirofosforilase (UDPase) (spot 9) e frutose-bifosfato aldolase (spot 11) são enzimas chave no metabolismo de carboidratos e biossíntese de parede celular. UDPase cataliza a produção de Glicose-1-fosfato e uridina trifosfato para UDP-glicose e pirofosfato, ou a reação reversa, dependendo do “status” metabólico do tecido (CHEN et al., 2007). Kleczkowski (1996) observou que no endosperma de sementes de cereais, UDPase pode ser convertida em AGPase para a síntese de amido, podendo ser uma via alternativa para a síntese de reservas durante a maturação.

Durante o desenvolvimento da semente, a atividade metabólica e a taxa de respiração mitocondrial são altas, sugerindo que uma quantidade significativa de espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser geradas (PUKACKA e RATAJCZAK; 2007). O sistema ascorbato apresenta-se como a principal rota no metabolismo

oxidativo durante a embriogênese e a maturação (DE TULIO e ARRIGONI; 2003). Proteínas envolvidas no metabolismo oxidativo, tais como ascorbato peroxidase e glutathione transferase (spot 10) apresentam incremento na expressão ao longo do desenvolvimento da semente. Adicionalmente, altos níveis de expressão de GDP-manose-3',5'-epimerase (spot 2) podem ser correlacionados com altas concentrações de ácido ascórbico (BULLEY et al., 2009). O ácido ascórbico está envolvido no sistema redox celular, sendo que seu estado redox pode ser importante, especialmente nas respostas a estresse (NOCTOR, 2006). Durante o desenvolvimento da semente, o ácido ascórbico pode modular a síntese de fitormônios, como etileno, GA e ABA, afetando o crescimento (PASTORI et al., 2003). Estes resultados estão de acordo com os observados por Pukacka e Ratajczak, 2007. Estes autores demonstraram que sementes recalcitrantes, como é o caso de *O. catharinensis*, são caracterizadas pelo alto conteúdo de ascorbato e alta atividade de enzimas do sistema ascorbato comparado com sementes ortodoxas, nas quais os conteúdos de ácido ascórbico e a atividade da ascorbato peroxidase diminuem significativamente ou desaparecem totalmente durante a maturação e desidratação.

Proteasomas (spot 5) são complexos multicatalíticos envolvidos na degradação de proteínas, sendo requerido para a ativação de proteínas pelo processamento de precursores inativos (ETIENNE et al., 2000). Na maioria dos casos, as proteinases ativas na hidrólise de proteínas de reserva são sintetizadas durante a maturação da semente e permanecem inativas até a germinação (CALLIS, 1995).

O estudo da expressão diferencial na embriogênese zigótica fornece informações importantes para o entendimento do metabolismo e controle do desenvolvimento das sementes (GALLARDO et al., 2003). O presente estudo permitiu uma visualização da dinâmica de proteínas durante o desenvolvimento embrionário em O. catharinensis, sendo que as proteínas relacionadas ao metabolismo oxidativo e as proteínas BiP se apresentam como boas marcadoras para a fase final do desenvolvimento da semente.

CAPITULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As similaridades dos eventos da embriogênese zigótica e da embriogênese somática possibilitam que, por meio do conhecimento das modificações fisiológicas e bioquímicas, sejam estabelecidos parâmetros para o monitoramento e a otimização dos protocolos de embriogênese somática.

A idade avançada das culturas *in vitro* (aproximadamente dez anos) pode ter sido um dos fatores limitantes referentes à maturação e germinação de embriões em plântulas (capítulo 2 e 3), uma vez que com prolongado tempo de cultivo pode haver a metilação do DNA, sendo que importantes regiões responsivas ao desenvolvimento podem ter sido silenciadas. Nos estudos realizados por Hanai et al (2009) com culturas embriogênicas de *O. catharinensis*, foram observadas alterações no padrão de metilação de quatro genes, sendo que um deles parece desempenhar importante papel na embriogênese de plantas. Em decorrência desta possibilidade, vem sendo realizada no laboratório, a indução de novas culturas visando fornecer material para trabalhos futuros.

Os parâmetros bioquímicos contemplados neste estudo fornecem informações a respeito do metabolismo envolvido na transição dos diferentes estádios de desenvolvimento, tanto na maturação dos embriões somáticos como no desenvolvimento e na germinação dos embriões zigóticos.

É necessário ressaltar que este tipo de estudos envolvendo espécies com sementes recalcitrantes são escassos, e a literatura existente referente a maturação e germinação de sementes é praticamente toda baseada em estudos com espécies ortodoxas.

Os tratamentos visando a maturação por meio de estresse osmótico e a adição de ABA, realizados no capítulo 2, promoveram aumento nas concentrações de ABA, e alteração nos perfis de PAs e aminoácidos livres, em todos os tratamentos estudados, além da redução na embriogênese secundária. Observou-se que os tratamentos promoveram o incremento nas concentrações dos aminoácidos ácido glutâmico, asparagina e glutamina, sendo estes de grande importância devido sua possível utilização como fonte de nitrogênio para a síntese dos demais aminoácidos durante o processo de germinação. Além destes aminoácidos, a adição de PEG promoveu um aumento nas concentrações de alanina e Gaba, sendo estes aminoácidos bastante requeridos em respostas ao estresse. Os resultados obtidos sugerem que o tratamento contendo ABA+PEG é o mais adequado, por promover

alterações no metabolismo endógeno, semelhantes às aquelas observadas durante a maturação dos embriões zigóticos. Estas alterações estão relacionadas com o incremento nos níveis de ABA e a redução da relação $\text{Put.}(\text{Spd}+\text{Spm})^{-1}$, como o observado por Santa-Catarina et al. (2006)

Verificou-se que o processo de desidratação dos embriões somáticos (capítulo 3) resultou em reduções da relação $\text{Put.}(\text{Spd}+\text{Spm})^{-1}$ e da concentração de aminoácidos livres, sendo que estas alterações podem ser essenciais para o sucesso da conversão dos embriões somáticos em plântulas. Uma das vantagens do tratamento com estresse hídrico refere-se a não suplementação do meio de cultura com ABA, uma vez que a aplicação de altos níveis poderia implicar na redução da germinação e dificuldades para a conversão de plântulas (GUTMANN et al., 1996). Além disso, segundo Gorbatencko e Hakman (2001), o tratamento de maturação com desidratação parcial promove um incremento na organização do meristema apical promovendo um aumento na taxa de conversão dos embriões somáticos.

Nos tratamentos visando a germinação de embriões somáticos, realizado no capítulo 3, observou-se que o tratamento prévio com desidratação provocou alterações bioquímicas mais acentuadas, em comparação às observadas em embriões somáticos não desidratados, reforçando a indicação de que o tratamento com estresse hídrico seria o mais adequado para a maturação prévia dos embriões somáticos. Entretanto os tratamentos testados para induzir a germinação não foram eficientes, em relação aos hormônios e concentrações utilizadas. Também não foi observada alteração no perfil protéico dos embriões somáticos submetidos a diferentes tratamentos visando a germinação. A indução de proteínas, caso tenha ocorrido, foi em níveis muito baixos, não sendo possível a detecção pela 2-DE.

Nos diferentes tratamentos com estresse osmótico e hídrico não foram observadas alterações no perfil proteômico. Uma das possíveis razões para este resultado pode estar relacionado com a característica de recalcitrância apresentado pela semente de *O. catharinensis*. Neste sistema não se observa uma redução acentuada do metabolismo comparado com as sementes ortodoxas, e pode não ocorrer a síntese diferencial de proteínas durante o estágio de maturação da semente.

Muitos trabalhos tem frisado a questão do correto desenvolvimento e funcionamento dos meristemas na qualidade dos embriões somáticos e sua

germinabilidade (YEUNG, 1995; BELMONTE et al., 2005; CORREDOIRA et al., 2008). Estudos realizados por Santa-Catarina e Dornelas et al. (informação pessoal)⁵ a respeito da integridade e funcionalidade dos meristemas em embriões somáticos de *O. catharinensis*, por meio de análise da expressão dos genes de identidade meristemática, tais como *WUS* e *CLV1*, demonstraram a expressão anômala dos homólogos destes genes em grande parte dos embriões somáticos estudados. Estes resultados evidenciam a necessidade de uma adaptação para a otimização do completo desenvolvimento embrionário, com a formação e funcionamento correto dos meristemas.

Os estudos referentes a germinação de embriões zigóticos (capítulo 4) são fundamentais por fornecerem informações que poderão ser utilizadas no monitoramento das condições de indução para a germinação de embriões somáticos. Nos estudos realizados durante o processo germinativo observou-se a redução na concentração de ABA, condição esperada uma vez que este hormônio está relacionado a dormência e a mobilização de reservas no desenvolvimento da semente. Assim, a redução na concentração de ABA, o aumento da conjugação de Spm e aumento da relação $\text{Put.}(\text{Spd}+\text{Spm})^{-1}$, podem ser utilizados como parâmetros adequados da germinação em *O. catharinensis*, e podem ser correlacionados ao longo do processo germinativo *in vitro*, visando o monitoramento do desenvolvimento dos embriões somáticos. Neste sentido, tratamentos de maturação e germinação que promovam este comportamento no metabolismo endógeno destes compostos analisados são fundamentais para propiciar a germinação de embriões somáticos.

As análises proteômicas permitiram observar o padrão de expressão protéica ao longo do desenvolvimento da semente e durante o processo germinativo (capítulo 4 e 5). Poucos trabalhos com abordagem proteômica foram realizados com sementes de espécies recalcitrantes (SILVEIRA et al., 2006; PAWLOWSKI, 2007; BALBUENA et al., 2009). Ao longo do processo germinativo, no embrião zigótico, pode-se constatar que não houve uma síntese de novas proteínas, sendo que praticamente todas as proteínas expressas na semente inoculada, foram observadas mesmo após a emissão da radícula, estágio no qual notadamente verificou-se a degradação destas proteínas (capítulo 4).

⁵ SANTA-CATARINA, C. e DORNELAS, M.C. et al. (2009). Expressão dos genes marcadores CLAVATA1 (CLV1), WUSHEL (WUS) e PLETHORA (PLT) em embriões somáticos de *Ocotea catharinensis*. Projeto TEMÁTICO-BIOTA- FAPESP.

No tocante ao desenvolvimento da semente (capítulo 5), pode se observar um padrão específico de expressão protéica para cada um dos estádios analisados. Observou-se um acúmulo de proteínas no estádio final, entretanto verificou-se uma maior diversidade de proteínas expressas durante o estádio cotiledonar, o que pode ser entendido como uma maior complexidade neste estádio, devido a alterações do metabolismo, com a indução de proteínas de reserva e proteínas relacionadas à respostas ao estresse. Identificou-se que os perfis proteômicos obtidos para os embriões somáticos, nos estudos visando maturação e germinação (capítulos 2 e 3), demonstraram uma similaridade com o apresentado por embriões zigóticos no estádio cotiledonar inicial, evidenciando que pode não ter ocorrido a indução de proteínas relacionadas à maturação nos embriões somáticos de *O. catharinensis*. Destaca-se que a indução da síntese de proteínas relacionadas à maturação nos embriões somáticos pode ser um fator essencial para o sucesso do processo germinativo *in vitro*.

A identificação de algumas proteínas por espectrometria de massas permitiu um melhor entendimento a respeito da fisiologia do desenvolvimento de semente recalcitrante, observando a expressão de proteínas relacionadas a síntese de reservas, ao estresse oxidativo e proteases. Foram observadas proteínas que se apresentam como potenciais marcadores ao longo do desenvolvimento do embrião de *O. catharinensis*, e podem ser utilizadas no monitoramento do desenvolvimento adequado dos embriões somáticos nesta espécie. As proteínas relacionadas à síntese de reservas, tais como a BiP, e proteínas relacionadas ao metabolismo oxidativo, apresentaram um expressivo incremento na abundância durante o estádio maduro.

A realização deste trabalho veio complementar os estudos existentes ao longo de vários anos relativos à embriogênese zigótica e somática no sistema *Ocotea catharinensis*, realizados pelo Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL-USP). Deve-se ressaltar que estes resultados, além de permitirem uma visão global a respeito da embriogênese somática e zigótica, serão de grande utilidade na indicação de aspectos a serem estudados com maior detalhamento em trabalhos futuros.

Os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas para a otimização do processo de embriogênese somática em *O. catharinensis* pela identificação de

possíveis marcadores da maturação e germinação em embriões zigóticos. Estes estudos são importantes não só para *O. catharinensis*, mas para todas as espécies que apresentam sementes recalcitrantes. De maneira inédita na literatura de sementes recalcitrantes, foi possível uma melhor compreensão do metabolismo endógeno de vários compostos, como poliaminas, AIA, ABA aminoácidos e proteínas, durante os processos de maturação e germinação deste tipo de semente. Adicionalmente, em conjunto com os trabalhos anteriormente realizados no BIOCEL, este estudo permite que se tenha uma caracterização geral das alterações bioquímicas ao longo do desenvolvimento do embrião zigótico e somático, proporcionando um melhor entendimento a respeito das alterações fisiológicas durante a embriogênese em espécies arbóreas.

REFERÊNCIAS⁶

- ANZALA, F.; PAVEN, M.M.; FOURNIER, S.; RONDEAU, D.; LIMAMI, A.M. Physiological and molecular aspects of aspartate-derived amino acid metabolism during germination and post-germination growth in two maize genotypes differing in germination efficiency. **J. Exp. Bot.**, v. 57, p. 645-653, 2006.
- ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S. Synthetic seed: Prospects and limitations. **Curr. Sci.**, v. 78, p. 1438-1444, 2000.
- ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Free amino acids, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. **Biol. Plant.**, v. 47, p. 53-59, 2003
- ATTREE, S.M.; FOWKE, L.C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 35, p. 1-35, 1993
- AZARKOVICH, M.I.; GUMILEVSKAYA, N.A. Proteins of cotyledons of mature horse chestnut seeds. **Russ. J. Plant Physiol.**, v. 53, p. 629-637, 2006.
- BALBUENA, T.S.; SILVEIRA, V.; JUNQUEIRA, M.; DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E.I.S. Proteomic analysis of zygotic embryogenesis in the endangered Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). **J. Proteome Res.**, 2009. In press.
- BAIS, H.P.; HAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 69, p. 1-34, 2002
- BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. Polyamine accumulation and near loss of morphogenesis in long-term callus cultures of rice. Restoration of plant regeneration by manipulation of cellular polyamine levels. **Plant Physiol.**, v. 112, p. 1343-1348, 1996.
- BANDURSKI, R.S.; COHEN, J.D.; SLOVIN, J.P.; REINECKE, D.M. Hormone biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P.J. (Ed.) **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.39-65.
- BARENDSE, G.W.N.; PEETERS, T.J.M. Multiple hormonal control in plants. **Acta Bot. Neerl.**, v. 44, p.03-17, 1995.
- BELMONTE, M.F.; DONALD, G.; REID, D.M.; YEUNG, E.C.; STASOLLA, C. Alterations of the glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce (*Picea glauca*). **J. Exp. Bot.**, v. 56, p. 2355-2364, 2005.
- BERJAK, P.; DINI, M.; PAMMENTER, N.W. Possible mechanisms underlying the differin dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. **Seed Sci. Technol.**, v. 12, p. 365-384, 1984
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Orthodox and recalcitrant seeds. In: VOZZO, J.A. (Ed.). **Tropical Tree Seed Manual**. USDA Forest Service, Washington DC, Agricultural, 2003. 899 p.

⁶ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed recalcitrance in perspective. **Ann. Bot.**, v. 21, p. 1-16, 2007
- BERTOSSI, F.A.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y. Absciscic acid and desiccation tolerance in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. **Genet. Sel. Evol.**, v. 33, p. S75-S84, 2001.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. New York: Plenum Publishing, 1994.
- BONSAGER, B.C.; FINNIE, C.; ROEPSTORFF, P.; SVENSSON, B.. Spatio-temporal changes in germination and radical elongation of barley seeds tracked by proteome analysis of dissected embryo, aleuron layer, and endosperm tissues. **Proteomics**, v. 7, p. 4528-4540, 2007.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Sci.**, v. 140, p. 103-125, 1999.
- BOWN, A.W.; MACGREGOR, K.B.; SHELP, B.J. Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests? **Trends Plant. Sci.**, v. 11, p. 424-427, 2006.
- BOVE, J.; JULLIEN, M.; GRAPPIN, P. Functional genomics in the study of seed germination. **Genome Biol.-Reviews.**, v. 3, p. 1002.1-1002.5, 2001
- BRAY, E. Plant responses to water deficit. **Trends Plant Sci.**, v. 2, p. 48-54, 1997
- BULLEY, S.M.; RASSAM, M.; HOSER, D.; OTTO, W.; SCHUNEMANN, N.; WRIGHT, M.; MACRAE, E.; GLEAVE, A.; LAING, W. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanylttransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. **J. Exp. Bot.**, v. 72, p. 1-14, 2009.
- CAIRNEY, J.; ZHENG, L.; COWELS, A.; HSIAO, J.; ZISMANN, V.; LIU, J.; OUYANG, S.; THIBAUD-NISSEN, F.; HAMILTON, J.; CHILDS, K.; PULLMAN, G.S.; ZHANG, Y.; OH, T.; BUELL, C.R. Expressed Sequence Tags from loblolly pine embryo reveal similarities with angiosperm embryogenesis. **Plant Mol. Biol.**, v. 62, p. 485-501, 2006.
- CALLIS, J. Regulation of protein degradation. **Plant Cell.**, v. 7, p. 845-857, 1995.
- CAMPALANS, A.; PAGÉS, M.; MESSEGUER, R. Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38, p. 449-457, 2000
- CÁNOVAS, F.M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECOBERT, G.; JORRIN, J.; MOCK, H.P.; ROSSIGNOL, M. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v. 4, p. 285-298, 2004.
- CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497-2507, 2005.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPACNPQ/SPI, 1994.
- CATUSSE, J.; JOB, C.; JOB, D. Transcriptome- and proteome-wide analyses of seed germination. **C.R. Biologies.**, v. 331, p. 815-822, 2008.
- CHATTHAI, M.; MISRA, S. Sequence and expression of embryogenesis-specific cDNAs encoding 2S seed storage proteins in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb). Franco. **Planta**, v. 206, p. 138-145, 1998.
- CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

- CHEN, R.; ZHAO, X.; SHAO, Z.; ZHU, L.; HE, G. Multiple isoforms of UDP-glucose pyrophosphorylase in rice. **Physiol. Plant.** v. 129, p. 725-736, 2007.
- CHIBANI, K.; ALI-RACHEDI, S.; JOB, C.; JOB, D.; JULLIEN, M.; GRAPPIN, P. Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v. 142, p. 1493-1510, 2006.
- CHRISTMANN, A.; MOES, D.; HIMMELBACH, A.; YANG, Y.; TANG, Y.; GRILL, E. Integration of abscisic acid signalling into plant responses. **Plant Biol.**, v. 8, p. 314-325, 2006.
- CONNOR, K.F.; BONNER, F.T. The effects of desiccation on seeds of *Acer saccharinum* and *Aesculus pavia*: recalcitrance in temperate tree seeds. **Tree**, v. 15, p. 131-136, 2001.
- CORREDOIRA, E., VALLADARES, S., VIEITEZ, A.M., BALLESTER, A. Improved germination of somatic embryos and plant recovery of European chestnut. **In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant**, v. 44, p. 307-315, 2008.
- CORRUZZI, G.; LAST, R. Amino acids. In: BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.) **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 358-410.
- CVIKORVÁ, M.; MALÁ, J.; EDER, J.; HRUBCOVÁ, M.; VÁGNER, M. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion potential. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 36, p. 247-255, 1998.
- DANIN, S.J.; UPFOLD, N.; LEVIN, B.L.; NADEL, A.; ALTMAN, J.; VAN STADEN, M. Polyamines and cytokinins in celery embryogenic cell cultures. **Plant Growth Regul.**, v. 12, p. 245-254, 1993.
- DAVIDE, A.C.; CARVALHO, L.R.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARÃES, R.M. Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família Lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. **Cerne**, v. 9, p. 29-35, 2003.
- DE TULIO, M.C.; ARRIGONI, O. The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. **Seed Sci. Res.**, v. 13, p. 249-260, 2003.
- DEBEAUJON, I.; KOORNNEEF, M. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both testa characteristics and embryonic abscisic acid. **Plant Physiol.**, v. 122, p. 415-424, 2000.
- DELL'AQUILA, A. Protein patterns, characterized by computer image analysis, of lentil embryo axes germinating under salt stress. **Biol. Plant.**, v. 28, p. 237-242, 2004.
- DIAS, L.L.C.; FLOH, E.I.S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Proteômica comparativa aplicada a cultura de tecidos. **Rev. Bras. Hort. Orn.**, v. 13, p. 2002-2008, 2007.
- DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; PIERUZZI, F.P.; FLOH, E.I.S. Polyamines, amino acids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. **Seed Sci. Technol.**, v. 37, p. 42-51, 2009.
- DODEMAN, V.L.; DUVREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **J. Exp. Bot.**, v. 48, p. 1493-1509, 1997.
- DOMOKI, M.; GYORGYEY, J.; BIRÓ, J.; PASTERNAK, T.P.; ZVARA, A.; BOTTKA, S.; PASKÁS, L.G.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1759, p. 543-551, 2006.
- DURZAN, D.J.; CHALUPA, V. Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (*Pinus banksiana*). Changes in free arginine and reactive compounds during callus growth and in germinating seedlings of similar genetic origin. **Can. J. Bot.**, v. 54, p. 468-482, 1976.

EL MESKAOUI, A.; DESJARDINS, Y.; TREMBLAY, F.M. Kinetics of ethylene biosynthesis and its effects during maturation of white somatic embryos. **Physiol. Plant.**, v. 109, p. 333-342, 2006.

ETIENNE, P.; PETITOT, A.S.; HOUOT, V.; BLEIN, J.P.; SUTY, L. Induction of *tc17*, a gene encoding a β -subunit of proteasome, in tobacco plants treated with elicitors, salicylic acid or hydrogen peroxide. **FEBS Lett.**, v. 466, p. 213-218, 2000.

FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E. FERNIE, A.R.; GALILI, G. *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. **Plant Physiol.**, v. 142, p. 839-854, 2006.

FARIA, J.M.R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds.** Ph.D. Thesis - Wageningen Universiteit, Netherlands, 2004.

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L.; ROCK, C.D. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. **Plant Cell.**, v. 14, p. S15-S45, 2002.

FINKELSTEIN, R.; REEVES, W.; ARIIZUMI, T.; STEBER, C. Molecular aspects of seed dormancy. **Ann. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 387-415, 2008.

FINNIE, C.; MELCHIOR, S.; ROEPSTORFF, P.; SVENSSON, B. Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. **Plant Physiol.**, v. 129, p. 1308-1319, 2002.

FINNIE, C.; MAEDA, K.; ØSTEGAARD, O.; BAK-JENSEN, K.S.; LARSEN, J.; SVENSSON, B. Aspects of the barley seed proteome during development and germination. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 32, p. 517-519, 2004.

FLORES, E.M. Seed Biology. In: VOZZO, J.A. (Ed.). **Tropical Tree Seed Manual.** Washington DC: USDA Forest Service, 2003.

FONSECA, S.C.L.; FREIRE, H.B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, v. 62, p. 297-303, 2003.

FORWARD, B.S.; OSUSKY, M.; MISRA, S. The Douglas-fir BiP promoter is functional in *Arabidopsis* and responds to wounding. **Planta**, v. 215, p. 569-576, 2002.

FRANK, A.; PEVZNER, P. P. PepNovo: *De novo* peptide sequencing via probabilistic network modeling. **Anal. Chem.**, v. 77, p. 964-973, 2005.

FU, Q.; WANG, B.C.; JIN, X.; BING, H.; HAN, P.; WEI, K.; ZHANG, X.; ZHU, Y. Proteomic analysis and extensive protein identification from dry, germinating *Arabidopsis* seeds and young seedlings. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, p. 650-660, 2005.

FUNASAKI, M. **Estrutura, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundários de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae)** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GALLARDO, M.; BUENO, M.; ANGOSTO, T.; GALLARDO, E.; MATILLA, A.J. Free polyamines in *Cicer arietinum* seeds during the onset of germination. **Phytochemistry**, v. 31, p. 2283-2287, 1992.

GALLARDO, K.; JOB, C.; GROOT, S.P.C.; PUYPE, M.; DEMOL, H.; VANDERKERCKHOVE, J.; JOB, D. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. **Plant Physiol.**, v. 126, p. 835-846, 2001.

GALLARDO, K.; JOB, C.; GROOT, S.P.C.; PUYPE, M.; DEMOL, H.; VANDEKERCKHOVE, J.; JOB, D. Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth. **Physiol. Plant.**, v. 116, p. 238-247, 2002.

GALLARDO, K.; SIGNOR, C.; VANDEKERCKHOVE, J.I. THOMPSON, R.D.; BURSTIN, J. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic process related to reserve accumulation. **Plant Physiol.**, v. 133, p. 664-682, 2003.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. **Exp. Cell Res.**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GARCIA-MARTIN, G.; MANZANERA, J.A.; GONZALEZ-BENITO, M.E. Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 80, p. 171-177, 2005.

GARCIARRUBIO, A.; LEGARIA, J.P.; COVARRUBIAS, A.A. Absciscic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. **Planta**, v. 203, p. 182-187, 1997.

GARELLO, G.; BARTHE, P.; BONELLI, M.; BIANCO-TRINCHANT, J.; BIANCO, J.; PAGE-DEGIVRY, M.L. Absciscic acid regulated responses of dormant and non-dormant embryos of *Helianthus annuus*: role of ABA-inducible proteins. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38, p. 473-482, 2000.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant**, v. 32, p. 272-289, 1996.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; FAIVRE-RAMPANT, O.; CREVCCOVUR, M.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; DOMMES, J. Changing concepts in plant hormone action. **In Vitro Cell Dev. Biol., Plant**, v. 39, p. 85-106, 2003.

GAWRONSKA, H.; BURZA, W.; BOLESTA, E.; MALEPSZY D. Zygotic and somatic embryos of cucumber (*Cucumis sativus* L.) substantially differ in their levels of absciscic acid. **Plant Sci.**, v. 157, p. 129-137, 2000.

GLEVAREC, G.; BOUTON, S.; JASPARD, E.; RIOU, M.; CLIQUET, J.; SUZUKI, A.; LILMAMI, A.M. Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. **Planta**, v. 219, p. 286-297, 2004.

GLÓRIA, M.B.A.; TAVARES-NETO, J.; LABANCA, R.A. Influence of cultivar and germination on bioactive amines in soybeans (*Glycine max* L. Merrill). **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 7480-7485, 2005.

GORBATENKO, O.; HAKMAN, I. Desiccation-tolerant somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets. **Int. J. Plant Sci.**, v. 162, p. 1211-1218, 2001.

GRIGA, M.; HORACEK, J.; KLENOTICOVA, H. Proteins patterns associated with *Pisum sativum* somatic embryogenesis. **Biol. Plant.**, v. 51, p. 201-211, 2007.

GROPPIA, M.D.; BENAVIDES, M.P. Polyamines and abiotic stress: recent advances. **Amino Acids**, v. 34, p. 35-45, 2008.

GUMILEVSKAYA, N.A.; AZARKOVICH, M.I. Physiological and biochemical characteristics of the recalcitrant seeds having dormancy: a review. **Appl. Biochem. Micro.**, v. 43, p. 332-340, 2007.

GUTIERREZ, L.; WUYTSWINKEL, O.V.; CASTELAIN, M.; BELLINI, C. Combined networks regulating seed maturation. **Trends Plant Sci.**, v. 12, p. 294-300, 2007.

GUTMANN, M.; VON ADERKAS, P.; LABEL, P.; LELU, M. Effects of absciscic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. **J. Exp. Bot.**, v. 47, p. 1905-1917, 1996.

HABERMANN, B.; OEGEMA, J.; SUNYAEV, S.; SHEVCHENKO, A. The power and the limitations of cross-species protein identification by mass spectrometry driven sequence similarity searches. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 3, p. 238-249, 2004.

HAJDUCH, M.; GANAPATHY, A.; STEIN, J.W.; THELEN, J.J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. **Plant Physiol.**, v. 137, p. 1397-1419, 2005.

HAKMAN, I. 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.**, v. 87, p. 148-159, 1993.

HANAI, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; PAULA, F.M.; FUNGARO, M.H.P.; FLOH, E.I.S. Methylation patterns revealed by MSAP in genetically stable somatic embryogenesis cultures of *Ocotea catharinensis*. **In Vitro Cell Dev., Plant**, 2009. In press.

HANASHIRO, I.; ITOH, K.; KURATOMI, Y.; YAMAZAKI, M.; IGARASHI, T.; MATSUGASAKO, J.I.; TAKEDA, Y. Granule-bound starch synthase I is responsible for biosynthesis of extra-long unit chains of amylopectin in rice. **Plant Cell Physiol.**, v. 49, p. 925-933, 2008.

HAUSMAN, J.F.; KEVERS, C.; EVERS, D.; GASPAR, T. Conversion of putrescine in to aminobutyric acid, an essential pathway for root formation by polar shoots in vitro. *In*: ALTMAN, A.; WAISEL, Y. (Eds.) **Biology of Root Formation and Development**. New York: Plenum Press., 1997.

HATANO, K.; SHIMADA, T.; HIRAIWA, N.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. A rapid increase in the level of Binding Protein (BiP) is accompanied by synthesis and degradation of storage proteins in pumpkin cotyledons. **Plant Cell Physiol.**, v. 38, p. 344-351, 1997.

HEAZLEWOOD, J.L.; MILLAR, A.H. Integrated plant proteomics – putting green genomes to work. **Funct. Plant Biol.**, v. 30, p. 471-482, 2003.

HERNÁNDEZ-SEBASTIA, C.; MARSOLAIS, F.; SARAVITZ, C.; ISRAEL, D.; DEWEY, R.E.; HUBER, S.C. Free amino acid profiles suggest a possible role for asparagines in the control of storage-product accumulation in developing seeds of low- and high-protein soybean lines. **J. Exp. Bot.**, v. 56, p. 1951-1963, 2005.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINIK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Sci.**, v. 6, p. 431-438, 2001.

HOLDSWORTH, M.J.; BENTSINK, L.; SOPPE, W.J.J. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. **New Phytol.**, v. 179, p. 33-54, 2008.

HVOSLEF-EIDE, A.K.; CORKE, F.M.K. Embryogenesis specific protein changes in birch suspension cultures. **Plant Cell, Tissue Organ Cult.**, v. 51, p. 35-41, 1997.

IKEDA, M.; KAMADA, H. Comparison of molecular mechanisms of somatic and zygotic embryogenesis. *In*: MUJIB, A.; SAMAJ, J. (Eds.) **Plant Cell Monographs: Somatic embryogenesis**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2005.

IKEDA, M.; UMEHARA, M.; KAMADA, H. Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. **Plant Biotechnol.**, v. 23, p. 153-161, 2006.

INGRAM, J.; BARTELS, A. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 47, p. 337-403, 1996.

JAIN, S.M.; ISHII, K. Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. *In*: MANTELL, S.H.; BRUNS, S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (Ed.). **Recent advances in biotechnology for conservation and management**. Stockholm: International Foundation for Science, 1998, v.5

JIMÉNEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regul.**, v. 47, p. 91-110, 2005.

JORRIN, J.V.; RUBIALES, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECOBERT, G.; MALDONADO, A.; CASTILLEJO, M.A.; CURTO, M. Proteomics: a promising approach to study biotic interactions in legumes. A review. **Euphytica**, v. 147, p. 37-47, 2006.

JOY, I.V.; VOGEL, I.I.; THORPE, T.A. Inorganic nitrogen metabolism in embryogenic white spruce cultures. A nitrogen 14-15NMR study. **J. Plant Physiol.**, v. 151, p. 306-315, 1997.

KAKKAR, R.K.; NAGAR, P.K.; AHUJA, P.S.; RAI, V.K. Polyamines and plant morphogenesis. **Physiol. Plant.**, v. 43, p. 1-11, 2000.

KARSSSEN, C.M.; SWAN, D.L.C.B.; BREEKLAND, A.E.; KOORNNEEF, M. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Planta**, v. 157, p. 158-165, 1983.

KEPCZYNSKA, E.; ZIELINSKA, S. Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryos regeneration by gibberellin A3 and abscisic acid in relation to starch content and α -amylase activity. **Plant Growth Regul.**, v. 49, p. 209-217, 2006.

KERMODE, A.R. Role of abscisic acid in seed dormancy. **J. Plant Growth Regul.**, v. 24, p. 319-344, 2005.

KLECZOWSKI, L.A. Back to the drawing board: redefining starch synthesis in cereals. **Trends Plant Sci.**, v. 1, p. 363-364, 1996.

KLIMASZEWSKA, K.; MORENCY, F.; JONES-OVERTON, C.; COOKE, J. Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobes* and in somatic embryos from different maturation treatments. **Physiol. Plant.**, v. 121, p. 682-690, 2004.

KONG, L.; ATTREE, S.M.; FOWKE, L.C. Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. **Physiol. Plant.**, v. 101, p. 23-30, 1997.

KOORNNEEF, M.; BENTSINK, L.; HILHORST, H. Seed dormancy and germination. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 5, p. 33-36, 2002.

KORLACH, J.; ZOGLAUER, K. Developmental patterns during direct somatic embryogenesis in protoplast cultures of European larch (*Larix deciduas* Mill.). **Plant Cell Rep.**, v. 15, p. 242-247, 1995.

KORMUTÁK, A.; SALAJ, T.; MATUSAVÁ, R.; VOOKOVÁ, B. Biochemistry of zygotic and somatic embryogenesis in silver fir (*Abies alba* Mill.). **Acta Biol. Crac.**, v. 45, p. 59-62, 2003.

KUSANO, T.; BERBERICH, T.; TATEDA, C.; TAKAHASHI, Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. **Planta**, v. 228, p. 367-381, 2008.

KUZNETSOV, V.; RADYUKINA, N.L.; SHEVYAKOVA, N.I. Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. **Russ. J. Plant Physiol.**, v. 53, p. 583-604, 2006.

LABEL, P.; LELU, M. Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix leptoeuropaea*) somatic embryos. **Physiol Plant.**, v. 109, p. 456-462, 2000.

LAI, F.; SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Glutamine enhances storage protein synthesis in *Medicago sativa* L. somatic embryos. **Plant Sci.**, v. 87, p. 69-77, 1992.

LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.; SCHULTZ, C.; MELO-OLIVEIRA, R.; TJADEN, G.; OLIVEIRA, I.; HGAI, N.; HSIEH, M.H.; CORRUZZI, G. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 887-898, 1995.

LEA, P.J.; SODEK, L.; PARRY, M.A.J.; SHEWRY, P.R.; HALFORD, N.G. Asparagine in plants. **Ann. Appl. Biol.**, v. 150, p. 1-26, 2007.

LEFEBVRE, V.; NORTH, H.; FREY, A.; SOTTA, B.; SEO, M.; OKAMOTO, M.; NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Functional analysis of *Arabidopsis* NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. **Plant J.**, v. 45, p. 309-319, 2006.

LI, H.C.; CHUANG, K.; HENDERSON, J.T.; RIDER JR, S.D.; BAI, Y.; ZHANG, H.; FOUNTAIN, M.; GERBER, J.; OGAS, J. PICKLE acts during germination to repress expression of embryonic traits. **Plant J.**, v. 44, p. 1010-1022, 2005.

LIAO, Y.K.; LIAO, C.K.; HO, Y.L. Maturation of somatic embryos in two embryogenic cultures of *Picea morisonicola* Hayata as affected by alternation of endogenous IAA content. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 93, p. 257-268, 2008.

LIU, Z.B.; HAGEN, G.; GUILFOIYLE, T.J. A G-box binding protein from soybean binds to the E1 auxin response element in the soybean *GH3* promoter and contains a proline-rich repression domain. **Plant Physiol.**, v. 115, p. 397-407, 1997.

LJUNG, K.; OSTIN, A.; LIOUSSANE, L.; SANDBERG, G. Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 464-475, 2001.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Int. Plant Prop. Soc. Proc.**, v. 30, p. 421-427, 1981.

MACNICOL, P.K. Developmental changes in the free amino acid pool and total protein amino acids of pea cotyledons (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiol.**, v. 72, p. 492-497, 1983.

MADAKADZE, R.M.; KROCHKO, J.E.; SENARATNA, T. Identification and characterization of storage proteins in zygotic and somatic embryos of geranium (*Pelargonium x hortorum*). **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, v. 125, p. 525-529, 2000.

MANSFIELD, S.G.; BRIARTY, S.G. The dynamics of seedling and cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve mobilization. **Int. J. Plant Sci.**, v. 157, p. 280-295, 1996.

MARTINEZ, T.; CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; JORQUERA, L.; VIEITEZ, A.M. Germination and conversion of somatic embryos derived from mature *Quercus robur* trees: the effects of cold storage and thidiazuron. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v.95, p. 341-351, 2008.

MAURI, P.V.; MANZANERA, J.A. Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.). **In Vitro Cell Dev Biol., Plant**, v. 40, p. 495-498, 2004.

MERKLE, S.A.; PARROT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

MINOCHA, R.; DALE, R.S.; CATHIE, R.; STEELE, K.D.; MINOCHA, S.C. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. **Physiol. Plant.**, v. 105, p. 155-164, 1999.

MOON, H.; HILDEBRAND, D.F. Effects of proliferation, maturation, and desiccation methods on conversion of soybean somatic embryos. **In vitro Cell. Dev. Biol., Plant**, v. 39, p. 623-628, 2003.

MORAES, F.M.S. **Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae)**. Dissertação (Mestrado) -. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

- MOURA-COSTA, P.H.; VIANA, A.M.; MANTELL, S.H. *In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest tree of S. Brazil. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 35, p. 279-286, 1993.
- MOSER, J.R.; GARCIA, M.G.; VIANA, A.M. Establishment and growth of embryogenic suspension cultures of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue Organ Cult.**, v. 78, p. 37-42, 2004.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, C.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NAG, S.; SAHA, K.; CHAUXHEIRI, M.A. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. **J. Plant Growth Regul.**, v. 20, p. 182-194, 2001.
- NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 90, p. 1-8, 2007.
- NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Absciscic acid biosynthesis and metabolism. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 56, p. 165-185, 2005.
- NATARAJAN, S.; XU, C.; CARPENA, T.J.; GARRET, W.M. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. **Anal. Biochem.**, v. 342, p. 214-220, 2005.
- NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels – a systematic analysis. **Electrophoresis**, v. 6, p. 427-448, 1995.
- NEWTON, R.P.; BRENTON, A.G.; SMITH, C.J.; DUDLEY, E. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1449-1485, 2004.
- NOCTOR, G. Metabolic signaling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. **Plant Cell Environ.**, v. 29, p. 409-425, 2006.
- NUUTILA, A.M.; KURTEN, U.; KAUPPINEN, V. Optimization of sucrose and inorganic nitrogen concentrations for somatic embryogenesis of birch (*Betula pendula* Roth) callus cultures: a statistical approach. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 24, p. 73-77, 1991.
- OBROUCHEVA, N.V. Cell elongation as an inseparable component of growth in terrestrial plants. **Russ. J. Dev. Biol.**, v. 39, p. 13-24, 2008.
- OH, T.J.; WARTELL, R.M.; CAIRNEY, J.; PULLMAN, G.S. Evidence for stage-specific modulation of specific microRNAs (miRNAs) and miRNA processing components in zygotic embryo and femela gametophyte of loblolly pine (*Pinus taeda*). **New Phytol.**, v. 179, p. 67-80, 2008.
- O'HARA, P.; SLABAS, A.R.; FAWCETT, T. Fatty acid and lipid biosynthetic genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis. **Plant Physiol.**, v. 129, p. 310-320, 2002.
- OSBORNE, D.J. Biochemical control systems operating in the early hours of germination. **Can. J. Bot.**, v. 61, p. 3568-3577, 1983.
- PAPADAKIS, A.K.; PASCHALIDIS, K.A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Biosynthesis profile and endogenous titers of polyamines differ in totipotent and recalcitrant plant protoplasts. **Physiol. Plant.**, v. 125, p. 10-20, 2005.

- PASTORI, G.M.; KIDDLE, G.; ANTONIW, J.; BERNARD, S.; VELJOVIC-JOVANIC, S.; VERRIER, P.J.; NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. **Plant Cell**, v. 15, p. 939-951, 2003.
- PAWLOWSKI, T.A. Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: influence of abscisic and giberellic acids. **Proteomics**, v. 7, p. 2246-2257, 2007.
- PENFIELD, S.; JOSSE, E.M.; KANNANGARA, R.; GILDAY, A.D.; HALLIDAY, K.J.; GRAHAM, I.A. Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. **Curr. Biol.**, v. 15, p. 1998-2006, 2005.
- PERÁN-QUESADA, R.; SANCEZ-ROMERO, C.; BARCELÓ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. **Sci. Hortic.**, v. 102, p. 61-73, 2004.
- PEREZ-AMADOR, M.A.; LEON, J.; GREEN, P.J.; CARBONELL, J. Induction of the arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v. 130, p. 1454-1463, 2002.
- PESCADOR, R.; KERBAUY, G.B.; KRAUS, J.E.; FERREIRA, W.M.; GUERRA, M.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant**, v. 44, p. 289-299, 2008.
- PINTO, G.; PARK, Y.S.; SILVA, S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Factors affecting maintenance, proliferation, and germination of secondary somatic embryos of *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 95, p. 69-78, 2008.
- POGHOSYAN, Z.P.; GIANNOULIA, K.; KATINAKIS, P.; MURPHY, D.J.; HATZOPOULOS, P. Temporal and transient expression of olive enoyl-ACP reductase gene during flower and fruit development. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 43, p. 37-44, 2005.
- PRITCHARD, S.L.; CHARLTON, W.L.; BAKER, A.; GRAHAM, I.A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. **Plant J.**, v. 31, p. 639-647, 2002.
- PUGA-HERMIDA, M.I.; GALLARDO, M.; RODRIGUEZ-GACIO, M.C.; MATILLA, A.J. Polyamine contents, ethylene synthesis, and BrACO2 expression during turnip germination **Biol. Plant.**, v. 50, p. 574-580, 2006.
- PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E. Ascorbate and glutathione metabolism during development and desiccation of orthodox and recalcitrant seeds of the genus *Acer*. **Funct. Plant Biol.**, v. 34, p. 601-613, 2007.
- RADWANSKI, E.R. LAST, R.L. Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. **Plant Cell**, v. 7, p. 921-934, 1995.
- RAI, M.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. Effects of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). **Sci. Hortic.**, v. 117, p. 302-305, 2008.
- RAJJOU, L.; GALLARDO, K.; DEBEAUJON, I.; VANDERKERCKHOVE, J.; JOB, C.; JOC, D. The effect of α – amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. **Plant Physiol.**, v. 134, p. 1598-1613, 2004.
- RAMAKRISHNA, V.; RAO, P.R. Storage protein degradation in germinating Indian bean (*Dolichos lablab* L. var. *lignosus*) seeds. **Seed Sci. Technol.**, v. 34, p. 161-168, 2006.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Sci. Technol.**, v. 1, p. 499-514, 1973.

ROBERTS, J.K.M. Proteomics and a future generation of plant molecular biologists. **Plant Mol. Biol.**, v. 48, p.143-154, 2002.

ROCK, C.D.; QUATRANO, R.S. The role of hormones during seed development. In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

RODRIGUEZ, C.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; HERNANDEZ, A. Correlations between some nitrogen fractions, lysine, histidine, tyrosine, and ornithine contents during the germination of peas, beans, and lentils. **Food Chem.**, v. 108, p. 245-252, 2008.

ROSSIGNOL, M.; PELTIER, J.B.; MOCK, H.P.; MATROS, A.; MALDONADO, A.M.; JORRIN, J. Plant proteom analysis: a 2004 – 2006 update. **Proteomics**, v. 6, p. 5529-5548, 2006.

SALLABDROUZE, A.; FAUROBERT, M.; EL MAËTAOUI, M. Characterization of the developmental stages of cypress zygotic embryos by two-dimensional electrophoresis and by cytochemistry. **Physiol. Plant.**, v. 114, p. 608-618, 2002.

SÁNCHEZ-CORONADO, M.E.; COATES, R.; CASTRO-COLINA, L.; de BUEN, A.G.; PAEZ-VALENCIA, J.; BARRADAS, V.L.; HUANTE, P.; OROZCO-SEGOVIA, A. Improving seed germination and seedling growth of *Omphalea oleifera* (Euphorbiaceae) for restoration projects in tropical rain forests. **For. Ecol. Manage.**, v. 243, p. 144-155, 2007.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH, E.I.S. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 79, p. 53-61, 2004a.

SANTA-CATARINA, C.; MEYER, G.A.; MACEDO, J.; AMORIM, W.; VIANA, A.M. Repetitive somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae): effect of embryoid development stage, activated charcoal and dehydration. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 78, p. 55-62, 2004b.

SANTA-CATARINA, C. **Aspectos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos da embriogênese em *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae)**. Tese (Doutorado) - Biotecnologia (Interunidades), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; MARANHÃO, M.E.E.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. **Plant Growth Regul.**, v. 49, p. 237–247, 2006.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; SCHERER, G.F.E.; FLOH, E.I.S. Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 90, p. 93-101, 2007.

SARJALA, T.; HÄGGMAN, H.; ARONEN, T. Effect of exogenous polyamines and inhibitors of polyamine biosynthesis on growth and free polyamine contents of embryogenic Scots pine callus. **J Plant Physiol.**, v. 150, p. 597-602, 1997.

SATYA-NARAYAN, V.; NAIR, P.M. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. **Phytochemistry**, v. 26, p. 367-375, 1990.

SAVITHRAMMA, N.; SWAMY, P.M. Quantitative changes of polyamines and activity of ADC in developing and germinating seeds of groundnut (*Arachis hypogea*) genotypes. **Ann. Bot.**, v. 64, p. 337-341, 1989.

SCHIMIDT, T.; EWALD, A.; SEYRING, M.; HOHE, A. Comparative analysis of cell cycle events in zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* indicates strong resemblance of somatic embryos to recalcitrant seed. **Plant Cell Rep.**, v. 25, p. 643-650, 2006.

SERRAJ, R.; SHELP, B.J.; SINCLAIR, T.R. Accumulation of γ -aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress. **Physiol Plant.**, v.102, p. 79-86, 1998.

SGHAIER, B.; BAHLOUL, M.; BOUZID, R.G.; DRIRA, N. Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: Comparative study. **Sci. Hortic.**, v. 116, p. 169-175, 2008.

SHEORAN, I.S.; OLSON, D.J.H.; ROSS, A.R.S.; SAWHNEY, V.K. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. **Proteomics**, v. 5; p. 3752-3764, 2005.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 945-956, 1995.

SHOEB, F.; YADAV, J.S.; BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Sci.**, v. 160, p. 1229–1235, 2001.

SILVA, A. **Padrão de florescimento e frutificação, caracterização de diásporos e germinação de sementes de canela-preta (*Ocotea catharinensis* Mez.)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 1997.

SILVA, A.; AGUIAR, I.B.; DAMIÃO FILHO, C.F.; DURIGAN, J.F. Caracterização morfológica e química de frutos e sementes de canela-preta (*Ocotea catharinensis* Mez-Lauraceae). **Rev. Inst. Florestal**, v. 10, p. 217-228, 1998.

SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; GUERRA, M.P. 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 Organ Cult.**, v. 69, p. 233-249, 2004a.

SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regul.**, v. 44, p. 147-156, 2004b.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N.N.; SCHERER, G.F.E.; HANDRO, W.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Sci.**, v. 171, p. 91-98, 2006.

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. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. **Biol. Plant.**, v. 52, p. 101-104, 2008.

SKYLAS, D.J.; MACKINTOSH, J.A.; CORDWELL, S.J.; BASSEAL, D.J.; WALSH, B.J.; HARRY, J.; BLUMENTHAL, C.; COPELAND, L.; WRIGLEY, C.W.; RATHMELL, W. Proteome approach to the characterization of protein composition in the developing and mature wheat-grain endosperm. **J. Cereal Sci.**, v. 32, p.169-188, 2000.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry the principles and practice of statistics in biological research**. New York: Freeman, 1995

SONG, J.; NADA, K.; TACHIBANA, S. The early increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is essential for the normal germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pollen. **Plant Sci.**, v. 161, p. 507-515, 2001.

STASOLLA, C.; YEUNG, E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 74, p. 15-35, 2003.

STASOLLA, C.; KONG, L.; YEUNG, C.; THORPE, T.A. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. **In Vitro Cell Dev Biol., Plant**, v. 38, p. 93-105, 2002.

STASOLLA, C.; VAN ZYL, L.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; WENBIN, L.; SEDEROFF, R.R. The effects of polyethyleneglycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. **Plant Physiol.**, v. 131, p. 49-60, 2003.

STENSBALLE, A.; HALD, S.; BAUW, G.; BLENNOW, A.; WELINDER, K.G. The amyloplast proteome of potato tuber. **FEBS J.**, v. 275, p. 1723-1741, 2008.

STEPANSKY, A.; LES, H.; ANGELOVICI, R.; AHARON, R.; ZHU, X.; GALILI, G. Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. **Amino Acids**, v. 30, p. 121-125, 2006.

STURGES, H.A. The choice of as class interval. **J. Am. Stat. Assoc.**, v. 21, p. 65-66, 1926.

SUÁREZ, M.F.; BOZHKO, P.V. **Plant Embryogenesis**. Canadá: Ed. Humana Press, 2008.

TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Can. J. Bot.**, v. 69, p. 1873-1899, 1991.

TERESO, S.; ZOGLAUER, K.; MILHINHOS, A.; MIGUEL, C.; OLIVEIRA, M.M. Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. **Tree Physiol.**, v. 27, p. 661-669, 2007.

THIBAUD-NISSEN, F.; SHEALY, R.T.; KHANNA, A.; VODKIN, L.O. Clustering of microarray data reveals transcripts patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. **Plant Physiol.**, v. 132, p. 118-136, 2003.

TUNNACLIFFE, A.; WISE, M.J. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Naturwissenschaften**, v. 24, p.345-351, 2007.

TWEDDLE, J.C.; DICKIE, J.B.; BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **J. Ecol.**, v. 91, p. 294-304, 2003.

UTOMO, H.S.; WENWFRIDA, I.; MECHE, M.M.; NASH, J.L. Synthetic seed as a potential direct delivery system of mass produced somatic embryos in the coastal marsh plant smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*). **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 92, p. 281-291, 2008.

VAHDATI, K.; BAYAT, S.; EBRAHIMZADEH, H.; JARITEH, M.; MIRMASOUMI, M. Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 93, p. 163-171, 2008.

VAN WIJK, K. Challenges and prospects of plant proteomics. **Plant Physiol.**, v. 126, p. 501-508, 2001.

VÁSQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 24, p. 69-87, 1993.

VÁSQUEZ-RAMOS, J.M.; SÁNCHEZ, M.P. The cell cycle and seed germination. **Seed Sci. Res.**, v. 13, p. 113-130, 2003.

VENSEL, W.H.; TANAKA, C.K.; CAI, N.; WONG, J.H.; BUCHANAN, B.B.; HURKMAN, W.J. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. **Proteomics**, v. 5, p. 1594-1611, 2005.

VIANA, A.M. Somatic embryogenesis in *Ocotea catharinensis*. In: BRUNS, S.; MANTELL, S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (Ed.) **Recent advances in biotechnology for conservation and management**. Estocolmo: International Foundation for Science,. 1998.

- VIAN, A.M.; MAZZA, M.C.; MANTELL, S.H.. Application of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian rain forests. In: BENSON, E.E. (Ed.). **Plant Conservation biotechnology**. London,UK: Taylor and Francis, 1999
- VIANA, A.M.; MANTELL, H.. Somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: an endangered tree of the Mata Atlântica (South Brazil). In: JAIN, S.; GUPTA, P.; NEWTON, R. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Publishers, 1999. v. 5.
- VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 69, p. 233-249, 2002.
- VON WETTSTEIN, D.; GOUGH, S.; KANNANGARA, C.G. Chorophyll biosynthesis. **Plant Cell.**, v. 7, p. 1039-1057, 1995.
- WALDEN, R.; CORDEIRO, A.; TIBURCIO, A.F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. **Plant Physiol.**, v. 113, p.1009-1013, 1997.
- WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, W. Sugar import and metabolism during seed development. **Trends Plant Sci.**, v. 2, p. 169-174, 1997.
- WEIGELT, K.; KUSTER, H.; RADCHUK, R.; MULLER, M.; WEICHERT, H.; FAIT, A.; FERNIE, A.R.; SAALBACH, I.; WEBER, H. Increasing amino acid supply in pea embryos reveals specific interactions of N and C metabolism, and highlights the importance of mitochondrial metabolism. **Plant J.**, v. 55, p. 909-926, 2008.
- WINKELMANN, T.; HEINTZ, D.; DORSSELAER, A.V.; SEREK, M.; BRAUN, H.P. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. Reveal new insights into seed and germination physiology. **Planta**, v. 224, p. 508-519, 2006.
- WONG, P.; ABUBAKAR, S. Post-germination changes in *Hevea brasiliensis* seeds proteome. **Plant Sci.**, v. 169, p. 303-311, 2005.
- YADAV, J.S.; RAJAM, M.V.. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 617-625, 1998.
- YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. **In vitro Embryogenesis in Plants**. UK: Springer, 1995.
- ZHU, X.; GALILI, G. Lysine metabolism is concurrently regulated by synthesis and catabolism in both reproductive and vegetative tissues. **Plant Physiol.**, v. 135, p. 129-136, 2004.
- ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plant. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.
- ZIVY, M.; VIENNE, D. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. **Plant Mol. Biol.**, v. 44, p. 575-580, 2000.