Leonardo Jo

**ESTABELECIMENTO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS
PARA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA
EM *Araucaria angustifolia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2012

Leonardo Jo

**ESTABELECIMENTO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS
PARA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA
EM *Araucaria angustifolia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Eny Iochevet Segal Floh

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Jo, Leonardo.

Estabelecimento de marcadores bioquímicos para embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* / Leonardo Jo. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Eny lochevet Segal Floh.

Dissertação (Mestrado) – 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, bioquímica e biologia molecular de plantas.

Versão do título para o inglês: Establishment of biochemical markers of *Araucaria angustifolia* somatic embryogenesis.

1. *Araucaria angustifolia* 2. Embriogênese somática 3. Poliaminas
4. SERK1 5. PP2C 6. Proteômica I. Floh, Eny Lochevet Segal II.
Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan.
Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB0136/2012

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

---

Candidato(a):   Leonardo Jo.

Título da Dissertação: Estabelecimento de marcadores bioquímicos para embriogênese somática em *Araucaria angustifolia*.

Orientador(a):   Eny Iochet Segal Floh.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

(   ) **Aprovado(a)**

(   ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**AOS MEUS QUERIDOS PAIS,
DANIEL E ESTELA**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu sentimento de gratidão a todos que não pouparam esforços para que eu pudesse vivenciar esta maravilhosa experiência de aprendizado. Não me sinto merecedor e sim abençoado.

Por este motivo, gostaria de agradecer:

A Deus por sua justiça, graça e sabedoria.

Aos meus pais, Daniel Kum Suk Jo e Estela Yun Shim Im, e irmãos, Daniel Jo e Fernanda Jo, pelo incondicional amor, carinho e apoio em todas as etapas da minha vida.

A Prof. Eny I. S. Floh, que apesar da minha inexperiência, me aceitou de braços abertos em seu laboratório. Sua confiança e incentivo tornaram possível a superação de todos os obstáculos enfrentados, desde o ingresso no mestrado até a conclusão final deste trabalho, não passando despercebidas a enorme paciência e compreensão necessárias para tolerar as minhas MUITAS falhas. Serei eternamente grato pela oportunidade e confiança.

Ao grande amigo André Luis W. dos Santos, pelo auxílio, ensinamentos teóricos e práticos, broncas e conversas infindáveis. A conclusão deste trabalho só foi possível devido a sua participação integral em todas as etapas deste projeto.

Aos novos e antigos integrantes do BIOCEL (IB-USP), Fernanda Pieruzzi, Julia Andrade, Leonardo Dias, Vanildo Silveira, Claudete Santa-Catarina, Ludmila Fim, Caroline Arcanjo, Ana Carolina, Samila Lopes, Natália Piscirilo e Roberta Alvarez, pela grande amizade construída ao longo dos últimos anos e excelente convivência.

As técnicas Amanda Macedo e Carmem Silva por sempre estarem dispostas em me ajudar nas muitas horas de desespero.

A Prof. Magdalena Rossi, por abrir as portas do laboratório de Genética Molecular de Plantas (IB-USP) para o desenvolvimento das análises moleculares. Seus conselhos foram muito importantes para a execução deste trabalho.

As integrantes do laboratório de Genética Molecular de Plantas (IB-USP), Fabiana, Juliana, Junia e Sylvia, por serem sempre muito prestativas sempre que precisei de algo.

Ao Prof. Carlos Labate, por abrir as portas do laboratório Max Feffer (ESALQ-USP) para a identificação das proteínas e à Monica Labate pelo auxílio no processamento das amostras para análise de espectrometria de massas.

A Kelly Simões pela agradável companhia, conselhos e caronas em nossas muitas viagens à ESALQ.

Ao Tiago Santana Balbuena, por seus ensinamentos e auxílio nas identificações das proteínas.

A Suzi pelo seu bom-humor contagiante, imprescindível em todos os dias.

A Universidade de São Paulo pela oportunidade e estrutura necessárias para realização deste mestrado.

A CAPES pela bolsa concedida.

As agências de fomento: CAPES, CNPq, FAPESP e Pétrobras pelo apoio dado ao nosso grupo de pesquisa.

Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação em Biotecnologia, Fábiana, Eliana e Marcus, pelo auxílio em todos os momentos, até naqueles mais críticos.

Aos amigos de graduação, pelas MUITAS brincadeiras e risadas.

Ao Pastor José Kim e sua esposa Ester Lee, que me guiaram e me deram forças para continuar.

A todos vocês,
MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Jo L. Estabelecimento de marcadores bioquímicos para embriogênese somática em *Araucaria angustifolia*. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A *Araucaria angustifolia* é a única conífera nativa com importância econômica no Brasil. Recentemente, em função da sua intensa exploração, a espécie foi incluída na lista oficial de espécies de plantas ameaçadas de extinção. A embriogênese somática, ou seja, a produção assexuada de embriões *in vitro*, é considerada como uma das ferramentas biotecnológicas mais promissoras na área de biotecnologia de plantas, abrindo perspectivas para a propagação clonal massal de genótipos elite e a conservação de germoplasma de espécies arbóreas nativas. Uma das dificuldades nos estudos de padronização e aperfeiçoamento dos protocolos de embriogênese somática é a alta variação das respostas na dependência dos genótipos utilizados, quando cultivados *in vitro*. Neste sentido, é altamente desejável a identificação de marcadores, que possam ser utilizados, para a seleção de genótipos aptos ao desenvolvimento do embrião somático (ES). Frequentemente a morfologia dos ESs tem sido utilizada para a seleção dos diferentes genótipos. Entretanto, há a necessidade do estabelecimento de novos tipos de marcadores que propiciem a detecção dos vários genótipos competentes à embriogênese somática. O presente trabalho teve como objetivo estudar e identificar marcadores bioquímicos e moleculares associados à competência para embriogênese somática em *A. angustifolia*. Para tanto, foram estudados, para genótipos com diferentes potenciais embriogênicos, os seguintes candidatos a marcadores: poliaminas (PAs) livres e conjugadas, expressão relativa dos genes *AaSERK1* e *AaPP2C*, e análise proteômica. A partir do monitoramento e da evolução ao longo do processo de ES, foi possível classificar os genótipos em três grupos distintos: a) genótipos altamente responsivos, b) genótipos responsivos e c) genótipos bloqueados. Com relação aos parâmetros avaliados foi observado que: a) a razão putrescina/espermidina pode ser considerada como um marcador bioquímico do potencial embriogênico neste sistema; b) uma maior expressão relativa do gene *AaSERK1* ocorre nas culturas embriogênicas (CEs) do genótipo altamente responsivo, quando comparado ao genótipo bloqueado; c) não ocorreu expressão diferencial do gene *AaPP2C*, independentemente do genótipo; d) a presença de proteínas relacionadas com o metabolismo de PAs (SAM sintase), biossíntese de proteínas (FE-II) e do metabolismo energético (subunidade beta da ATPse mitocondrial), ocorrem exclusivamente nas CEs do genótipo responsivo; e) no genótipo bloqueado, ocorreu a presença exclusiva da subunidade F da NADH desidrogenase, uma proteína relacionada com o mecanismo de morte celular programada (MCP). O presente trabalho propõe a utilização dos parâmetros avaliados como possíveis marcadores bioquímicos e moleculares do potencial para a embriogênese somática no sistema *A. angustifolia*.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*. Embriogênese somática. Poliaminas. *SERK1*. *PP2C*. Proteômica.

ABSTRACT

Jo L. Establishment of biochemical markers of *Araucaria angustifolia* somatic embryogenesis. [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

The *Araucaria angustifolia* is the only native conifer species with economical importance in Brazil. Recently, due to its intense exploration, the species was included in the official list of endangered plant species. Somatic embryogenesis, i.e., *in vitro* asexual production of embryos is considered one of the most promising biotechnological tools in the area of plant biotechnology, allowing the mass clonal propagation of elite genotypes and germoplasm conservation of native trees species. One of the difficulties in the optimization studies of protocols for somatic embryogenesis, is the high variability in the responses among the genotypes used *in vitro*. In this sense, the identification of markers that could be used in the early selection of genotypes which can develop somatic embryos (ESs) is highly desirable. Frequently, the ES's morphology can be used in the selection of competent. However, there is a need to establish a new type of markers that could allow the detection of somatic embryogenesis competent genotypes. The main objective of the present work is to study and identify biochemical and molecular markers associated with the competence for somatic embryogenesis in *A. angustifolia*. We analyzed and compared the following possible markers in genotypes with different embryogenic capabilities: free and conjugated polyamines (PAs), relative gene expression of *AaSERK1* and *AaPP2C*, and proteomic analysis. By monitoring the evolution of the ES during the somatic embryogenic process, it was possible to classify the genotypes into three distinct groups: a) highly responsive genotypes, b) responsive genotypes, c) blocked genotypes. The biochemical and molecular parameters evaluation showed the following: a) the putrescine/espermidina ration can be used as a biochemical marker of the embryogenic potential; b) a higher relative expression of the *AaSERK1* gene in the embryogenic cultures (CEs) of the highly responsible genotype when compared to the blocked genotype; c) Non differential expression of the *AaPP2C* gene, regardless of the genotype; d) The exclusive presence in the CEs of the responsive genotypes of proteins related to: PAs synthesis (SAM synthase), protein synthesis (FA-II) and energetic metabolism (beta subunit of mitochondrial ATPase); e) In the blocked genotype, we observed the exclusive presence of an F subunit of the NADH dehydrogenase, a protein related to the mechanism of programmed cell death (MCP). The present work suggests the utilization of the evaluated parameters as possible biochemical and molecular markers of the embryogenic potential in *A. angustifolia*.

Keywords: *Araucaria angustifolia*. Somatic embryogenesis. Polyamines. SERK1. PP2C. Proteomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da modulação da embriogênese somática em coníferas.	22
Figura 2 - Esquema da variação do rendimento dependente do genótipo, de cada etapa do processo de embriogênese somática de coníferas.	24
Figura 3 - Esquema de biossíntese de poliaminas e etileno.....	26
Figura 4 - Distribuição geográfica da espécie <i>A. angustifolia</i>	32
Figura 5 - Etapas do desenvolvimento do embrião somático em culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> . Caracterização dos genótipos conforme o potencial embriogênico ao longo do desenvolvimento do embrião somático.	41
Quadro 1 - Iniciadores utilizados para reações de qRT-PCR dos genes <i>AaSERK1</i> , <i>AaPP2C</i> e <i>UBI1</i>	44
Figura 6 - Delineamento experimental utilizado para estabelecimento de marcadores bioquímicos e moleculares para embriogênese somática em <i>A. angustifolia</i>	49
Figura 7 - Aspectos morfológicos das culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> durante a etapa de proliferação.....	51
Figura 8 - Culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> cultivadas em meio de maturação.....	53
Figura 9 - Conteúdo de poliaminas totais (μg / mg massa fresca) em culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.....	56
Figura 10 - Razão Put/Spd total de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.	58
Figura 11 - Expressão relativa do gene <i>AaSERK1</i> durante a fase de proliferação de culturas embriogênicas <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.....	59
Figura 12 - Expressão relativa do gene <i>AaPP2C</i> durante a fase de proliferação de culturas embriogênicas <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.....	60
Figura 13 - Conteúdo protéico total (μg /mg massa fresca) de culturas embriogênicas <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.....	61

Figura 14 - Géis 2D de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos corados em comassie brilliant blue.....	62
Figura 15 - Porcentagem de “spots” detectados nos mapas 2D, de acordo com a massa molecular relativa (kDa), de culturas embriogênicas de genótipo de <i>A. angustifolia</i> com diferentes potenciais embriogênicos.....	63
Figura 16 - Mapas 2D de proteínas detectadas em culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> apresentando embriões somáticos iniciais em sua superfície.....	51
Tabela 2 - Frequência de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> apresentando embriões somáticos globulares na superfície durante a maturação.....	54
Tabela 3 - Estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de <i>A. angustifolia</i> identificados na superfície das culturas embriogênicas dos genótipos MSG01 e R1003.....	54
Tabela 4 - Conteúdo (μg / mg massa fresca) de putrescina (Put) livre, conjugada e total de culturas embriogênicas <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.....	56
Tabela 5 - Conteúdo ($\mu\text{g}/\text{mg}$ massa fresca) de espermidina (Spd) livre, conjugada e total de culturas embriogênicas <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.....	57
Tabela 6 - Conteúdo (μg / mg massa fresca) de espermina (Spm) livre, conjugada e total de culturas embriogênicas <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.....	57
Tabela 7 - Número de “spots” detectados em géis 2D de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.....	63
Tabela 8 - Proteínas identificadas a partir de “spots” presentes exclusivamente em géis 2D de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> do genótipo responsivo (R). ..	65
Tabela 9 - Proteínas identificadas a partir de “spots” presentes exclusivamente em géis 2D de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> do genótipo bloqueado B1	66
Tabela 10 - Proteínas identificadas a partir de “spots”, com variação significativa de abundância ($p \leq 0,05$), presentes em géis 2D de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> , de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.	67
Tabela 11 - Resultado dos alinhamentos via BLASTP, realizados a partir das sequências obtidas nas identificações das proteínas presentes nos “spots” 10, 15 e 45 da tabela 10.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DE - eletroforese bidimensional

ABA - ácido abscísico

ABI - “ABA insensitive”

ACC - 1-aminociclopropano-1-ácido-carboxílico

ACN - acetonitrila

ADC - arginina descarboxilase

B - genótipo com o desenvolvimento do embrião somático bloqueado

CE - cultura embriogênica

CLAP - Cromatografia líquida de alta precisão

Ct - cycle threshold

DTT - ditioneitról

ERO - espécies reativas de oxigênio

ES - embrião somático

F3H - flavonona 3-hidroxilase

FA1- α - fator de alongamento 1- α

FA-II - fator de alongamento II

kDa - quilodáltons

LRR-RLK - quinases receptoras, com um domínio extracelular, rico em repetições de leucina

MCP - morte celular programada

m/z - massa/carga

MF - matéria fresca

MPE - massa pró-embriogênica

NPA - ácido 1-N-naftilfataalâmico

ODC - ornitina descarboxilase

PA - poliamina

PEG - polietilenoglicol

pI - ponto isoelétrico

pM - peso molecular

PMSF - fluoreto de fenilmetilsufonil

PP2C - fosfatase do tipo 2C

Put - putrescina

qRT-PCR - PCR em tempo real

R - genótipo responsivo às condições de maturação

R+ - genótipo altamente responsivo às condições de maturação

SAM - s-adenosil-metionina

SERK - “somatic embryogenesis receptor kinase”

Spd - espermidina

Spm - espermina

TFA - ácido trifluoroacético

UBI1 - ubiquitinina-1

VP1 - viviparous-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A embriogênese zigótica em gimnospermas.....	17
1.2 A embriogênese somática em gimnospermas	18
1.2.1 A dependência do genótipo para embriogênese somática	23
1.3 Marcadores bioquímicos associados à embriogênese somática	25
1.3.1 Poliaminas (PAs).....	25
1.3.2 Proteínas e genes relacionados à embriogênese.....	27
1.4 A espécie <i>Araucaria angustifolia</i>.....	31
1.4.1 Biologia reprodutiva e a embriogênese zigótica	32
1.4.2 Importância da espécie.....	33
1.4.3 Propagação assexuada em <i>A. angustifolia</i>.....	34
1.4.4 O uso da embriogênese somática em <i>A. angustifolia</i>.....	35
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Material vegetal.....	38
3.2 Indução das culturas embriogênicas	38
3.3 Proliferação e análise histoquímica das culturas embriogênicas	38
3.4 Estabelecimento de suspensões celulares.....	39
3.5 Maturação das culturas embriogênicas	39
3.6 Classificação do potencial embriogênico das culturas embriogênicas	40
3.7 Estabelecimento de marcadores bioquímicos.....	41
3.7.1 Perfil e conteúdo de PAs	41

3.7.1.1	<i>Extração de PAs</i>	41
3.7.1.2	<i>Determinação do perfil de PAs</i>	42
3.7.2	<i>Análise da expressão dos genes AaSERK1 e AaPP2C</i>	42
3.7.2.1	<i>Extração de RNA total</i>	42
3.7.2.2	<i>Tratamentos do RNA com DNase e síntese do cDNA</i>	43
3.7.2.3	<i>Reações de qRT-PCR</i>	43
3.7.3	<i>Proteômica comparativa</i>	44
3.7.3.1	<i>Extração de proteínas totais</i>	44
3.7.3.2	<i>2DE</i>	45
3.7.3.3	<i>Coloração dos géis</i>	45
3.7.3.4	<i>Análise de imagens</i>	46
3.7.3.5	<i>Digestão in gel de proteínas</i>	46
3.7.3.6	<i>Dessalinização e análises em espectrômetro de massas</i>	47
3.7.3.7	<i>Identificação dos peptídeos</i>	47
3.8	<i>Análises estatísticas</i>	48
3.9	<i>Delineamento experimental</i>	49
4	<i>RESULTADOS</i>	50
4.1	<i>Caracterização morfológica das culturas embriogênicas</i>	50
4.1.1	<i>Indução e proliferação</i>	50
4.1.2	<i>Maturação</i>	52
4.1.3	<i>Classificação das culturas embriogênicas</i>	54
4.2	<i>Estabelecimento de marcadores bioquímicos</i>	55
4.2.1	<i>PAs totais, livres e conjugadas</i>	55
4.2.2	<i>Expressão do gene AaSERK1 e AaPP2C</i>	58
4.2.3	<i>Proteômica comparativa</i>	60
4.2.3.1	<i>Conteúdo protéico</i>	60

4.2.3.2	<i>Análise dos Mapas bidimensionais</i>	61
4.2.3.3	<i>Identificação de peptídeos</i>	63
5	DISCUSSÃO	68
5.1	Caracterização do potencial embriogênico das culturas embriogênicas ...	68
5.2	Marcadores bioquímicos associados ao potencial embriogênico	70
5.2.1	PAs	70
5.2.2	Expressão dos genes <i>AaSERK1</i> e <i>AaPP2C</i>	74
5.2.3	Proteômica comparativa	77
5.2.3.1	<i>Variação no conteúdo de proteínas total</i>	77
5.2.3.2	<i>Identificação de proteínas</i>	78
5.2.3.2.1	Proteínas específicas do genótipo responsivo	78
5.2.3.2.2	Proteínas específicas do genótipo bloqueado	82
5.2.3.2.3	Proteínas comuns com variação em abundância	84
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	88
	REFERÊNCIAS	91
	ANEXO A - Análise da integridade do RNA obtidos a partir da extração de RNA de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.	113
	ANEXO B - Gel bidimensional de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i>, em faixa de pH 3-10.	114
	ANEXO C- Análise preliminar da expressão do gene <i>AaPP2C</i> e do gene endógeno <i>AaUBI1</i> em culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> durante a etapa de proliferação e maturação.	115
	ANEXO D - Quantidade e qualidade do RNA extraído (ng/ mg MF) a partir de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 A embriogênese zigótica em gimnospermas

A embriogênese vegetal inicia com o processo de fertilização e segue por uma sequência estereotipada de estádios característicos. O zigoto emprega todo o seu potencial genético em processos de divisões celulares complexas e consecutivas que resultam em um organismo pluricelular (Laux e Jürgens, 1997). Adicionalmente, consideráveis modificações na morfogênese ocorrem após a germinação da semente. No entanto, a fase embrionária é crucial uma vez que durante esta fase é especificados o meristema apical e radicular assim como o padrão morfogenético (von Arnold et al., 2002). Nas plantas, a embriogênese pode ocorrer de forma natural, através da fusão dos gametas com posterior formação do zigoto (embriogênese zigótica), ou então pela via assexuada a partir da diferenciação do tecido materno em embriões (apomixia gametofítica ou esporofítica) (West e Harada, 1993).

Nas gimnospermas são reconhecidas três fases distintas durante o desenvolvimento embrionário (Haines e Prakash, 1980; Singh, 1978):

- a) fase pró-embrionária que vai desde a fertilização até o rompimento da arquegônia pelo pró-embrião (estádios anteriores ao alongamento do suspensor primário);
- b) fase embrionária inicial, que compreende os estádios após o alongamento do suspensor secundário, e antes do estabelecimento dos meristemas;
- c) fase embrionária tardia, na qual a protoderme e o procâmbio são diferenciados e os meristemas apical e radicular são estabelecidos.

Tanto para gimnospermas como em angiospermas o desenvolvimento do embrião é finalizado com a completa formação dos cotilédones e pelo acúmulo de substâncias de reserva (proteínas, lipídios e carboidratos) (Bewley e Black, 1994). Contudo, dependendo do tipo de semente (ortodoxa ou recalcitrante) podem ocorrer variações com relação à diminuição da atividade metabólica e aquisição da tolerância à dessecação, mediada ou não pelo ácido abscísico (ABA) (Walters et al., 2008).

1.2 A embriogênese somática em gimnospermas

A embriogênese somática é um processo no qual, através da técnica de cultivo *in vitro*, células isoladas, ou um pequeno grupo de células somáticas são induzidas a formarem embriões, em um processo morfogenético que se aproxima da seqüência de eventos representativos da embriogênese zigótica (Guerra et al., 1999; Tautorius et al., 1991). As similaridades entre a embriogênese zigótica e somática envolvem aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares, incluindo a expressão protéica, gênica e diferentes classes de metabólitos (Floh et al., 2007).

A embriogênese somática pode ocorrer de maneira direta ou indireta (von Arnold et al., 2002). Na embriogênese somática direta, os embriões somáticos (ES) se desenvolvem diretamente na superfície dos tecidos organizados do explante (Willians e Maheswaran, 1986) e na indireta, observa-se a formação de um calo intermediário (Namasivayam, 2007).

Atualmente, em função da necessidade da conservação e recomposição dos remanescentes florestais com espécies ameaçadas de extinção (Park et al., 2012), e dos possíveis danos à distribuição de espécies endêmicas em função das mudanças climáticas globais (Buckeridge, 2008; Godoy et al., 2009), a embriogênese somática tem sido cada vez mais utilizada em programas biotecnológicas de conservação genética de gimnospermas (Johnson et al., 2012; Merkle, 2011; Ma et al., 2012). A associação da embriogênese somática com a criopreservação e com a tecnologia de sementes sintéticas constitui-se com uma das abordagens mais promissoras, para o estabelecimento de bancos de germoplasma ex-situ de gimnospermas com sementes recalcitrantes, como no caso da *A. angustifolia* (Pieruzzi et al., 2011; Reed et al., 2011).

Comparada às demais técnicas de micropropagação, a embriogênese somática apresenta as seguintes vantagens:

- a) permite a obtenção de uma grande quantidade de propágulos;
- b) o sistema permite um alto grau de automatização, possibilitando baixar os custos por unidade produzida, através da utilização de biorreatores;

- c) os ESs podem ser produzidos de forma sincronizada, com um alto grau de uniformização e pureza genética;
- d) pode ser utilizada como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento genético, em especial quando associada a técnicas de criopreservação e engenharia genética (Guerra et al., 1999; Lipavská e Konrádová, 2004).

Neste sentido, a embriogênese somática se apresenta como uma metodologia altamente versátil possibilitando tanto a elucidação de questões básicas da embriogênese, bem como a aplicação na propagação clonal massal de plantas (Durzan, 2008; Floh et al., 2007; Steiner et al., 2008; von Arnold et al., 2002).

Em coníferas, os primeiros relatos de estruturas bipolares semelhantes aos ES, foram descritos em *Pinus banksiana* (Durzan e Chalupa, 1976) e *Pseudotsuga menziessi* e *Picea glauca* (Durzan, 1980). Os primeiros resultados do desenvolvimento dos ES e posterior conversão em plântulas foram observados em *Picea abies* (Chalupa, 1985; Hakman, 1985). A partir desta descoberta, muitos esforços foram concentrados para o estabelecimento de protocolos viáveis para a propagação clonal de ES via embriogênese somática em coníferas (Stasolla e Yeung, 2003).

A regeneração de plântulas utilizando a embriogênese somática ocorre ao longo de quatro etapas: indução, proliferação, maturação, germinação e estabelecimento da plântula (Figura 1) (von Arnold et al., 2002).

Etapa 1 - indução - compreende a iniciação das culturas embriogênicas (CEs) a partir dos explantes. Em coníferas, a iniciação da CE geralmente ocorre a partir de tecidos juvenis (Stasolla e Yeung, 2003). Na maioria dos casos, o processo de indução em coníferas ocorre a partir da inoculação de embriões zigóticos imaturos em meios de cultura contendo de 1-3% de sacarose (Attre e Fowke, 1993) e reguladores de crescimento vegetal, como auxinas e citocininas (von Arnold et al., 2002). Nestas condições, as células organizadas dos tecidos juvenis iniciam um processo de reprogramação gênica e proliferação celular, resultando na iniciação da CE (Dudits et al., 1995; von Arnold et al., 2002). Após a inoculação, uma massa branco-translúcida, composta de agregados celulares denominados massas pró-embriogênicas (MPE) podem ser visualizadas na superfície dos embriões zigóticos

imaturos (Stasolla e Yeung, 2003). Embora os reguladores de crescimento vegetal se apresentem como os promotores da divisão celular (Smith e Krikorian, 1990), em algumas espécies de gimnospermas, a suplementação dos meios de cultura com reguladores de crescimento não se apresentou necessária para indução da embriogênese somática (Attre e Fowke, 1993).

Etapa 2 - proliferação - uma vez induzidas, as CEs podem ser mantidas e proliferadas em ciclos repetitivos de subcultivo (duas a três semanas) em meios semi-sólidos ou líquidos (von Arnold et al., 2002). Geralmente, a composição dos meios de cultura utilizados na etapa de proliferação é similar aos utilizados durante a etapa de indução (Attre e Fowke, 1993; von Arnold et al., 2002). Nestas condições, as CEs se mantêm em ciclos repetitivos de proliferação, formando novas MPEs (Stasolla e Yeung, 2003). Esta etapa é caracterizada pelo desenvolvimento completo das MPE até a sua diferenciação em ESs iniciais. Geralmente em coníferas, a diferenciação bipolarizada de MPEs para ESs iniciais é iniciada a partir da retirada dos reguladores de crescimento do meio de cultura (Filonova et al., 2000; von Arnold et al., 2002).

Etapa 3 - maturação - em coníferas, a etapa de maturação ocorre em meios de cultura suplementados com ABA e agentes osmóticos (Attree e Fowke, 1993; Stasolla et al., 2002; Stasolla e Yeung, 2003). O principal papel exercido pelo ABA durante a maturação é inibição da proliferação das CEs e indução do desenvolvimento e maturação dos ESs (von Arnold et al., 2002). Durante esta etapa, os ESs apresentam mudanças morfológicas (histodiferenciação da protoderme, crescimento axial e radial do ES, degradação do suspensor e desenvolvimento dos meristemas) e bioquímicas (acúmulo de substâncias de reserva, redução da atividade metabólica e aquisição da tolerância à desidratação) (Stasolla e Yeung, 2003; von Arnold et al., 2002).

Etapa 4 - germinação e estabelecimento da plântula - nesta última fase, os embriões somáticos, já totalmente desenvolvidos, são germinados e estabelecidos em plântulas em meios de cultura, livre de reguladores de crescimento, baixas concentrações de sacarose e em regime de luz (Attre e Fowke, 1993; Stasolla e Yeung, 2003; von Arnold et al., 2002). Após o desenvolvimento do sistema radicular,

com a presença de raízes laterais, as plântulas são transferidas para uma condição *ex vitro* (Hogberg et al., 2003).

Figura 1 - Esquema da modulação da embriogênese somática em coníferas.

Abrevidações: RCV: reguladores do crescimento vegetal; MPE: massas pró-embriogênicas; ES: embrião somático; ABA: Ácido abscísico.
 FONTE: Adaptado de Stasolla e Yeung (2003) e von Arnold et al. (2002);

1.2.1 A dependência do genótipo para embriogênese somática

Em coníferas, o sucesso da embriogênese somática é dependente do genótipo da planta matriz, da fonte de explante e do tipo e concentração dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura (Guerra et al., 1999). Em coníferas, observa-se uma variação de 0 a 36% de genótipos aptos ao desenvolvimento do embrião somático, ao longo das diversas etapas do protocolo de embriogênese somática (Figura 2) (Timmis, 1998). Esta baixa porcentagem sugere um forte controle genético interferindo no processo de embriogênese somática em coníferas (Bonga et al., 2010). A observação da genótipo dependência para propagação via embriogênese somática foi relatada em diversas espécies de angiospermas, como *Dactylis glomerata* (Conger e Hanning, 1991), *Helianthus annuus* (Flores Berrios et al., 2000), *Coffea canephora* (Priyono et al., 2010) e *Glycine max* (Song et al., 2010), como também em gimnospermas, como *A. angustifolia* (dos Santos et al., 2002) *P. glauca* (Park et al., 1993; 1994), *Pinus sylvestris* (Niskanen et al., 2004), *Pinus taeda* (MacKay et al., 2006), *Abies alba* X *Abies cephalonica* (Samaj et al., 2008). Nestes sistemas, foi observado que somente alguns genótipos foram capazes de completar o processo de embriogênese somática e evoluir para ESs viáveis. Esta genótipo-dependência tem sido tema de estudos na procura da determinação de marcadores que indiquem, dentre as centenas de genótipos estabelecidos *in vitro*, quais são os mais aptos a seguirem a rota de desenvolvimento embrionário.

Figura 2 - Esquema da variação do rendimento dependente do genótipo, de cada etapa do processo de embriogênese somática de coníferas.

Abreviação: CE: cultura embriogênica

FONTE: Adaptado de Timmis (1998).

Em gimnospermas, as CEs induzidas, freqüentemente apresentam como características uma massa branco-translúcida, e que contém ESs bipolares com um longo sistema de células suspensoras. A presença destes embriões bipolares, durante a etapa de proliferação, tem sido utilizada como um marcador morfológico das CEs consideradas aptas para a evolução no processo de maturação e germinação de plântulas (Klimaszewska et al., 2007; Stasolla et al., 2002; von Arnold et al., 2002;). Diferentes estudos relatam que a presença de embriões bipolares nas CEs, não é uma garantia do sucesso para o estabelecimento de plântulas, a partir dessas culturas (Floh et al., 2007; Klimaszewska et al., 2007). Em *Pinus pinaster*, não foi possível observar uma relação entre a morfologia das CEs com o potencial de desenvolvimento dos ESs (Klimaszewska et al., 2007). A incapacidade de alguns genótipos de apresentarem o desenvolvimento de ESs pode ser identificada apenas nas etapas finais da embriogênese somática, resultando na formação de embriões maduros com anormalidades, ou então, com baixas taxas de conversão em plântulas (Stasolla et al., 2002; Stasolla e Yeung, 2003). Neste sentido, muitos esforços estão sendo direcionados para a identificação de marcadores bioquímicos e moleculares para uma seleção precoce de genótipos aptos e competentes para a formação e

evolução de ESs viáveis (Dowlatabadi et al., 2009; Klimaszewska et al., 2004; Lippert et al., 2005; Silveira et al., 2008).

1.3 Marcadores bioquímicos associados à embriogênese somática

1.3.1 Poliaminas (PAs)

As poliaminas (PAs) são aminas alifáticas de baixo peso molecular (Baron e Stasolla, 2008; Santa-Catarina et al., 2006). Sua natureza policatiónica em pH celular possibilita a interação eletrostática com diversas outras macromoléculas como DNA, RNA, fosfolipídios, componentes da parede celular e proteínas (Minocha e Minocha, 1995; Pieruzzi et al., 2011; Steiner et al., 2007; Wallace et al., 2003). A ocorrência das PAs em diversos organismos vivos, como bactéria, fungos, animais e plantas vasculares indicam o seu envolvimento em diversos processos fundamentais na célula (Baron e Stasolla, 2008; Santa-Catarina et al., 2006; Silveira et al., 2006; Steiner et al., 2007). Recentemente, a conjugação de PAs com moléculas de baixo molecular e um mecanismo de metilação e acetilação foram relatados, sugerindo que as funções celulares das PAs se estendem para muito mais além da interação eletrostáticas (Wallace et al., 2003). As PAs foram relacionadas a diversos processos celulares, como regulação da transcrição, processamento do RNA, remodelação da cromatina, tradução do RNAm, ativação protéica e mudanças na fluidez da membrana (Baron e Stasolla, 2008; Kakkar e Sawhey 2002; Pieruzzi et al., 2011; Wallace et al., 2003).

Em plantas, a biossíntese de PAs (Figura 3) se inicia pela descarboxilação da arginina e ornitina, pela enzima arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC). A diamina Put é convertida à triamina Spd através da incorporação de um grupo aminopropil pela enzima Spd sintase. A repetitiva incorporação de um grupo aminopropil à molécula de Spd pela Spm sintase, dá origem à tetramina Spm.

Figura 3 - Esquema de biossíntese de poliaminas e etileno.

Abreviações: SAM: S-adenosilmetionina; ACC: 1-aminociclopropano-1-ácido-carboxílico; Arg: Arginina; Orn: Ornitina; Spd: Espermidina; Spm: Espermina.

FONTE: Adaptado de Baron e Stasolla et al. (2008).

Em plantas, as PAs, são consideradas como reguladores do crescimento vegetal ou mensageiros secundários (Kakkar e Sawhney, 2002). Esta classe de reguladores de crescimento é relacionada com diversos processos de desenvolvimento, como organogênese, embriogênese, germinação, iniciação e desenvolvimento floral, senescência, desenvolvimento e amadurecimento do fruto, além de atuar nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (Alcázar et al., 2006; Astarita et al., 2003; ; Bagni e Tassoni, 2001; Bouchereau et al., 1999; Galston e Sawhney, 1990; Kumar et al., 1997; Kusano et al., 2008; Malmberg et al., 1998; Pieruzzi et al., 2011). Nos vegetais, as principais PAs encontradas são a diamina putrescina (Put), a triamina espermidina (Spd) e a tetramina espermina (Spm), estando presentes em todos os compartimentos celulares (Santa-Catarina et al., 2006, Silveira et al., 2006, Steiner et al., 2007, Pieruzzi et al., 2011).

As PAs estão relacionadas com a regulação da embriogênese somática e zigótica (Kong et al., 1998). O primeiro relato de papel das PAs no desenvolvimento do embrião somático foi realizado por Montague et al. (1978) no modelo *Daucus carota*. A partir desta descoberta, diversos estudos foram realizados para identificar a

relação desta classe de reguladores de crescimento vegetal com o processo de desenvolvimento do embrião somático (Minocha e Minocha, 1995). Em coníferas, esta classe de metabólitos foram caracterizadas como biomarcadoras dos diferentes estádios do desenvolvimento do embrião zigótico e somático (Minocha et al., 1999).

Relatos bibliográficos indicam o envolvimento das PAs durante o desenvolvimento do embrião zigótico e somático de *A. angustifolia*. Astarita et al. (2003) relataram variações nos níveis de PAs durante o desenvolvimento do embrião zigótico da espécie. Silveira et al. (2006) observou que as PAs inibiam a proliferação e estimulavam a diferenciação de CEs de *A. angustifolia* (Silveira et al., 2006). Adicionalmente, esta classe de metabólitos está relacionada com os eventos pós-embriogênicos da espécie. Pieruzzi et al. (2011) relataram que as PAs se apresentaram como marcadoras do término da germinação de sementes de *A. angustifolia* (Pieruzzi et al., 2011).

A utilização das PAs como biomarcadoras da capacidade de propagação via embriogênese somática foi reportado em diversas espécies de angiospermas e gimnospermas como em *Solanum melongena* (Yadav e Rajam 1997), *Medicago sativa* (Huang et al., 2001), *Oryza sativa* (Schoeb et al., 2001), *D. glomerata* (Li e Burrit 2003) e *Saccharum spp.* (Fim 2012), *Pinus nigra* (Noceda et al., 2009), *Pinus rigida x Pinus taeda* e *Liriodendron tulipifera* (Park et al., 2011), *Ocotea catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2004). Neste sentido, a avaliação dos perfis e níveis endógenos das PAs poderá propiciar a identificação de genótipos competentes e aptos para a formação de ESs de *A. angustifolia*.

1.3.2 Proteínas e genes relacionados à embriogênese

A identificação e caracterização da expressão de genes e proteínas, diretamente envolvidas com o desenvolvimento embrionário, é altamente desejável, haja vista que perturbações na expressão destes genes e proteínas podem ser utilizadas como marcadores da competência celular durante o desenvolvimento embrionário (Lippert et al., 2005). Adicionalmente, a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário e os perfis de proteínas podem ser utilizados para discriminação dos tecidos recalcitrantes daqueles potencialmente embriogênicos (Bonga et al., 2010). Nesta linha de estudo, muita trabalhos foram

focados na identificação dos perfis de expressão gênica e protéicos entre tecidos embriogênicos e não-embriogênicos (Blanco et al., 1997; Dias et al., 2007; Hahne et al., 1988; Moraes et al., 2006; Sallandrouze et al., 1999; Silveira et al., 2008; Stasolla et al., 2003; Stasolla e Yeung, 2003; Sung e Okimoto, 1981; Tchorbadjieva, 2005).

Entretanto, os exatos processos moleculares que governam a competência para a embriogênese em células vegetais ainda não estão totalmente esclarecidos (Fehér et al., 2003; Mordhorst et al., 1997). A transição das células somáticas para o estado embrionário envolve um processo complexo, que inclui a desdiferenciação, reativação celular, divisão e reprogramação do metabolismo e desenvolvimento (Fehér et al., 2003; Floh et al., 2007). Trabalhos recentes objetivando a obtenção de marcadores moleculares para detecção e/ou promoção da competência embriogênica, e a identificação e expressão destes genes marcadores, tem sido realizados com frequência. Estes estudos têm como principal objetivo a identificação de populações celulares competentes para embriogênese (Bonga et al., 2010; Floh et al., 2006; Mordhorst et al., 2005). Um dos primeiros genes descritos como envolvidos na expressão da competência celular foi o “*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE*” (*SERK*) (Schmidt et al., 1997), em cultura de tecidos de *D. carota*. Este gene codifica uma proteína transmembrânica, com repetições de leucina, que pertence a uma grande família de quinases receptoras em plantas (Becraft, 1998). Células de cenoura, competentes para a diferenciação de ESs, expressaram o gene repórter luciferase sobre controle de elementos regulatórios de *DcSERK*, demonstrando que este gene é um marcador de células competentes a diferenciação em ESs. (Schmidt et al., 1997). A utilização da expressão do gene *SERK* como marcadora da competência embriogênica foi relatada em diversas outras espécies vegetais, tais como, *A. thaliana* (Hetch et al., 2001; Salaj et al., 2008), *M. truncatula* (Nolan et al., 2003), *Cocos nucifera* (Perez-Nunez et al., 2009), *O. catharinensis* (Santa Catarina et al., 2004), *Helianthus annuus* (Thomas et al., 2004), *O. sativa* (Hu et al., 2005), *Solanum tuberosum* (Sharma et al., 2008), *Vitis vinifera* (Schellembaum et al., 2008), *Cyclamen persicum* (Savona et al., 2012), *Secale cereale* (Gruszczynska et al., 2011), *Anana comasus* (Ma et al., 2012). Em todos estes sistemas a expressão deste gene foi observada em CEs competentes à formação de ESs.

Embora a gene *SERK1* tenha sido amplamente estudado em angiospermas, relatos de seu envolvimento durante a embriogênese somática de gimnospermas ainda são escassos. O primeiro homólogo do gene *SERK1* em gimnospermas foi caracterizado recentemente, utilizando o sistema de *A. angustifolia* (Steiner et al., 2011). Uma análise filogenética evidenciou uma grande similaridade com as sequências homólogas de angiospermas (Steiner et al., 2011). Neste mesmo trabalho, a expressão do gene *AaSERK1* durante o processo de embriogênese somática foi observado, no entanto, é importante salientar que somente um genótipo foi utilizado para este estudo, dificultando a sua caracterização como marcadora de genótipos ao processo de embriogênese somática.

O ABA desempenha um papel fundamental no processo de maturação dos embriões zigótico e somáticos. Durante a embriogênese zigótica a iniciação da maturação das sementes correlaciona-se com um pico nos conteúdos endógenos de ABA (Silveira et al., 2008). Este pico é essencial para o acúmulo de substâncias de reserva e estabelecimento da dormência da semente (Fischerova et al., 2008; Silveira et al., 2008). Em *A. angustifolia*, um acúmulo de ABA foi observado durante o estágio que antecede a formação dos cotilédones no embrião zigótico (Silveira et al., 2008). A suplementação do meio de cultura com ABA resulta no bloqueio da proliferação celular e induz o desenvolvimento de ESs (Bozhkov et al., 2002; Stasolla e Yeung, 2003; von Arnold et al., 2002;). Embora os mecanismos no quais o ABA estimula o desenvolvimento do embrião ainda não estejam elucidados, foi sugerido que o ABA regula diretamente ou indiretamente a expressão de outros genes durante a embriogênese (Fischerova et al., 2008). A família de genes “*ABA INSENSITIVE*” (*ABI*) foi relacionada com a tradução do sinal do ABA durante o desenvolvimento da semente de *A. thaliana*. Os fatores de transcrição *ABI3*, *ABI4* e *ABI5* regulam as respostas ao ABA durante a embriogênese tardia de *Arabidopsis* (Soderman et al., 2000). Uma alta expressão do gene *VIVIPAROUS1* (*VP1*), um homólogo do gene *ABI3*, foi relacionado com o desenvolvimento adequado do embrião somático de *P. abies* (Fischerova et al., 2008). Os genes *ABI1* e *ABI2* codificam para uma fosfatase do tipo 2C (PP2C) desempenhando um papel crítico na regulação negativa da transdução do sinal mediado por ABA (Merlot et al., 2001; Meyer et al., 1994; Zhang et al., 2004). Neste sentido, a expressão diferencial do gene que codifica para uma PP2C poderia ser utilizada como marcadora do

potencial embriogênico. Em *Arabidopsis*, mutações no gene ABI1 afetaram respostas induzidas por ABA em tecidos vegetativos e embriogênicos (Leung et al., 1997; Robert et al., 2006).

Proteínas influenciam diretamente a bioquímica celular e permitem uma análise mais acurada do crescimento e desenvolvimento vegetal (Chen e Harmon, 2006). A identificação de proteínas associadas com a competência embriogênica permitiria novas abordagens acerca dos mecanismos regulatórios da embriogênese somática. Estudos envolvendo a busca por marcadores protéicos associados com a competência embriogênica foram iniciados em 1981, onde Sung e Okimoto (1981) identificaram as proteínas 77 e 43 kDa como específicas de ESs de *D. carota*. Estudos similares realizados em arroz revelaram uma série de polipeptídios entre as massas moleculares de 40 para 44 kDa, que eram mais abundantes em calos embriogênicos quando comparados a calos não embriogênicos (Chen e Luthe, 1987). A detecção de proteínas relacionadas com a embriogênese somática foram relatadas também em *Cichorium intybus* (Hilbert et al., 1992), *D. glomerata* (Hahne et al., 1988) e *Cupressus sempervirens* (Sallandrouze et al., 1999). Pedroso et al. (1995) detectou dois polipeptídios, E1 e E2, especificamente relacionados com a indução da pró-embriogênia e desenvolvimento tardio do embrião de *Camelia japonica*. Fellers et al. (1997) identificaram duas proteínas 43 kDa e 27 kDa que podem ser utilizadas como marcadoras do potencial embriogênico de *Triticum* ssp. Hvoslef-Eide e Corke (1997) detectaram proteínas específicas de CEs de *Betulacea betulia*.

Recentes avanços nas análises de eletroforese bidimensional (2DE) somados a uma alta sensibilidade na identificação peptídica via espectrometria de massas permitiu o estabelecimento de perfis em larga escala e identificação de proteínas em diversas áreas da biologia de plantas (Hochholdinger et al., 2006). Essas abordagens foram utilizadas para o estudo do processo de embriogênese somática de diversas espécies vegetais, tais como, *M. truncatula* (Imin et al., 2004; 2005, Almeida et al., 2012), *P. glauca* (Lippert et al., 2005), *O. sativa* (Yin et al., 2008), *C. persicum* (Lyngved et al., 2008; Winkelmann et al., 2006), *V. vinifera* (Marsoni et al., 2008) e *Citrus sinensis* (Pan et al., 2009). Em *A. angustifolia*, esta abordagem foi estabelecida e empregada, sendo identificadas uma série de proteínas marcadoras de estágio específicos durante os processos do desenvolvimento do embrião

zigótico e germinação da semente (Balbuena et al., 2009, 2011; dos Santos et al., 2006; Silveira et al., 2008;).

1.4 A espécie *Araucaria angustifolia*

A família Araucariaceae esta inserida na divisão Coniferophyta pertencente ao grande grupo das gimnospermas. Esta família está dividida em três gêneros: *Araucaria* (19 espécies), *Agathis* (13 espécies) e *Wollemia* (uma espécie). Com origem no Triássico, a família entrou em um processo de grande expansão e diversificação, com presença em ambos os hemisférios do planeta (Kershaw e Wagstaff 2001). Entretanto, a diversidade da família sofreu um declínio gradual como resultado da competição com a evolução das angiospermas (Kershaw e Wagstaff 2001). Atualmente, a família encontra-se amplamente distribuída no hemisfério sul, com ocorrências nas regiões da Nova Caledônia, Nova Guiné, Austrália, Nova Zelândia e América do Sul (Setoguchi et al., 1998). Na América do Sul, as principais espécies encontradas são a *Araucaria araucana* e *Araucaria angustifolia*, sendo a última, a única de seu gênero com ocorrência natural no Brasil.

A. angustifolia (Bert O. Ktze) (pinheiro-brasileiro) é uma espécie arbórea, com ciclo de vida longo, atingindo a maturidade após 15 anos de crescimento. Geralmente, as plantas da espécie são dióicas, embora em alguns casos raros, plantas monóicas foram observadas na natureza (Reitz et al., 1978). Seus indivíduos adultos apresentam 50 m de altura, copa cônica, com ramos primários cilíndricos nos indivíduos jovens e posteriormente, corimbosos na maturidade, com ramos primários verticilados e ramos secundários alternos, caducos, agrupados no ápice dos ramos primários (Garcia, 2002).

Em áreas de ocorrência natural, a espécie é caracterizada como heliófita (Lorenzi, 1992). Normalmente é uma das primeiras espécies a surgirem em áreas de clareira, sendo por isso também caracterizada como pioneira. Quando em associação com outras arbóreas de grande porte, constitui a “Floresta Ombrófila Mista” (Lorenzi 1992; Guerra et al., 2002). Originalmente a espécie ocupou cerca de 20 milhões de hectares, distribuídos em sua grande maioria, nos estados do Paraná (40%), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%) e com manchas esparsas

nos estados de São Paulo (3%), Minas Gerais (1%) e Rio de Janeiro (1%) (Figura 4A) (Guerra et al., 2002).

Figura 4 - Distribuição geográfica da espécie *A. angustifolia*.

Área de ocorrência destacado em verde escuro; **A)** Distribuição no início do século XX;
B) Distribuição atual da espécie;

FONTE: Conselho Nacional Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (2012).

1.4.1 *Biologia reprodutiva e a embriogênese zigótica*

Em *A. angustifolia*, a estrutura reprodutiva masculina apresenta uma forma cilíndrica, alcançando uma altura de até 15 cm (Stefenon e Caprestano, 2009). Os microesporófilos são densos e dispostos espiralmente no eixo do cone e se abrem deixando o pólen livre para ser transportado pelo vento até o estróbilo feminino. A estrutura reprodutiva feminina possui um diâmetro entre 20 e 25 cm (Rizzini, 1976) localizando-se no ápice do ramo e é constituída por inúmeras brácteas coriáceas com óvulo, inseridas sobre um eixo central (Reitz e Klein, 1966).

Como em outras espécies de coníferas, a embriogênese zigótica de *A. angustifolia* é caracterizada pela presença de uma etapa de núcleo livre, quando

ocorrem sucessivas divisões nucleares sem a formação de parede celular. Em espécies de *Araucariaceae*, ocorre a formação de 32 a 64 núcleos livres antes do início da formação da parede celular (Guerra et al., 2008). Os pró-embriões são localizados no centro da arquegônia (Haines e Prakash, 1980). A polaridade dos pró-embriões ocorre pela organização dos núcleos livres, constituindo três tipos celulares bem definidos: as células da região superior dando origem ao suspensor, as células terminais dando origem as células da capa, e as células centrais dando origem ao embrião (Guerra et al., 2008).

Em *Araucareaceae*, dependendo da espécie, o número de arquegônias formadas em um único gametófito varia consideravelmente (Gifford e Foster, 1989). Em *A. angustifolia*, o megagametófito contém quatro arquegônias, que quando fertilizadas, dão origem aos complexos pró-embriogênicos. Entretanto, por competição, apenas um dos proembriões dará origem embrião maturo (Gifford e Foster, 1989). Em coníferas dois tipos de poliembrionia são observados, a poliembrionia polizigótica (fecundação de dois ou mais óvulos nas arquegônias) e a poliembrionia por clivagem (clivagem das células embrionárias, resultando em até oito pró-embriões). Em espécies do gênero *Araucaria*, foi observada somente a poliembrionia polizigótica (Gifford e Foster, 1989).

1.4.2 Importância da espécie

A *A. angustifolia* é a única conífera nativa com importância econômica no Brasil (Guerra et al., 2002). Seus indivíduos adultos possuem uma madeira de alta qualidade, com troncos cilíndricos, retos, raramente ramificados, com uma altura que pode chegar a 50 metros de altura, com 1 a 2 metros de diâmetro. Além disso, a madeira da espécie possui boas características físicas e mecânicas, em relação à massa específica, sendo indicada para utilização em construções em geral (Basso et al., 2010). A madeira da espécie é composta de 58% de celulose, 29% de lignina, além de possuir fibras longas de alto rendimento em celulose, tornando-a muito importante para sua utilização pela indústria de papel e celulose (Guerra et al., 2008).

Outro produto obtido a partir da espécie são as sementes de *A. angustifolia*, também conhecidas como pinhões (Conforti e Lupano, 2007). Estas sementes

constituem um alimento muito valioso, fonte rica de amido, possuindo também efeitos medicinais, combatendo a anemia e azia além de outros males (Basso et al., 2010).

Diferentes partes da árvore são empregadas na medicina popular brasileira como: infusões de cascas utilizadas topicamente para tratar tensões musculares e varizes, xarope da resina utilizado para o tratamento de infecções do tracto respiratório, infusões de acículas utilizadas para tratar a fadiga, anemia, e tinturas de folhas utilizadas para o tratamento de pele seca e feridas (Franco e Fontana, 1997; Marques, 2007; Marquesini, 1995).

A exploração do pinheiro-brasileiro se intensificou a partir do ano de 1934, e atingiu seu ápice, nas décadas de 50 até o final da década de 70 (Mattos et al., 1994). A intensa exploração predatória, somados a expansão da agricultura e pecuária, resultou no esgotamento quase que completo das reservas naturais da espécie. Esta situação vem sendo agravada pela exploração ilegal da madeira e pelo reflorestamento das áreas de ocorrência natural da espécie com espécies exóticas como *Pinus* e *Eucalipto* (Basso et al., 2010). Atualmente, estima-se que as áreas de ocorrência da espécie estão limitadas a valores inferiores a 2% de sua ocorrência original (Figura 4B) (Guerra et al., 1999, 2002). Esta situação inseriu o pinheiro-brasileiro como espécie em perigo crítico de extinção, segundo o levantamento feito pela “International Union for Conservation of Nature” (2012). Este intenso processo de exploração acarretou a demanda por estudos que contemplassem o estabelecimento de programas de melhoramento genético e conservação dos remanescentes florestais de *A. angustifolia* (Stefenon et al., 2009).

1.4.3 Propagação assexuada em *A. angustifolia*

Assim como nas demais espécies de coníferas de interesse comercial, a possibilidade do uso das técnicas de propagação assexuada como: enxertia, estaquia e organogênese, foram inicialmente contempladas para clonagem de genótipos elite de *A. angustifolia* (Handro, 1986; Iritani, 1997). Contudo, o plagiotropismo dos explantes, a alta lignificação, a dificuldade de enraizamento e formação de brotos, a oxidação *in vitro* dos explantes e a baixa taxa de conversão em plantas impossibilitaram a aplicação comercial, em larga escala, destas técnicas

para *A. angustifolia* bem como nas demais espécies de coníferas (Handro, 1986; Iritani, 1997). Dentre as técnicas de micropropagação, a embriogênese somática se apresenta como a técnica biotecnológica com maior potencial para o uso em programas de melhoramento e conservação de germoplasma de espécies arbóreas (Bonga et al., 2010; Ma et al., 2012). Com o desenvolvimento da técnica de embriogênese somática em espécies de coníferas, abriram-se perspectivas e possibilidades para o uso da micropropagação em *A. angustifolia* (Guerra et al., 2000).

1.4.4 O uso da embriogênese somática em *A. angustifolia*

Em *A. angustifolia*, o primeiro relato de embriogênese somática foi reportado por Guerra e Kemper (1992). Desde então, diversos autores vêm trabalhando no desenvolvimento de protocolos para indução, manutenção e maturação de ESs nesta espécie (Astarita e Guerra 1998, 2000; dos Santos et al., 2002, 2008, 2010; Guerra et al., 2000; Silveira et al., 2002, 2006; Steiner et al., 2005, 2007, 2008, 2012; Schlogl et al., 2012). Apesar dos avanços obtidos, os protocolos atualmente utilizados possuem entraves como: uma baixa frequência de ESs, e anormalidades dos ESs ao término da etapa de maturação. Esta situação tem dificultado o uso da embriogênese somática em programas de conservação ou como ferramenta no melhoramento genético na espécie.

Em coníferas, o sucesso da embriogênese somática é dependente do genótipo da planta matriz, da fonte de explante e do tipo e concentração dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura (Guerra et al., 1999). Até o presente momento, a maior parte dos esforços no desenvolvimento do protocolo de embriogênese somática para *A. angustifolia*, foram voltados para o aperfeiçoamento da composição dos meios de cultura (Astarita e Guerra 1998; Silveira et al., 2006; Steiner et al., 2005, 2007). Entretanto, uma das dificuldades em estudos de padronização e otimização dos protocolos de embriogênese somática, é a forte dependência do genótipo para o sucesso da embriogênese somática. Esta situação tem resultado na observação de uma ampla variação de respostas, ao longo das diversas etapas do desenvolvimento do embrião somático, dependentes dos diferentes genótipos utilizados (dos Santos et al., 2002; Timmis, 1998).

A melhor estratégia empregada para incrementar a produção de ES em espécies recalcitrantes como a *A. angustifolia*, é a utilização de uma ampla quantidade de genótipos (Bonga et al., 2010), o que torna os estudos de otimização dos protocolos de cultivo *in vitro* bastante empíricos e pouco eficientes (Floh et al., 2007). Contudo, em função do grande espaço de tempo decorrido entre as fases de indução e maturação dos embriões somáticos (pelo menos oito meses), nem todos os genótipos podem ser testados ao mesmo tempo com relação ao seu potencial embriogênico. Além disso, é muito comum observar a perda da competência embriogênica com apenas alguns meses de subcultivo das CEs. Neste sentido, a determinação de marcadores bioquímicos e moleculares, permitirá a seleção com maior eficiência dos genótipos, nas etapas iniciais do desenvolvimento do embrião somático, que deverão ser utilizados em estudos de otimização dos protocolos de embriogênese somática de *A. angustifolia*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo geral identificar marcadores bioquímicos associados à embriogênese somática em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Monitorar e caracterizar morfológicamente o desenvolvimento de embriões somáticos em diferentes genótipos celulares;
- b) identificar as proteínas diferencialmente expressas em culturas embriogênicas com diferentes potenciais embriogênicos;
- c) analisar os perfis de poliaminas endógenas, conjugadas e livres, em culturas embriogênicas com diferentes potenciais embriogênicos;
- d) investigar a expressão de genes reguladores da embriogênese (*SERK1* e *PP2C*) em culturas embriogênicas com diferentes potenciais embriogênicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram utilizados embriões zigóticos imaturos de *A. angustifolia*, isolados de sementes provenientes de populações naturais do município de Canoinhas, estado de Santa Catarina. As coletas foram realizadas entre dezembro de 2008 e janeiro de 2009.

3.2 Indução das culturas embriogênicas

Sementes imaturas de *A. angustifolia* foram removidas dos cones e submetidas à assepsia com 70% (v/v) etanol por 2 min e em solução 20% (v/v) de hipoclorito de sódio (2% (p/v) cloro ativo) por 20 min, seguido de três lavagens em água destilada autoclavada. Após a assepsia, embriões zigóticos imaturos, utilizados como explantes, foram isolados e inoculados em placas de Petri (100 x 15 cm), contendo 25 mL de meio de cultura MSG básico (Becwar et al., 1989), solidificado com Gelrite® (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EUA) (3 g.L⁻¹), e suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹) e L-glutamina (1,46 g.L⁻¹) previamente filtro-esterilizada. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH e HCl, antes da adição do agente geleificante. Os meios de cultura foram autoclavados à temperatura de 120 °C por 15 min. As placas de Petri, contendo os embriões inoculados, foram mantidas durante 45 dias, no escuro à temperatura de 25 ± 2 °C. Ao término deste período, cada explante, ou seja, embrião zigótico imaturo isolado, que apresentou proliferação celular resultando em uma massa celular branco translúcida, foi caracterizado como uma CE, de um genótipo independente, a ser utilizado nas análises posteriores.

3.3 Proliferação e análise histoquímica das culturas embriogênicas

Após a etapa de indução (45 dias), as CEs dos genótipos induzidos, foram mantidas e proliferadas em meios de culturas idênticos aos da etapa de indução, no escuro, à temperatura de 25 °C ± 2 °C. A cada período de 21 dias, porções

superficiais das CEs foram repicadas para um novo meio de cultura de mesma constituição. Durante a etapa de proliferação, a caracterização morfológica das CEs foi realizada através da metodologia de dupla coloração (Gupta e Durzan, 1987), com 1% (p/v) acetocarmine e 0,05% (p/v) azul de Evans. A identificação dos ESs iniciais formados na superfície das CEs foi realizada e baseada na descrição morfológica estabelecida por von Arnold et al. (2002). As observações e fotografias foram realizadas utilizando uma lupa SteREO Discovery. V8 (Carl Zeiss®, Göttingen, Alemanha) acoplada a uma máquina fotográfica AxioCam ICC 1 (Carl Zeiss®, Göttingen, Alemanha).

3.4 Estabelecimento de suspensões celulares

Suspensões celulares foram estabelecidas de acordo com dos Santos et al. (2008). Porções de 500 mg de CEs foram transferidas para placas de Petri (100 x 15 cm) contendo 4 mL de meio MSG líquido. A suspensão celular resultante, foi transferida para frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL do meio MSG líquido. As culturas foram mantidas por 15 dias, no escuro, à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em agitadores orbitais (rotação de 120 rpm). Após este período, alíquotas de 4 mL foram transferidas para novos frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio MSG líquido e mantidos no escuro, à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. A cada período de 15 dias, alíquotas de 4 mL foram transferidas para meio de cultura fresco de mesma constituição.

3.5 Maturação das culturas embriogênicas

As CEs com dez, e posteriormente com vinte meses, de cultivo foram cultivadas nos tratamentos contendo agentes promotores de maturação (ABA, polietilenoglicol (PEG) 4000 e maltose). Assim, três inóculos de 100 mg, de cada genótipo, foram transferidos para discos de papel filtro (70 mm) dispostos em placas de Petri (100 x 15 cm) contendo 25 mL de MSG básico, solidificado com Gelrite® (Sigma-Aldrich®) (3 g.L^{-1}), suplementado com L-glutamina ($1,46\text{ g.L}^{-1}$), sacarose (30 g.L^{-1}), carvão ativado (3 g.L^{-1}), maltose (70 g.L^{-1}) e PEG 4000 (90 g.L^{-1}), e mantidas no escuro, à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para cada genótipo, foram utilizados cinco placas de

Petri, contendo três inóculos de 100 mg em cada placa. Após 30 dias os papéis filtros contendo as CEs foram transferidos para meios de cultura de mesma constituição, porém, suplementados com ABA (120 μ M). A cada período de 30 dias, os discos de papéis filtros contendo as CEs foram subcultivados para meios de cultura novos. Durante a etapa de maturação (tempo total de 120 dias), as superfícies das CEs foram avaliadas morfológicamente e fotografadas em lupa SteREO Discovery.V8 (Carl Zeiss®) acoplada a uma máquina fotográfica AxioCam ICC 1 (Carl Zeiss®). Para cada genótipo analisado, o número de CEs que apresentaram o desenvolvimento tardio dos ESs foi contabilizado. A caracterização dos estádios tardios do desenvolvimento do embrião somático (globular e cotiledonar inicial) foi realizada segundo a descrição morfológica estabelecida por von Arnold et al. (2002).

3.6 Classificação do potencial embriogênico das culturas embriogênicas

Os genótipos de *A. angustifolia* utilizados no presente trabalho foram classificados de acordo com o seu potencial embriogênico, i.e., a capacidade de suas CEs apresentarem ao longo do desenvolvimento do ES, estruturas morfológicamente bem definidas de massas pró-embriogênicas (MPE), ESs iniciais, ESs estágio globular e ESs estágio cotiledonar, segundo descrição morfológica estabelecida por von Arnold et al. (2002). Assim, foi possível classificar os genótipos em três classes distintas (Figura 5):

- a) o genótipo MSG01 classificado como altamente responsivo aos agentes de maturação (R+);
- b) o genótipo R1003 classificado como genótipo responsivo aos agentes de maturação (R);
- c) demais genótipos (MSG00, MSG06, MSG03, R12, M1004 P3, S3, A1003) foram classificados como genótipos com o desenvolvimento bloqueado do embrião somático (B).

Figura 5 - Etapas do desenvolvimento do embrião somático em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. Caracterização dos genótipos conforme o potencial embriogênico ao longo do desenvolvimento do embrião somático.

Genótipo MSG01 foi classificado como altamente responsivo aos agentes de maturação (R+), o genótipo R1003 foi classificado como genótipo responsivo aos agentes de maturação (R) e os demais genótipos (MSG00, MSG06, MSG03, R12, M1004, P3, S3, A1003) foram classificados como genótipos bloqueados (B).

FONTE: Jo (2012)

3.7 Estabelecimento de marcadores bioquímicos

3.7.1 Perfil e conteúdo de PAs

3.7.1.1 Extração de PAs

As análises de PAs foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Silveira et al. (2006). Após o término de um ciclo de proliferação (21 dias), amostras de CEs (200 mg peso fresco) dos genótipos R+, R e B1 (conforme classificação descrita na seção 3.6), foram maceradas em nitrogênio líquido e ressuspendidas em ácido perclórico (PCA) 5% (v/v). Após uma hora de incubação no gelo, os extratos foram centrifugados por 20 minutos a 14.000 rpm (4 °C). O sobrenadante contendo a fase de PAs livres foi removido e o precipitado descartado. A fase de PAs conjugadas foi obtida por hidrolização de 200 µl, do sobrenadante

obtido, com 12 N HCl por 18 horas a 110 °C. O produto hidrolisado foi seco em nitrogênio e solubilizado em ácido perclórico 5% (v/v).

PAs livres e conjugadas foram derivatizadas com cloreto de dansil em solução de acetona (4 mg.ml^{-1}). Uma alíquota de 20 μl foi adicionado a 100 μl da solução de cloreto de dansil (5 mg ml^{-1}) e 50 μl de solução de carbonato de sódio saturada. Diaminoheptane (DAH) a 0.05 mM foi adicionado a cada amostra como padrão interno da análise. As soluções foram incubadas no escuro por 50 min a 70 °C. O excesso do cloreto de dansil foi convertido à dansilprolina pela adição de 25 μl de prolina a 100 mg.ml^{-1} . Após 30 minutos de incubação, as PAs dansiladas foram extraídas em 180 μl de tolueno. A fase do tolueno contendo as PAs dansiladas foi seca em nitrogênio e ressuspendidas em 180 μl em acetonitrila (ACN).

3.7.1.2 *Determinação do perfil de PAs*

Os perfis de PAs das fases livres e conjugadas foram obtidos em cromatografia líquida de alta precisão (CLAP) em coluna de fase reversa C18 (Shimadzu Shim-pack CLC ODS, Kyoto, Japão). As áreas e tempos de retenção de cada poliamina da amostra foram avaliados por comparação com concentrações conhecidas das principais PAs encontradas em plantas (Put, Spd, Spm). As análises de PAs foram realizadas em triplicatas biológicas.

3.7.2 *Análise da expressão dos genes AaSERK1 e AaPP2C*

3.7.2.1 *Extração de RNA total*

Após o término de um ciclo de proliferação (21 dias), amostras (150 mg peso fresco) de CEs dos genótipos R+, R e B1 (conforme classificação descrita na seção 3.6), foram maceradas em nitrogênio líquido. A extração do RNA total das culturas embriogênicas foi realizada utilizando o kit de extração Purelink™ RNA Mini Kit (Life technologies®, Carlsbad, CA, EUA), seguindo instruções do fabricante. A quantificação e a leitura da absorbância em comprimentos de onda de 260 e 280 nm foram obtidos em microplacas Take3 em espectrofotômetro Epoch (Biotek®, Winooski, VT, EUA). A integridade do RNA total obtido foi avaliada por eletroforese

em gel de agarose ultra-pura 1% (p/v) em corrente contínua com voltagem fixa de 70 V por 15 min, em cubas para eletroforese pré-tratadas em detergente por três horas. Os géis obtidos foram corados com brometo de etídio e fotografados em câmara de UV (Vilber Lomart®, Torcy, França) (ANEXO A).

3.7.2.2 *Tratamentos do RNA com DNase e síntese do cDNA*

Uma alíquota contendo 1 µg do RNA total foi tratado por digestão por DNase I (Fermentas®), de acordo com o protocolo do fabricante. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit de reação SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen®, Grand Island, NI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.7.2.3 *Reações de qRT-PCR*

Para as reações de PCR em tempo real (qRT-PCR), foram utilizados alíquotas de 2 µl de uma diluição 1:3 de cada cDNA obtido, 100 nM dos iniciadores para os genes alvo *AaSERK1* e *AaPP2C* (Quadro 1) e 2x SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystems®, Carlsbad, CA, EUA). O gene *UBIQUITINA-1 (UBI1)* foi utilizado como gene endógeno. As reações de PCR foram realizadas em termociclador 7500 PCR Real time (Applied Biosystems®) e o ciclo de amplificação foi de 95 °C por 10 min e 40 ciclos de: 95 °C por 15 seg, 55 °C por 1 min e 72 °C por 30 seg (momento no qual ocorre a leitura do sinal emitido pelo SYBR Green). Os dados obtidos foram analisados, e os valores de “cycle threshold” (Ct) e a eficiência de reação de cada iniciador foram determinados através do software LinRegPCR (Ruijter et al., 2009). Utilizando o software fgStatistics (Di Rienzo, 2009), a expressão relativa foi calculada pela seguinte fórmula (Pfaffl et al., 2002):

$$\frac{(\text{Eficiência média do gene alvo}^{\wedge} (\text{Média do Ct das réplicas biológicas do controle} - \text{Média Ct das réplicas biológicas de cada genótipo}))}{((\text{Eficiência média do gene referência}^{\wedge} (\text{Média do Ct das réplicas biológicas do controle} - \text{Média Ct das réplicas biológicas de cada genótipo}))}$$

O mesmo software foi utilizado para as análises estatísticas. As análises de expressão gênica foram realizadas em triplicatas biológicas e replicatas técnicas.

Quadro 1 - Iniciadores utilizados para reações de qRT-PCR dos genes *AaSERK1*, *AaPP2C* e *UBI1*.

Alvos		Iniciadores
<i>AaSERK1</i>	F	5' - GCAGTGGTGGGGGATTTTG -3'
	R	5' - CAAGGTCAAATGCCCGTTGTC -3'
<i>AaPP2C</i>	F	5' - GGCTCAGGCTGCGTTGTACTG -3'
	R	5' - GGTTCCCACCGTTTCCGATGC -3'
<i>UBI1</i>	F	5'- CCT CGT GTG CGA TTT ACG TC -3'
	R	5'- GGG CGG CTT CTG GAT TTG -3'

Abreviações: F: "Forward"; R: "Reverso"

FONTE: Jo (2012)

3.7.3 Proteômica comparativa

3.7.3.1 Extração de proteínas totais

Para extração das proteínas totais, foi utilizado o protocolo de extração modificado de Balbuena et al. (2009). Após o término de um ciclo de proliferação (21 dias), amostras (3 g peso fresco) de CEs dos genótipos R+, R e B1 (conforme classificação descrita na seção 3.6), foram maceradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em 6 ml de tampão de extração contendo 8 M Uréia, 1% de ditioneitol (DTT) (p/v), 2% Triton-X (v/v) e 1 mM fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF). Após esta etapa, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas (a 11000 rpm) por 15 min à temperatura de 4 °C e o sobrenadante coletado. Para eliminação de possíveis interferentes na amostra, o extrato protéico foi precipitado em solução de tricloro acético (TCA) à concentração final de 10% (v/v). Após 30 min de incubação à temperatura de 4 °C, as amostras foram novamente centrifugadas e o precipitado protéico lavado três vezes com acetona 80% (v/v) resfriada. O precipitado foi então ressuspensionado em 700 µl de tampão de mesma constituição do

tampão de extração. Para quantificação das proteínas totais, foi utilizado o 2-DE Quant Kit (GE Healthcare®, Waukesha, WI, EUA), segundo instruções do fabricante. As análises de proteômica comparativa foram realizadas em triplicatas biológicas.

3.7.3.2 2DE

Os géis bidimensionais (2D) foram obtidos segundo metodologia descrita por Balbuena et al. (2009), com modificações. Para preparação da amostra, alíquotas contendo 500 µg de proteínas totais foram diluídas em tampão de extração, para um volume final de 200 µl. Após a diluição, foi adicionado à solução de reidratação DTT a 1% (p/v), IPG Buffer 4-7 (GE Healthcare®) a 2% (v/v) e azul de bromofenol a 0,001% (p/v). Para a etapa de focalização isoeletrica (primeira dimensão), foram utilizadas tiras de gel de 11 cm com gradiente linear de pH de 4 a 7 (GE Healthcare®). A escolha da faixa de gradiente ocorreu em função da observação de uma maior concentração de “spots” na faixa de pH de 4 a 7 evidenciados em géis com um gradiente de pH de alta abrangência (3-10) (ANEXO B). A reidratação passiva das tiras de géis foi realizada por 12 h em unidade de IPG Phor II (GE Healthcare®). Posterior a reidratação, a focalização isoeletrica foi realizada a 20 °C, segundo as etapas: 0,5 k a 500 V, 8 h a 1000 V, 3 h a 8000 V, 20 k a 8000 V, com limite de corrente de 50 µA por tira. Após a focalização isoeletrica, as tiras de géis foram reduzidas em solução de equilíbrio (50 mM de Tris-HCl pH 8,8, 6 M de uréia, 30% de glicerol (v/v), 2% de SDS (p/v), 0,002% de azul de bromofenol (p/v)) adicionado de 125 mM de DTT e posteriormente, alquiladas em solução de equilíbrio adicionada de 125 mM de iodoacetamida. A separação por peso molecular das proteínas ocorreu em gel de poliacrilamida 12% (p/v) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) em corrente constante de 15 mA por 1 hora seguido de corrente constante de 20 mA por 5 h, em sistema vertical Ruby SE 600 (GE Healthcare®).

3.7.3.3 Coloração dos géis

Após a eletroforese, os géis 2D foram fixados por 1 h em solução 40% etanol (v/v) e 10% ácido acético glacial (v/v). Os géis foram então lavados por duas vezes em água milli-Q por 10 min e posteriormente incubados por 12 h em solução de

coloração (Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% (p/v), ácido fosfórico 2% (v/v), sulfato de amônio 10% (p/v) e metanol 20% (v/v)).

3.7.3.4 *Análise de imagens*

Os géis 2D obtidos foram digitalizados em scanner Image Scanner (GE Healthcare®) utilizando o software Labscan™ 5.0 (GE Healthcare®). Após a digitalização, os géis foram analisados no software ImageMaster™ 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare®). Os parâmetros automáticos de detecção dos “spots” foram otimizados através de análise em diferentes regiões dos géis e o isolamento, remoção ou adição de cada “spot” foi realizado manualmente quando necessário. Os mapas de “spots” obtidos foram alinhados automaticamente usando como referência, 10 “spots” presentes em todos os géis analisados. Para estabelecimento de proteínas marcadoras do potencial embriogênico de CEs foram selecionados os “spots” diferencialmente expressos entre os mapas 2D dos genótipos analisados, para posterior digestão e identificação via espectrometria de massas. Entende-se por “spots” diferencialmente expressos aqueles “spots” específicos e aqueles que apresentaram uma variação significativa ($p \leq 0,05$) no valor de porcentagem relativa de volume entre os mapas bidimensionais dos genótipos analisados

3.7.3.5 *Digestão in gel de proteínas*

A digestão *in gel* dos peptídeos foi realizada segundo metodologia descrita por Shevechenko et al. (2006). Para tanto, os “spots” de interesse foram isolados dos géis 2D, descorados em 50% ACN (v/v) e 25 mM de bicarbonato de amônio (Ambic®) seguido de desidratação em ACN 100% (v/v). Posteriormente, as proteínas foram reduzidas e alquiladas, em soluções de 50 mM de Ambic contendo 20 mM de DTT, por 40 min a 56 °C e 55 mM de iodoacetamida, por 30 min em temperatura ambiente no escuro. A digestão enzimática foi realizada pela adição de 15 ng.L⁻¹ de tripsina (Promega®, Madison, WI, EUA) a 37 °C por 14 h e a ação da enzima interrompida pela adição de solução 5% (v/v) ácido fórmico em 50% (v/v) ACN. Os peptídeos foram eluídos do gel em três etapas. A primeira eluição em solução 1% (v/v) de ácido fórmico em 60% (v/v) metanol, seguido de eluição em

solução 1% (v/v) de ácido fórmico em 50% (v/v) ACN e finalmente em ACN 100%. A solução final contendo os peptídeos tripticos foi seca em concentrador a vácuo à temperatura ambiente e os peptídeos ressuspensos em 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA).

3.7.3.6 Dessalinização e análises em espectrômetro de massas

Os peptídeos foram dessalinizados em colunas C18 de fase reversa em ponteiros ZipTip (Millipore®, Billerica, MA, EUA) previamente equilibradas, em 3 etapas, em soluções contendo 0.1% TFA (v/v) em ACN, 0.1% TFA (v/v) em 50% ACN (v/v) e 0.1% TFA (v/v) em água Milli-Q, respectivamente. Após a dessalinização, 1 µL amostra dissolvida em 50% (v/v) ACN e 1 µL ácido α-cyano-4-hidroxibenzílico foram aplicados a placa de MALDI. Os espectros de massa foram obtidos na plataforma AB SCIEX TOF/TOF 5800 (AB SCIEX®, Framingham, MA, EUA). Os intervalos de massa/carga (m/z) foram ajustados para 800 a 4000 para espectros de MS e 9 a 2500 para MS/MS. Os espectros foram calibrados externamente utilizando uma mistura contendo 4 peptídeos (des-Arg1-Bradykinina, Angiotensina I, Glu1-Fibrinopeptídeo B e Neurotensina). Os cinco picos mais abundantes nos espectros de MS foram utilizados como parâmetros de seleção para realização do MS/MS. Os espectros de MS/MS foram obtidos após fragmentação dos peptídeos via “collision induced dissociation”.

3.7.3.7 Identificação dos peptídeos

Os espectros de MS e MS/MS foram submetidos a buscas em banco de dados. As buscas foram realizadas no banco de dados NCBI 1.1. (National Center for Biotechnology Information, 2012), taxonomia Viridiplantae (plantas verdes) através do programa MASCOT v.2.4 (Matrix Science) sobre interface do software ProteinPilot (AB SCIEX®). As configurações de busca foram: 100 ppm para tolerância de massas do íon precursor e 1.5 Da para os fragmentos. Foi permitida uma falha na fragmentação da enzima tripsina. Carbamidometilação da cisteína foi adicionado como modificação fixa, oxidação da metionina e acetilação de N-terminal como modificações variáveis. Após a busca, foram aceitas as

identificações positivas as proteínas com peptídeos individuais com escore acima de 45. As sequências das proteínas identificadas como “unknown” foram alinhadas utilizando a ferramenta BLASTP. As buscas foram realizadas no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot (UniProt Knowledgebase, 2012), por meio do algoritmo blastp (protein-protein BLAST). Após a busca, foram aceitos aquelas identificações com escore máximo acima de 500, um grau de identidade máxima acima de 70%.

3.8 Análises estatísticas

Os dados quantitativos obtidos a partir da análise de PAs e proteínas totais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste T de Student, utilizando o programa Biostat 5.0 (Instituto Mamirauá). Para análise estatística da expressão relativa dos genes *AaSERK1* e *AaPP2C*, foi utilizado o programa fgStatistics (Di Rienzo, 2009).

3.9 Delineamento experimental

Figura 6 - Delineamento experimental utilizado para estabelecimento de marcadores bioquímicos e moleculares para embriogênese somática em *A. angustifolia*.

Abreviações: ES: Embrião somático; R+: Genótipo altamente responsivo; R: Genótipo responsivo; B: Genótipo com o desenvolvimento bloqueado CLAP: Cromatografia líquida de alta precisão; qRT-PCR: PCR em tempo real; 2DE: eletroforese bidimensional.

FONTE: Jo (2012).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização morfológica das culturas embriogênicas

4.1.1 *Indução e proliferação*

Após a etapa de indução, nove CEs foram estabelecidas a partir de embriões zigóticos imaturos, em meio MSG0 livre de reguladores de crescimento. Cada uma destas CEs foi induzida, a partir de um único embrião zigótico, sendo identificadas e codificadas como: MSG01, R1003, MSG06, MSG00 R12, M1004, P3, S3 e A1003. As CEs apresentam-se caracteristicamente como massas celulares compactas branco-translúcidas (Figura 7A). Após a dupla coloração do material, observou-se a presença de dois padrões celulares morfológicos distintos nas CEs. O primeiro, caracterizado por células esféricas com citoplasma denso e núcleo evidente (células embriogênicas) que reagiam positivamente com o corante acetocarmim, corando em vermelho, e o segundo, constituído por células alongadas e vacuoladas (células de suspensor), que na presença do corante Azul de Evans, coravam em azul (Figura 7B). Nas CEs, de todos os genótipos analisados, estas células estavam organizadas em agregados celulares, e onde as células embrionárias encontravam-se envoltas por células de suspensor. Estas estruturas foram caracterizadas como MPEs (Figura 7B).

Na superfície das CEs dos genótipos MSG01 e R1003, foram identificadas as ESs iniciais, caracterizados pela presença de estruturas bipolares com uma região esférica e opaca (cabeça embrionária), e uma região com células filamentosas e translúcidas (sistema de suspensor) (Figura 7C). Ao término de um ciclo de proliferação (21 dias), de um total de 30 CEs proliferadas para cada um dos nove genótipos analisados, foi possível observar a formação de ESs iniciais na superfície de três (10%) e duas (6,66%) CEs dos genótipos MSG01 e R1003, respectivamente (Tabela 1).

Figura 7 - Aspectos morfológicos das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* durante a etapa de proliferação.

A) Cultura embriogênica de *A. angustifolia* **B)** Massa pró-embriogênica de *A. angustifolia* evidenciada pela dupla-coloração azul de Evans e acetocarmim; **C)** Embrião somático inicial encontrado na superfície da culturas embriogênicas dos genótipos MSG01 e R1003. Em evidência estão a região da cabeça embrionária (*) e células de suspensor (**). Barra, 2,5 mm (**A**); 0,5mm (**B**) e 0,5mm (**C**); FONTE: Jo (2012).

Tabela 1 - Frequência de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* apresentando embriões somáticos iniciais em sua superfície.

Genótipo	Frequência (%)
MSG01	10
R1003	6,66
MSG06	0
MSG00	0
R12	0
M1004	0
P3	0
S3	0
A1003	0

Culturas embriogênicas (n=30) de nove genótipos após 21 dias de cultivo em meio de cultura MSG livre de reguladores de crescimento.

FONTE: Jo (2012).

4.1.2 Maturação

No primeiro ensaio de maturação realizado (10 meses após a indução das CEs), de um total de 15 CEs inoculadas para cada genótipo, observou-se que 10 (66%) CEs do genótipo MSG01 e 15 (100%) CEs do genótipo R1003, apresentaram o desenvolvimento de embriões globulares após dois meses em condições de maturação (ABA, PEG 4000 e maltose), caracterizado por um aumento na região da cabeça embrionária (esférica) e redução da região das células de suspensor (Figura 8A, C) (Tabela 2). Em um experimento idêntico, realizado 20 meses após a indução das CEs, a frequência de CEs apresentando o desenvolvimento de embriões globulares foi de 20% para o genótipo MSG01 e 46,6% para o genótipo R1003. Nos demais genótipos (MSG00, MSG06, R12, M1004, P3, S3, A1003), em nenhum dos dois experimentos realizados, foi possível detectar a presença de ESs globulares (Figura 8B). Após o terceiro mês em meio de maturação, apenas os ESs do genótipo MSG01 evoluíram para as etapas seguintes do desenvolvimento tardio, apresentando ESs cotiledonares iniciais, com parede lisa, coloração branco-leitosa e com início da formação dos cotilédones (Figura 8D) (Tabela 3). Os ESs do genótipo R1003, ao final do quarto mês sobre condições de maturação, apresentaram irregularidades em sua morfologia, com células de suspensor se desenvolvendo a partir da região apical do embrião somático (Figura 8E).

Após o término da etapa de maturação, os embriões cotiledonares iniciais (Figura 8D) desenvolvidos nas CEs do genótipo MSG01 foram isolados e transferidos para meios de cultura MSG, sem a adição de reguladores de crescimento, em fotoperíodo de 16 h e temperatura de 27 °C. Ao término do período de 30 dias, foi observada a morte do material, caracterizada pela total oxidação dos ESs.

Figura 8 - Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* cultivadas em meio de maturação.

A) Genótipo MSG01, após dois meses em condições de maturação (meio MSG suplementado com ABA, PEG e maltose), setas indicam ESs no estágio globular; **B)** Genótipo MSG06 após 2 meses em condições de maturação; **C)** Embrião somático no estágio globular (após 2 meses em meio de maturação); **D)** Embrião somático no estágio cotiledonar inicial (após 4 meses em meio de maturação); **E)** Embrião somático com formação irregular de células de suspensor (após 4 meses em meio de maturação). Barra: 2,5 mm (A e B); 0,4 mm(C); 1 mm(D); 0,5 mm(E).

FONTE: Jo (2012)

Tabela 2 - Frequência de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* apresentando embriões somáticos globulares na superfície durante a maturação.

Genótipos	Frequência (10 meses)	Frequência (20 meses)
MSG01	66%	20%
R1003	100%	46,6%
MSG06	0	0
MSG00	0	0
R12	0	0
M1004	0	0
P3	0	0
S3	0	0
A1003	0	0

Experimentos de maturação realizados em duas épocas distintas, 10 meses e 20 meses após a indução das culturas embriogênicas. Culturas embriogênicas (n=15) de nove genótipos 60 dias após o cultivo em meio de maturação (MSG suplementado com ABA, PEG 4000 e maltose).

FONTE: Jo (2012)

Tabela 3 - Estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. angustifolia* identificados na superfície das culturas embriogênicas dos genótipos MSG01 e R1003.

Genótipos	Embrião somático globular	Embrião somático cotiledonar inicial
MSG01	O	O
R1003	O	X

Presença (O) e ausência (X) de ESs de *A. angustifolia* nos estágio globular e cotiledonar inicial em dois genótipos 120 dias após o cultivo em meio de maturação (MSG suplementado com ABA, PEG 4000 e maltose).

FONTE: Jo (2012)

4.1.3 Classificação das culturas embriogênicas

Após a realização dos experimentos de maturação foi possível classificar os nove genótipos estabelecidos no meio MSG, com base no seu potencial embriogênico, i.e. a capacidade das CEs em apresentarem estruturas embriogênicas com uma morfologia desenvolvida durante as diferentes etapas do desenvolvimento embrionário (pró-embriogênia, embriogênese inicial e

embriogênese tardia) (Figura 5). Os genótipos MSG00, MSG06, MSG03, R12, M1004, P3, S3 e A1003, apesar de apresentarem a fase de pró-embriogênese caracterizado por estruturas morfológicas bem definidas de MPEs, não evoluíram para os estádios inicial e tardio característicos de ESs, durante a etapa de proliferação e maturação. Assim, eles foram classificados como genótipos com o desenvolvimento bloqueado (B). Os genótipos MSG01 e R1003, cujos ESs iniciais iniciaram o desenvolvimento tardio quando em condições de maturação foram classificados como genótipos responsivos (R) aos agentes promotores de maturação. Entretanto, a capacidade dos ESs do genótipo MSG01 de seguirem as fases mais avançadas do desenvolvimento tardio (ESs cotiledonares iniciais), fez com que este fosse classificado como genótipo altamente responsivo (R+) aos agentes promotores da maturação.

4.2 Estabelecimento de marcadores bioquímicos

4.2.1 PAs totais, livres e conjugadas

O conteúdo de PAs (putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm)) total, livres e conjugadas foi determinado após o término de um ciclo de proliferação (21 dias), em CEs de três genótipos com diferentes potenciais embriogênicos. Para este estudo, foram avaliados os seguintes materiais: genótipo altamente responsivo (R+), genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1), de acordo com a classificação descrita na seção 3.6.

Verificou-se que o genótipo bloqueado B1 apresentou uma quantidade, aproximadamente, quatro vezes maior de PAs totais, em relação ao genótipo altamente responsivo R+ e responsivo R (Figura 9). Esta diferença é decorrente, dos altos valores de Put, nas frações livre e conjugada, detectadas nas CEs do genótipo bloqueado B1 (Tabela 4). Foi observado que a Put, é a PA mais abundante nas CEs. Não foram detectadas diferenças significativas entre os níveis de PAs totais e Put entre os genótipos altamente responsivos R+ e genótipo responsivo R (Figura 9, Tabela 4).

Figura 9 - Conteúdo de poliaminas totais ($\mu\text{g} / \text{mg}$ massa fresca) em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Culturas embriogênicas dos genótipos altamente responsivo (R+), genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA ($p \leq 0,05$). (Média $\pm$ desvio padrão, $n=3$)

Abreviação: MF: Massa fresca.

FONTE: Jo (2012).

Tabela 4 - Conteúdo ($\mu\text{g} / \text{mg}$ massa fresca) de putrescina (Put) livre, conjugada e total de culturas embriogênicas *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Genótipo	Put		
	Livre	Conjugada	Total
R+	$3,93 \pm 0,89$ b	$4,36 \pm 0,28$ b	$8,29 \pm 0,61$ b
R	$6,53 \pm 3,35$ b	$5,79 \pm 2,22$ b	$12,32 \pm 1,24$ b
B1	$34,92 \pm 6,16$ a	$20,39 \pm 5,58$ a	$55,32 \pm 8,11$ a

Culturas embriogênicas dos genótipos altamente responsivo (R+), genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. Para cada coluna, letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA ($p \leq 0,05$). (Média $\pm$ desvio padrão $n=3$)

FONTE: Jo (2012)

A Spd foi a segunda PA mais abundante nas CEs., Não foram observadas diferenças entre a quantidade de Spd livre, conjugada e total, independentemente do potencial embriogênico dos três genótipos analisados (Tabela 5).

Tabela 5 - Conteúdo ($\mu\text{g}/\text{mg}$ massa fresca) de espermidina (Spd) livre, conjugada e total de culturas embriogênicas *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Genótipo	Spd		
	Livre	Conjugada	Total
R+	$2,56 \pm 0,38$ a	$2,74 \pm 0,44$ a	$5,30 \pm 0,79$ a
R	$3,33 \pm 1,54$ a	$3,84 \pm 1,36$ a	$7,24 \pm 0,79$ a
B1	$2,99 \pm 0,77$ a	$3,46 \pm 0,62$ a	$6,46 \pm 1,29$ a

Culturas embriogênicas dos genótipos altamente responsivo (R+), genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. Para cada coluna, as médias acompanhadas das mesmas letras não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$). (Média $\pm$ desvio padrão $n=3$)

FONTE: Jo (2012)

A Spm foi a PA menos abundante nas CEs. No genótipo R, a Spm livre não foi detectada, enquanto nos demais genótipos, não ocorreram diferenças entre os níveis de Spm livre e conjugada (Tabela 6).

Tabela 6 - Conteúdo ($\mu\text{g} / \text{mg}$ massa fresca) de espermina (Spm) livre, conjugada e total de culturas embriogênicas *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Genótipo	Spm		
	Livre	Conjugada	Total
R+	$0,94 \pm 0,36$ a	$1,15 \pm 0,99$ a	$2,05 \pm 1,07$ a
R	n.d.	$1,21 \pm 0,51$ a	$1,21 \pm 0,51$ a
B1	$0,67 \pm 0,15$ a	$1,03 \pm 1,25$ a	$1,70 \pm 1,27$ a

Culturas embriogênicas dos genótipos altamente responsivo (R+), genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. Para cada coluna, as médias acompanhadas das mesmas letras não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$). (Média $\pm$ desvio padrão $n=3$)

Abreviação: n.d.: não detectado

FONTE: Jo (2012)

Em relação à razão Put/Spd, um indicador positivo de CEs com um alto potencial embriogênico (Shoeb et al., 2001; Li e Burrit, 2003; Silveira et al., 2004; Floh et al., 2007), observou-se um maior valor nas CEs do genótipo bloqueado B1 em relação quando comparada aos valores dos genótipos altamente responsivo R+ e responsivo R (Figura 10).

Figura 10 - Razão Put/Spd total de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Culturas embriogênicas dos genótipos altamente responsivo (R+), genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA ($p \leq 0,05$). (Média $\pm$ desvio padrão, $n=3$)
 FONTE: Jo (2012).

4.2.2 Expressão do gene *AaSERK1* e *AaPP2C*

A expressão relativa do gene *AaSERK1* e *AaPP2C* foi determinado após o término de um ciclo de proliferação (21 dias), em CEs de *A. angustifolia*, pela análise de PCR em tempo real (RT-PCR), em três genótipos com diferentes potenciais embriogênicos. Para este estudo, foram utilizadas as CEs do genótipo altamente responsivo (R+), genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1), de acordo com a classificação descrita na seção 3.6.

Entre os diferentes genótipos estudados foram observadas diferenças ($p \leq 0,05$) na expressão relativa do gene *AaSERK1*. O genótipo bloqueado B1 apresentou aproximadamente metade da expressão daquela identificada para o genótipo responsivo R+. O genótipo responsivo R, por sua vez, apresentou expressão intermediária entre o genótipo R+ e o genótipo B1 (Figura 11). O mesmo padrão não foi observado para o gene *AaPP2C*, onde a expressão é similar nos diferentes genótipos estudados (Figura 12).

Figura 11 - Expressão relativa do gene *AaSERK1* durante a fase de proliferação de culturas embriogênicas *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Culturas embriogênicas dos genótipos altamente responsivo (R+), genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$). (Média $\pm$ erro padrão $n=3$)
 FONTE: Jo (2012)

Figura 12 - Expressão relativa do gene *AaPP2C* durante a fase de proliferação de culturas embriogênicas *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Culturas embriogênicas dos genótipos altamente responsivo (R+), genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$). (Média $\pm$ erro padrão $n=3$).

FONTE: Jo (2012)

4.2.3 Proteômica comparativa

O perfil do proteoma foi determinado após o término de um ciclo de proliferação (21 dias), em dois genótipos das CEs, com diferentes potenciais embriogênicos. Para este estudo, foram selecionados o genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1), de acordo com a classificação descrita na seção 3.6.

4.2.3.1 Conteúdo protéico

A Figura 13 apresenta os valores de conteúdo protéico determinados nas duas CEs avaliadas. Verifica-se que os maiores valores são observados no genótipo responsivo R, quando comparado com o genótipo bloqueado B1 (Figura 13).

Figura 13 - Conteúdo protéico total ($\mu\text{g}/\text{mg}$ massa fresca) de culturas embriogênicas *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Culturas embriogênicas dos genótipos altamente responsivo (R+), genótipo responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1), 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste T de Student ($p \leq 0,05$). (Média $\pm$ desvio padrão $n=3$).

Abreviação: MF: Massa fresca.

FONTE: Jo (2012)

4.2.3.2 Análise dos Mapas bidimensionais

A análise de imagens do géis 2D (Figura 14), realizadas a partir dos extratos protéicos permitiu quantificar o número de “spots” presentes nos géis 2D em cada um dos genótipos analisados. Observa-se que o genótipo responsivo R apresenta um maior número de “spots” (245 ± 11), quando comparado ao do genótipo bloqueado B1 (210 ± 2). Entretanto, uma similaridade em relação ao padrão de distribuição destes “spots”, com uma maior quantidade de “spots” entre as faixas de 20 a 40 quilodáltons (kDa) e 40 a 60 kDa, ocorre independentemente do genótipo (Figura 14). Ressalta-se que uma menor proporção de “spots” de alta (maiores que 80 kDa) e baixa (menores que 20 kDa) massa molecular relativa, foram observadas nos géis 2D dos dois genótipos (Figura 15).

Foram observados 130 ± 4 de “spots” comuns, o que representou em uma relação de 57%, entre os géis 2D dos dois genótipos analisados, O alinhamento dos “spots” comuns aos dois genótipos também permitiu o isolamento dos “spots”

presentes exclusivamente nos géis 2D de cada genótipo analisado. O genótipo R apresentou 122 ± 11 “spots” exclusivos, enquanto que no genótipo B1, foi possível isolar 65 ± 10 “spots” exclusivos (Tabela 7).

Figura 14 - Géis 2D de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos corados em comassie brilliant blue.

Culturas embriogênicas dos genótipos responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação.

Abreviações: pM: Peso molecular; pI: Ponto isoeletrico; kDa: quilodáltons

FONTE: Jo (2012)

Tabela 7 - Número de “spots” detectados em géis 2D de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Genótipos	n ° de “spots”		
	Detectados	Comuns	Exclusivos
R	245 ± 11 a	130 ± 4	122 ± 11 a
B1	210 ± 2 b	130 ± 4	65 ± 10 b

Culturas embriogênicas dos genótipos responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. Para cada coluna, letras diferentes indicam diferenças significativas segundo teste T de Student ($p \leq 0,05$). (Média ± desvio padrão n=3)

FONTE: Jo (2012)

Figura 15- Porcentagem de “spots” detectados nos mapas 2D, de acordo com a massa molecular relativa (kDa), de culturas embriogênicas de genótipo de *A. angustifolia* com diferentes potenciais embriogênicos.

Culturas embriogênicas dos genótipos responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação.

FONTE: Jo (2012)

4.2.3.3 Identificação de peptídeos

Visando a identificação de proteínas marcadoras do potencial embriogênico em CEs de *A. angustifolia*, 50 “spots” foram selecionados e isolados para identificação por espectrometria de massas. Destes, 23 “spots” específicos do genótipo responsivo R, 12 “spots” são específicos do genótipo bloqueado B1, e 15 “spots” comuns aos dois genótipos, porém com diferenças em relação à abundância (Figura 16). Do total de 50 “spots” selecionados para e busca seriada por MASCOT, 16 peptídeos foram identificados, o que representou um total de 32% de identificações positivas.

Figura 16 - Mapas 2D de proteínas detectadas em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Culturas embriogênicas dos genótipos responsivo (R) e genótipo bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. Setas indicam os “spots” selecionados para identificação via espectrometria de massas. As numerações correspondem a referências para identificações descritas nas tabelas 8, 9, 10 e 11. Abreviações: pM: Peso molecular; pI: Ponto isoelétrico; kDa: quilodáltons
 FONTE: Jo (2012)

A busca seriada por MASCOT dos espectros de MS/MS obtidos a partir dos “spots” exclusivos dos géis 2D do genótipo responsivo R, permitiu a identificação de oito proteínas (Tabela 8). A enzima relacionada com a síntese de PAs e etileno, S-adenosilmethionina sintase (“spot” 13), e a subunidade beta da ATPase mitocondrial (“spot” 6) foram identificadas com escore relativamente alto (108 e 104, respectivamente). Além destas, quatro proteínas hipotéticas no banco de dados NCBI (“spots” 9, 32, 35 e 36), uma proteína relacionada com a síntese protéica (elongation factor (“spot” 28), e uma proteína, predita de *Populus trichocarpa* (“spot” 11), foram identificadas positivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Proteínas identificadas a partir de “spots” presentes exclusivamente em géis 2D de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* do genótipo responsivo (R).

Spot ¹	Descrição	Organismo	Acesso ²	Escore ³
6	Mitochondrial ATPase beta subunit	<i>Nicotiana sylvestris</i>	AAD03392	104
9	Hypothetical protein OsJ_17535	<i>Oryza sativa</i>	EEE62732	76
11	Predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002301570	75
13	Full=S-adenosylmethionine synthase 3	<i>Hordeum vulgare</i>	Q4LB22	108
28	Elongation factor 2	<i>Nicotiana tabacum</i>	CAC12818	55
32	Hypothetical protein SELMODRAFT_404503	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002962607	53
35	Hypothetical protein CHLNCDRAFT_27694	<i>Chlorella variabilis</i>	EFN51866	55
36	Hypothetical protein VOLDACRAFT_84030	<i>Volvox carteri</i>	XP_002957246	54

1: Número do “spot” representado na figura 14

2: Acesso no NCBI

3: Escore total dos peptídeos baseado na probabilidade do MOWSE MASCOT

FONTE: Jo (2012)

A partir dos “spots” exclusivos dos géis 2D do genótipo bloqueado B1, três proteínas foram identificadas (Tabela 9). Os espectros de MS/MS do “spot” 38 apresentaram uma alta identidade com a subunidade F da enzima NADH desidrogenase de *Anonidium* sp. Os espectros dos “spots” 41 e 50 foram identificados como a proteína hipotética SORBIDRAFT_10g020014 de *Sorghum bicolor* e a proteína porina de *Prunus armeniaca* (“spot 50”), respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Proteínas identificadas a partir de “spots” presentes exclusivamente em géis 2D de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* do genótipo bloqueado B1

Spot ¹	Descrição	Organismo	Acesso ²	Escore ³
38	NADH dehydrogenase subunit F	<i>Anonidium</i> sp.	ABS45074	58
41	Hypothetical protein SORBIDRAFT_10g020014	<i>Sorghum bicolor</i>	XP_002438456	47
50	porin	<i>Prunus armeniaca</i>	AAD38145	66

1: Número do “spot” representado na figura 14

2: Acesso no NCBI

3: Escore total dos peptídeos baseado na probabilidade do MOWSE MASCOT

FORTE: Jo (2012)

Dos 15 “spots” comuns aos mapas 2D dos dois genótipos, porém com diferenças significativas em relação a porcentagem de volume ($p \leq 0,05$), selecionados para identificação via espectrometria de massas, foi possível obter a identificação de cinco proteínas (Tabela 10). A proteína Coq-8 biossíntese de ubiquinona (“spot” 7) foi detectada, sendo cerca de 2,7 vezes mais abundante nos mapas 2D do genótipo responsivo R em relação aos do genótipo bloqueado B1. A proteína hipotética OsJ_02281 foi detectada cerca de 3,1 vezes mais abundante nos mapas do genótipo bloqueado B1. Os “spots” 10, 15 e 45, foram identificados como “unknown” para espécie *Picea sitchensis*. Visando uma análise mais acurada da função destas proteínas e do envolvimento destas, durante a embriogênese somática de *A. angustifolia*, foi realizado um alinhamento da sequência peptídica no banco de dados Swissprot utilizando a ferramenta BLASTP por meio do algoritmo blastp (protein-protein BLAST). Após a busca, os acessos das proteínas “unknown” obtidos a partir “spots” 15 e 45 apresentaram uma alta identidade (87%) com a enzima enolase de *Hevea brasiliensis*, e a do “spot” 10 apresentou uma alta identidade (70%) com a enzima flavonona 3-hidroxilase de *Malus X domestica* (Tabela 11).

Tabela 10 - Proteínas identificadas a partir de “spots”, com variação significativa de abundância ($p \leq 0,05$), presentes em géis 2D de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Spot ¹	Descrição	Organismo	Acesso ²	Escore ³	R ⁴	B1 ⁵
7	Ubiquinone biosynthesis protein coq-8	<i>Ricinus communis</i>	XP_002533250	53	0,381 ± 0,05	0,157 ± 0,05
10	unknown	<i>Picea sitchensis</i>	ABR16337	117	0,395 ± 0,04	0,222 ± 0,01
15	unknown	<i>Picea sitchensis</i>	ABK25766	47	0,555 ± 0,26	0,194 ± 0,04
16	hypothetical protein OsJ_02281	<i>Nicotiana sylvestris</i>	EEE54834	58	0,174 ± 0,01	0,552 ± 0,12
45	unknown	<i>Picea sitchensis</i>	ABR16337	65	0,102 ± 0,05	0,504 ± 0,07

1: Número do “spot” representado na figura 14

2: Acesso no NCBI

3: Score total dos peptídeos baseado na probabilidade do MOWSE MASCOT

4: Porcentagem de volume relativo dos “spots” detectados nos mapas 2D do genótipo responsivo (R) (Média ± desvio padrão n=3)

5: Porcentagem de volume relativo dos “spots” detectados nos mapas 2D do genótipo bloqueado (B1) (Média ± desvio padrão n=3)

FONTE: Jo (2012)

Tabela 11 - Resultado dos alinhamentos via BLASTP, realizados a partir das sequências obtidas nas identificações das proteínas presentes nos “spots” 10, 15 e 45 da tabela 10.

Spot ¹	Descrição	Organismo	Acesso ²	Escore ³	E-value	Identidade Max ⁴
10	Enolase	<i>Hevea brasiliensis</i>	Q9LEJ0	780	0.0	87%
15	Flavanone 3-hydroxylase	<i>Malus domestica</i>	Q06942	511	6e-180	70%
45	Enolase	<i>Hevea brasiliensis</i>	Q9LEJ0	780	0.0	87%

1: Número do “spot” representado na figura 14

2: Acesso no NCBI

3: Escore máximo resultante de um único “High-scoring Segment Pairs” (HSP)

4: Identidade máxima obtida por um HSP

FONTE: Jo (2012)

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do potencial embriogênico das culturas embriogênicas

Em gimnospermas, o desenvolvimento do embrião zigótico é dividido em três fases: pró-embriogenia (estádios anteriores a elongação do suspensor), embriogênese inicial (estádios posteriores a elongação do suspensor e anteriores ao desenvolvimento dos meristemas apicais), e embriogênese tardia (estádios posteriores ao desenvolvimento dos meristemas apicais até o desenvolvimento dos cotilédones) (von Arnold et al., 2002). Em coníferas, a presença de MPEs, a principal característica de uma CE durante a pró-embriogenia (von Arnold et al., 2002). No presente trabalho, durante a etapa de proliferação, todas CEs estabelecidas a partir de embriões zigóticos imaturos de *A. angustifolia* apresentaram MPEs (Figura 7B). Entretanto, não foi possível observar, durante ao término da etapa de proliferação, o desenvolvimento de ESs iniciais nos genótipos bloqueados (Tabela 1) (Figura 7C). De maneira similar, este mesmo padrão foi observado para CEs de genótipos com o desenvolvimento bloqueado de *P. abies* (Smertenko et al., 2003; Stasolla et al., 2004).

A embriogênese somática é um processo complexo, onde o sucesso de cada etapa depende do desempenho adequado na etapa anterior (Zimmerman, 1993). A diferenciação de MPE para ESs exerce um papel crítico de conexão entre a fase de proliferação de MPEs e o desenvolvimento organizado do ES (Stasolla e Yeung, 2003; von Arnold et al., 2002). Segundo von Arnold et al. (2002), as CEs não devem ser submetidas à maturação antes de atingirem condições, e um estágio de desenvolvimento, apto para responder às condições de maturação. Esta situação foi observada para *P. Abies* onde as MPEs imaturas normalmente morriam quando submetidas aos agentes promotores de maturação (Filonova et al., 2000). No presente trabalho, as CEs dos genótipos bloqueados, quando transferidos para meios de cultura suplementados com agentes promotores de maturação (ABA, PEG 4000 e maltose), não apresentaram o desenvolvimento tardio de ESs. A partir destas observações, é possível sugerir que durante a etapa de proliferação, as estruturas embriogênicas destes genótipos não estariam aptos, ou não teriam atingindo um

grau de desenvolvimento, para responder aos agentes de maturação, e iniciar o desenvolvimento tardio dos ESs.

Os dois genótipos (R+ e R), onde foi evidenciado ao final da etapa de proliferação, ESs iniciais (Figura 7C) (Tabela 1), apresentaram o desenvolvimento tardio de ESs quando transferidos para meios de culturas suplementados com agentes promotores de maturação (Tabela 2). A partir destas observações, é possível sugerir que a presença de ESs iniciais bem desenvolvidos, durante a etapa de proliferação, apresente-se como um indicativo da responsividade, dos ESs de *A. angustifolia*, às condições de maturação. Entretanto, como observado para outras espécies, a presença de ESs iniciais bem desenvolvidos não é certeza do sucesso da evolução tardia e posterior deste durante a etapa de maturação (Floh et al 2007; Stasolla e Yeung, 2003).

Em coníferas, um evento importante que ocorre durante a maturação do ESs é o completo desenvolvimento dos meristemas apical e radicular (von Arnold et al., 2002; Stasolla e Yeung, et al., 2003). As deformidades observadas, nas regiões das cabeças embrionárias dos ESs do genótipo R, após três meses em meios de maturação (Figura 8E), sugerem a ocorrência de distúrbios ao longo da diferenciação do meristema apical. Em *P. abies* foi identificado que, o desenvolvimento organizado do meristema apical, é fortemente controlado pelo genótipo do explante (Yeung et al., 1998). De maneira mais ampla, nas coníferas, uma grande variação na arquitetura dos meristemas durante a embriogênese somática está relacionada com a dependência do genótipo (Stasolla e Yeung, 2003). O acúmulo de etileno, em ESs de *P. abies*, também foi referido como responsável pela existência de meristemas apicais pouco desenvolvidos (Kong e Yeung, 1994). Este padrão alterado de diferenciação do meristema apical seria decorrente da existência de grandes espaços intercelulares, na região meristemática de ESs de *P. abies* (Kong e Yeung 1994; Stasolla e Yeung, 2003). Embora o desenvolvimento do meristema seja controlado pelo genótipo, von Arnold et al. (2005), sugerem que a incapacidade de muitos genótipos de apresentarem ESs cotiledonares bem desenvolvidos está associada às condições inapropriadas de cultivo. Neste sentido, estudos visando à otimização das condições de maturação, para os genótipos R e R+, poderiam resultar em um maior número e qualidade de embriões somáticos, ao término da etapa de maturação.

A partir das observações iniciais, referentes às respostas de evolução das CEs, foram estabelecidos e caracterizados os genótipos de *A. angustifolia* utilizados no presente trabalho. Ressalta-se que estes genótipos possuem diferentes capacidades e potenciais embriogênicos, mesmo quando submetidos às mesmas condições durante as etapas de indução, proliferação e maturação (Figura 5). A caracterização destes genótipos possibilita a busca de diferentes marcadores, que possam ser utilizados para seleção das CEs, precocemente ou ao longo do processo de embriogênese somática de *A. angustifolia*.

5.2 Marcadores bioquímicos associados ao potencial embriogênico

5.2.1 PAs

A competência para embriogênese somática é regulada por fatores intra e extracelulares, e dentre eles destacam-se as PAs. Em diversas espécies vegetais, este grupo de substâncias, tem sido referido como fundamental para os processos de desenvolvimento, incluindo a diferenciação celular durante a embriogênese somática (Bais e Havishankar 2002; Li e Burrit 2003; Santa-Catarina et al., 2007; Shueb et al., 2001; Silveira et al., 2004; Steiner et al., 2007). No presente trabalho, os genótipos que apresentaram o desenvolvimento de ESs, ou seja, R+ e R apresentaram valores menores de PAs totais, quando comparados ao genótipo bloqueado B1 (Figura 9). Estes resultados sugerem uma relação inversa entre os níveis de PAs totais e o potencial para formação de ESs em CEs de *A. angustifolia*. Um padrão semelhante foi observado para outras espécies. CEs de *Pinus nigra*, com um alto potencial embriogênico apresentaram valores menores de PAs quando comparadas com aquelas que apresentavam um baixo potencial embriogênico (Noceda et al., 2009). Em *O. sativa*, linhagens com alto potencial regenerativo apresentaram níveis menores de PAs totais quando comparados a linhagens recalcitrantes, ou seja, linhagens incapazes de formarem ESs (Shueb et al., 2001). Em *Saccharum* spp., CEs apresentaram níveis menores de PAs totais quando comparadas a culturas não embriogênicas (Fim, 2012; Nieves et al., 2003;). Entretanto, um padrão distinto foi observado em outras espécies, como em *D. glomerata* (Li e Burrit, 2003), *S. melongena* (Yadav e Rajam, 1998) e *Nicotiana*

tabacum (Altamura et al., 1993), onde níveis elevados de PAs totais foram relacionados à alta competência embriogênica.

As diferenças detectadas nos diferentes genótipos analisados, quanto aos níveis de PAs totais, são decorrentes dos altos valores de Put, na forma livre e conjugada, observados em CEs do genótipo bloqueado (Tabela 4). Estes resultados são similares aos observados em *P. nigra*, *Quercus ilex* e *Saccharum spp* onde, altos níveis de Put foram relacionados à incapacidade das culturas de formarem ESs (Fim, 2012; Mauri e Manzanera, 2011; Noceda et al., 2009). Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que baixos valores de Put estariam relacionados a um alto potencial embriogênico em CEs de *A. angustifolia*. Interessantemente, foi observado que em linhagens transgênicas de *D. carota* com elevada produção de Put, mas não Spd e Spm, apresentaram uma maior frequência de ESs quando comparados ao controle (Minocha et al., 1995).

A Spd se apresenta como a PA mais importante durante o desenvolvimento tardio do ES (Stasolla e Yeung, 2003). Embora não se conheça os mecanismos de ação da Spd durante o desenvolvimento do ES, sugere-se que ela esteja envolvida em vias de diferenciação e progressão da evolução morfogênica dos ESs (Flohe et al., 2007; Silveira et al., 2006). Em *P. glauca* e *P. radiata*, um aumento expressivo de Spd foi observado após a transferência das CEs para meios de cultura suplementados com agentes de maturação (Kong et al., 1998; Minocha et al., 1999;). Elevados níveis de Spd, decorrentes de uma ativação na sua biossíntese, poderiam estar associados às altas taxas de conversões de ESs (Flohe et al., 2007). CEs de *Cyphomandra betacea*, apresentaram uma maior expressão do gene que codifica para Spd sintase, quando comparada a culturas não embriogênicas (Correia et al., 2012). Em *P. abies*, foi observado que linhagens embriogênicas apresentaram valores de Spd mais elevados quando comparados a linhagens não embriogênicas (Santanen e Simola, 1992). Este mesmo padrão foi observado em outras espécies como, *P. radiata* (Minocha et al., 1999), *M. sativa* (Cvikrová et al., 1999), *Panax ginseng* (Monteiro et al., 2002) e *Saccharum spp.* (Fim, 2012). Entretanto, no presente trabalho, não foi possível observar uma relação, entre os níveis de individuais de Spd livre e conjugada, com o potencial embriogênico de CEs de *A. angustifolia* (Tabela 5).

A Spm foi a PA menos abundantes em todos os genótipos analisados (Tabela 6). Um padrão semelhante foi observado em outras espécies, onde baixas concentrações de Spm foram detectadas em CEs de *P. radiata* (Minocha et al., 1999), *O. odorifera* (Santa Catarina et al., 2004), *P. taeda* (Silveira et al., 2004). Durante a embriogênese zigótica de *A. angustifolia*, um elevado acúmulo de Spm ocorre, após o desenvolvimento dos cotilédones até o final do desenvolvimento da semente, indicando uma maior atividade de biossíntese desta poliamina nas etapas subsequentes ao desenvolvimento tardio do embrião zigótico (Astarita et al., 2003). Esse fato poderia explicar, ao menos parcialmente, os baixos níveis de Spm livres detectados em todas CEs dos genótipos de *A. angustifolia* analisados.

Além dos valores absolutos de cada uma das PAs isoladas, a razão Put/Spd é utilizada como um indicador de que CEs possuem um alto potencial embriogênico (Li e Burrit, 2003; Santa Catarina et al., 2006; Shoeb et al., 2001; Silveira et al., 2004; Floh et al 2007). Shoeb et al. (2001), sugerem que baixas razões de Put/Spd são críticas para o desenvolvimento do ES de *O. sativa*. No presente trabalho, CEs do genótipo bloqueado B1 apresentaram um maior valor na razão Put/Spd, quando comparado aos genótipos altamente responsivos R+ e responsivos R (Figura 10). Um mesmo perfil foi observado em *S. melongena* (Yadav e Rajam, 1998), *M. sativa* (Huang et al., 2001), *O. sativa* (Shoeb et al., 2001), *D. glomerata* (Li e Burrit, 2003) e *Saccharum spp.* (Fim, 2012), onde CEs de linhagens com um alto potencial embriogênico apresentaram uma razão Put/Spd menor quando comparadas a linhagens com um baixo potencial embriogênico e linhagens não embriogênicas. Durante a etapa de proliferação, CEs de *P. abies* aptas a formarem ESs não apresentaram diferenças significativas entre os valores de Put e Spd (Malá et al., 2009). Em *O. sativa*, uma alta razão Put/Spd foi detectada em CEs cultivadas por longos períodos que perderam a sua capacidade regenerativa (Shoeb et al., 2001). Com base nestas observações, podemos sugerir a utilização da razão Put/Spd como um marcador do potencial embriogênico para os genótipos de *A. angustifolia*. Assim, uma baixa razão caracteriza CEs aptas a iniciar o desenvolvimento do ES quando em contato com agentes promotores de maturação. É importante salientar que embora a relação da razão Put/Spd com o potencial embriogênico de CEs foi reportada para diversos modelos de angiospermas, para gimnospermas, como o caso da *A. angustifolia*, relatos são inéditos.

De acordo com Klimaszewska et al. (2009) uma redução nos valores de Put e aumento nos níveis de Spd está associado com um estado mais diferenciado da CE. Em coníferas, o desenvolvimento do ES está positivamente relacionado com o aumento nos níveis de Spd e decréscimo nos níveis de Put (Minocha et al., 1999). Pode-se sugerir que a incapacidade das CEs dos genótipos bloqueados de apresentarem o desenvolvimento de ESs, durante a etapa de maturação, é decorrente da ausência de diferenciação e/ou condições fisiológicas para que as estruturas embriogênicas destes genótipos evoluam, quando submetidas às condições de maturação. A presença de uma quantidade de Put maior em relação aos níveis de Spd no genótipo bloqueado sugere que as estruturas embriogênicas deste genótipo estariam menos aptas ao desenvolvimento quando comparadas ao genótipo responsivo e genótipo altamente responsivo.

Uma relação entre a razão Put/Spd e o potencial regenerativo da CE sugere que o potencial regenerativo poderia ser manipulado pela otimização da razão Put/Spd. Em CEs de *A. angustifolia*, a suplementação do meio de cultura com Spd durante a etapa de proliferação, resultou em maiores valores de Spd endógena, menor crescimento celular e maior evolução morfológica das MPEs quando comparadas ao controle (Silveira et al., 2006). Em *D. Carota* e *O. sativa*, foi observado que o decréscimo dos níveis de Put, pela adição de inibidores de síntese de Put, ou tratamentos que otimizaram a razão Put/Spd, aumentaram a conversão de ESs em plantas (Shoeb et al., 2001). Em *Allium cepa*, a adição de Spd estimulou a maturação e a conversão de embriões em plantas (Martínez et al., 2000).

Em conjunto, estas observações sugerem que as PAs estão relacionadas com o desenvolvimento de ESs em *A. angustifolia*, e que estes reguladores de crescimento, poderiam ser utilizados como biomarcadores da seleção de genótipos aptos a iniciarem o desenvolvimento tardio de ESs quando transferidos a meios de culturas suplementados com agentes de maturação. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas para a manipulação do potencial regenerativo de CEs de *A. angustifolia* pela otimização dos conteúdos endógenos de PAs.

5.2.2 Expressão dos genes *AaSERK1* e *AaPP2C*

No presente trabalho, foi possível observar que, durante a etapa de proliferação, CEs de *A. angustifolia* do genótipo altamente responsivo, apresentaram expressão relativa do gene *AaSERK1* maior, quando comparado as CEs do genótipo bloqueado. As CEs do genótipo responsivo apresentaram uma expressão relativa intermediária entre o as CEs do genótipo altamente responsivo e do genótipo bloqueado (Figura 11). Como já salientado anteriormente, as CEs dos genótipos bloqueados não estariam aptas a responderem a evoluírem no processo de embriogênese quando submetidas às condições de maturação. As diferenças encontradas, quanto à expressão do gene *AaSERK1*, poderiam refletir essas diferenças no potencial para a embriogênese nos diferentes genótipos analisados. Sustentando esta hipótese, Somleva et al. (2000), observaram um aumento nos níveis de transcritos de *DcSERK1* em ESs de *D. glomerata*, que completaram a transição de MPE para ES. Em *C. nucifera*, um pico da expressão do gene *CnSERK1* foi observado quando as CEs estavam aptas a formação de ESs (Perez-Nunez et al., 2009).

Analisando-se a sequência do gene homólogo de SERK de *A. angustifolia*, Steiner et al. (2012) observaram que a proteína codificada por este gene possui uma alta homologia com aquelas detectadas em angiospermas. Esta proteína pertence à família de quinases, do tipo receptoras, com um domínio extracelular, rico em repetições de leucina (LRR-RLKs). Um provável papel das LRR-RLKs em plantas é a tradução de sinais do ambiente e/ou informações das células vizinhas, iniciando repostas específicas durante o processo de desenvolvimento (Sasaki et al., 2007). Estas proteínas podem agir como receptores transmembrânicos de sinais, sendo cruciais para o início da embriogênese somática (Yang e Zhang, 2010). A correta percepção dos estímulos externos durante as diversas etapas da embriogênese somática é considerada crítica para a correta evolução do desenvolvimento do ES. Em *A. thaliana*, o gene *AtSERK1* é característico das células capazes de responder ao sinais hormonais e competentes a formarem embriões somático (Namasivayam et al., 2007). Situação similar pode ser verificado nas células competentes para a embriogênese de *O. catharinensis*, cultivadas em condições indutoras do processo de embriogênese somática (Santa-Catarina et al., 2007). Assim, as observações

acima sugerem que os diferentes potenciais embriogênicos e a expressão diferencial do gene *AaSERK1*, observados nos genótipos analisados, poderiam ser reflexos das diferentes capacidades das estruturas embriogênicas destes genótipos de traduzir de maneira adequada aos sinais externos durante o desenvolvimento do ES.

O gene *SERK* foi caracterizado como marcador de células competentes à formação de ESs em muitas espécies vegetais, como *D. carota* (Schmidt et al., 1997), *A. thaliana* (Hetch et al., 2001; Salaj et al., 2008), *M. truncatula* (Nolan et al., 2003), *C. nucifera* (Perez-Nunez et al., 2009), *O. catharinensis* (Santa Catarina et al., 2004), *Helianthus annuus* (Thomas et al., 2004), *O. sativa* (Hu et al., 2005), *Solanum tuberosum* (Sharma et al., 2008), *Vitis vinifera* (Schellembaum et al., 2008), *Cyclamen persicum* (Savona et al., 2012), *Secale cereale* (Gruszczyńska et al., 2011), e *Anana comasus* (Ma et al., 2012). Além do grau de diferenciação das estruturas embriogênicas, pode-se supor que, as diferenças observadas, quanto à expressão do gene *AaSERK1*, seriam decorrentes do número de células competentes presentes nas CEs nos vários genótipos analisados.

A competência embriogênica, freqüentemente, está restrita a um grupo limitado de células ou agregado celulares dentro de uma CE (Maillot et al., 2009; Quiroz-Figueroa et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2007; Savona et al., 2012; Schmidt et al., 1997; Somleva et al., 2000). Durante a proliferação de CEs, os calos embriogênicos contêm tipos celulares morfologicamente e bioquimicamente distintos e somente alguns grupos celulares darão origem a ESs (Santa Catarina et al., 2007; Savona et al., 2012; Schmidt et al., 1997; Somleva et al., 2000; van Engelen e De Vries, 1992). Assim, a expressão diferencial do gene *AaSERK1* entre os genótipos analisados, poderia estar relacionada com a quantidade de células competentes ao processo de embriogênese somática presentes nas CEs. Em coníferas, os ESs são formados a partir da diferenciação de MPEs, compostas por células embrionárias e células de suspensor (Filonova et al., 2000; von Arnold et al., 2002). Verificou-se que, nas MPEs a expressão do gene *SERK1* ocorre apenas na região das células embrionárias, não sendo identificadas no suspensor (Savona et al., 2012; Somleva et al., 2000). Steiner et al. (2012), observaram que, em CEs de *A. angustifolia*, a expressão da *AaSERK1* ficou restrita às regiões periféricas, local este onde a maior parte das células embrionárias está localizadas. Entretanto, no presente trabalho, utilizando-se a dupla coloração, carmin acético e azul de Evans, não foram

verificadas diferenças quanto ao número de MPEs e células embrionárias, nos diferentes genótipos avaliados. Um estudo utilizando o isolamento por gradiente de Ficoll (Colova et al., 2007) ou a expressão *in loco*, como hibridização *in situ* entre os diferentes genótipos analisados, poderão trazer novas informações da utilização da expressão do gene *AaSERK1* como marcadora do potencial embriogênico em *A. angustifolia*.

No presente trabalho, não foram identificadas diferenças na expressão do gene *AaPP2C*, nos diferentes genótipo analisados (Figura 12), o que não permite a sua utilização como marcador do , potencial embriogênico de *A. angustifolia*. Em angiospermas e gimnospermas, alterações nos níveis endógenos de ABA ocorrem durante o desenvolvimento do embrião zigótico (Pieruzzi et al., 2011; Silveira et al., 2008). Durante o desenvolvimento da semente o regulador de crescimento ABA está envolvido na maturação do embrião, inibição da germinação precoce, síntese de proteínas de reserva e proteínas LEA e iniciação da dormência da semente (Xiong e Zhy, 2003). Durante a embriogênese somática de coníferas, a presença do ABA foi sugerida como essencial na inibição da proliferação celular e promoção da maturação sincronizada de ESs (Stasolla e Yeung, 2003; von Arnold et al., 2002). Assim, para o desenvolvimento da ESs em coníferas, a aplicação exógena de ABA tem sido considerada essencial (Attre e Fowke, 1993; Stasolla et al., 2002). Resultados revelam, entretanto, que o desenvolvimento do ES em resposta a aplicação exógena de ABA é genótipo dependente (Find et al., 1998; Jalonen e von Arnold, 1991; Thompson e von Aderkas, 1992).

Estudos com mutantes de *A. thaliana* para os genes ABI1, que codificam para proteínas homólogas as fosfatases de serina/treonina do tipo 2C (PP2C) apresentavam uma alteração nas respostas induzidas pelo ABA, como dormência de sementes e abertura de estômatos (Bertauche et al., 1996; Leung et al., 1994, 1997; Meyer et al., 1994; Rodriguez et al., 1998) e uma hipersensitividade nas respostas ao ABA, sugerindo um papel de regulação negativa nas respostas deste fitormônio (Gosti et al., 1999). Foi observado que a abundância do gene ABI1 é aumentada em tratamentos com o ABA (Leung et al., 1997), sugerindo um *feedback* negativo na regulação da expressão do gene ABI1 (Gosti et al., 1999). No presente trabalho, a partir de ensaios preliminares, foi possível verificar um aumento da expressão do gene *AaPP2C* em CEs de *A. angustifolia* quando transferidos a meios de cultura

suplementados com ABA (ANEXO C). Este resultado sugere que um homólogo de proteínas PP2C em *A. angustifolia*, possa estar atuando nas respostas induzidas pelo ABA durante a etapa de maturação do ES. Avaliações quantitativas, através da análise de qRT-PCR, da expressão do gene *AaPP2C* durante a etapa de maturação das CEs dos genótipos poderão esclarecer possíveis relações deste gene com o desenvolvimento tardio do ES em *A. angustifolia*.

5.2.3 Proteômica comparativa

5.2.3.1 Variação no conteúdo de proteínas total

No presente trabalho, o genótipo responsivo aos agentes de maturação apresentou maior abundância de proteínas, fato evidenciado pela maior quantidade de proteínas totais (Figura 13) e distribuição de “spots” nos mapas 2D (Tabela 7), quando comparado ao genótipo com o desenvolvimento bloqueado. Um padrão semelhante ocorre em outros sistemas vegetais, como em *Saccharum spp.*, onde CEs apresentaram níveis de proteínas totais maiores quando comparados a culturas não embriogênicas (Fim, 2012). Oropeza et al. (2001), observaram que diferenças nos níveis de proteínas totais entre CEs e não-embriogênicas, estariam relacionados a uma maior atividade metabólica nas CEs, com maiores teores de proteínas, RNA mensageiro, e outros componentes citoplasmáticos. Embora uma maior quantidade de proteínas total foi detectada no genótipo responsivo, diferenças quanto ao número de RNA total não foram detectadas entre os diferentes genótipos analisados (ANEXO D). As diferenças relacionadas aos níveis de proteínas totais poderiam ser reflexo de uma maior atividade metabólica do genótipo responsivo, decorrentes da evolução no processo de embriogênese somática. Os resultados obtidos sugerem que, os níveis de proteínas totais poderiam ser candidatos a marcadores, e serem utilizados como indicadores de genótipos, cujas CEs apresentam o desenvolvimento de ESs. Uma análise qualitativa das proteínas envolvidas com o potencial embriogênico é necessária para a identificação de proteínas marcadoras para embriogênese somática em *A. angustifolia*.

5.2.3.2 Identificação de proteínas

No presente trabalho, 50 “spots” dos géis 2D, foram selecionados e isolados para identificação por espectrometria de massas (Figura 16). Destes, 16 foram identificadas positivamente, o que representou 32% de “spots” identificados. Uma das dificuldades associada ao estudo do proteoma de espécies não seqüenciadas é a baixa representividade em banco de dados, resultando em identificações baseadas em homologia (Balbuena, 2009). *A. angustifolia* é uma espécie cujo genoma não foi seqüenciado, e para qual existem somente 13 proteínas depositadas em banco de dados, o que dificulta os estudos do proteoma da espécie.

É importante ressaltar que melhorias nas etapas de manipulação das amostras, como: condições de purificação, qualidade do gel, extensão e viabilidade dos bancos de dados utilizados e utilização de técnicas de espectrometria de massas mais acuradas, podem melhorar a qualidade e quantidade das identificações peptídicas, sobretudo naqueles estudos do proteoma de espécies não seqüenciadas (Rode et al., 2011).

5.2.3.2.1 Proteínas específicas do genótipo responsivo

O seqüenciamento das proteínas presentes exclusivamente nos géis 2D do genótipo que apresentou o desenvolvimento inicial e tardio de ESs no meio de maturação, permitiu a identificação de oito proteínas com potencial de utilização como marcadoras do potencial embriogênico em *A. angustifolia* (Tabela 8).

O “spot” seis foi identificado como sendo uma subunidade β da ATPase mitocondrial. Esta proteína foi identificada como marcadora do estágio maturo de embriões zigóticos de *A. angustifolia* (Silveira et al., 2008). A observação exclusiva de uma enzima envolvida na catabolização do ATP sugere que um maior metabolismo energético nas CEs do genótipo responsivo em relação ao genótipo bloqueado ao fim da etapa de proliferação (21 dias). A embriogênese somática é um processo morfogenético que necessita de altas quantidades de energia (Martin et al., 2000), assim, a maior atividade de enzimas relacionadas com o metabolismo energético poderia explicar as diferenças encontradas entre o desenvolvimento do ES nas CEs dos genótipos responsivo e bloqueado.

No presente trabalho, a proteína identificada a partir do “spot” 13, S-adenosilmetionina sintase, foi detectada exclusivamente em géis 2D do genótipo responsivo aos agentes de maturação. Esta proteína já foi caracterizada como marcadora do desenvolvimento inicial de ESs de coníferas, como em *P. glauca* onde uma maior abundância desta proteína durante os estádios iniciais do ES foi observada (Lippert et al., 2005). Em *P. abies*, linhagens que apresentaram um bloqueio na transição de MPEs para ESs iniciais, apresentaram menores valores de transcriptos desta enzima quando comparadas com linhagens com o desenvolvimento normal do ES (Stasolla et al., 2004). Recentemente, esta proteína foi detectada durante as três fases de desenvolvimento (pró-embriogenia, embriogênese inicial e embriogênese tardia) do embrião zigótico de *A. angustifolia* (Balbuena, 2009). Em conjunto com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se propor a utilização desta proteína como uma marcadora do potencial embriogênico em CEs de *A. angustifolia*.

A SAM sintase converte o aminoácido metionina a uma molécula de SAM. A SAM sintetizada a partir desta enzima, é a doadora de grupos metil ao sistema de metilação do DNA pela metiltransferase dependente de SAM (Moffatt et al., 2002; Weretilnyk et al., 2001). A metilação do DNA é um evento essencial durante a morfogênese e proliferação em modelos de embriogênese somática (Causevic et al., 2005; Lo Schiavo et al., 1989; Noceda et al., 2009). Altos níveis de metilação durante o desenvolvimento do ES foram relacionados com inúmeros eventos, incluindo modelação da cromatina, expressão gênica seletiva e crescimento do ES (Stasolla et al., 2004).

A partir dos dados apresentados neste trabalho, podemos sugerir que as diferenças no potencial embriogênico, entre os genótipos responsivos e bloqueados se daria devido a um maior grau de metilação do DNA, evidenciado pela presença exclusiva da enzima SAM sintase, em CEs do genótipo responsivo. Outros estudos corroboram esta proposta. Em *D. carota*, o desenvolvimento normal do ES foi associado com um aumento nos níveis de SAM e metilação do DNA (Munksgaard et al., 1995). Em linhagens embriogênicas de *Cucurbita pepo*, altos níveis de metilação do DNA foram correlacionados com a capacidade de desenvolvimento inicial do ES (Leljak-Levanic et al., 2004). Por outro lado, em *P. nigra*, linhagens não-embriogênicas possuíam valores maiores de metilação do DNA quando comparados

a linhagens embriogênicas (Noceda et al., 2009). Uma avaliação quantitativa nos níveis de metilação do DNA nas CEs dos genótipos analisados no presente trabalho nos permitiria um detalhamento da relação desta enzima e o grau de metilação do DNA com o potencial embriogênico de CEs de *A. angustifolia*.

Além de atuar no sistema de metilação do DNA, a enzima SAM sintase possui um papel chave nas rotas de biossíntese de PAs e etileno, as quais reconhecidamente são antagônicas (Figura 3) (Baron e Stasolla 2008; Dias et al., 2010; Hu et al., 2006; Minocha e Minocha, 1995; Scaramagli et al., 1999; Torrigiani et al., 2003). Durante a embriogênese, a supressão da biossíntese de etileno coincide com a ativação da biossíntese de PAs dependente de ABA (Baron e Stasolla, 2008). Em *D. carota*, foi relatado que a interação entre as rotas de biossíntese de PAs e etileno é um fator fundamental da regulação da embriogênese somática (Galston e Sawhney, 1990).

A síntese de PAs já foi descrita em diversos sistemas vegetais tendo sido tema de revisão de vários trabalhos (Figura 3) (Baron e Stasolla, 2008). Em plantas, a síntese de Put se dá pela descarboxilação da arginina e ornitina, pela enzima ADC e ODC. A diamina Put é convertida à triamina Spd através da incorporação de um grupo aminopropil pela enzima Spd sintase. A repetitiva incorporação de um grupo aminopropil à molécula de Spd pela Spm sintase, dá origem à tetramina Spm. O doador de grupos aminopropil para este sistema é a SAM descarboxilada, originada a partir da descarboxilação da SAM. A expressão diferencial desta enzima, entre os genótipos responsivo e bloqueado de *A. angustifolia*, poderia explicar as diferenças encontradas em relação ao conteúdo de PAs avaliados. Os genótipos bloqueados apresentaram maiores valores na razão Put/Spd, quando comparados com os genótipos altamente responsivos e responsivos (Figura 10). A ausência da enzima SAM sintase, no genótipo bloqueado, sugerem que os altos valores da razão Put/Spd neste genótipo, poderiam ser decorrentes de uma menor atividade de SAM, e conseqüentemente, uma menor disponibilidade de grupos aminopropil, para conversão de Put em Spd e Spm.

A SAM também é utilizada como substrato para a síntese do hormônio gasoso etileno (Loenen, 2006), amplamente estudado e caracterizado por atuar em diferentes fases do crescimento e desenvolvimento vegetal (Abeles et al., 1992; Dias et al., 2009). Entretanto, a influência do etileno, durante a embriogênese somática,

não está totalmente esclarecida, freqüentemente com resultados contraditórios nos diversos sistemas vegetais. Em *P. abies*, altos níveis de etileno, em culturas não embriogênicas foram observados em relação à CEs (Wann et al., 1989). Ainda neste mesmo sistema, altas concentrações de etileno diminuíram a qualidade dos ESs, como resultado da formação de espaços intercelulares no ápice caulinar, resultando em baixas porcentagens de conversões em plântulas (Kong e Yeung, 1994). Em *Brassica napus*, foi observado que a inibição da produção de etileno aumentou a freqüência de ESs produzidos a partir de micrósporos (Leroux et al., 2009). Por outro lado, o etileno foi correlacionado positivamente com o desenvolvimento de ESs. Em *P. sylvestris*, durante as fases do desenvolvimento dos ESs, linhagens com um alto potencial embriogênico apresentaram maiores conteúdos de etileno quando comparados a linhagens com baixo potencial embriogênico (Lu et al., 2011). Em *M. truncatula* e *M. sativa*, a utilização de inibidores de receptores do etileno, durante a etapa de proliferação, resultou em uma menor evolução das células embriogênicas (Kepczynska e Zielinska, 2011; Mantiri et al., 2008). A partir de um ensaio realizado em *Picea marian*, foi observado que linhagens com um baixo potencial embriogênico apresentaram uma produção subótima de etileno (El Meskaoui e Tremblay, 2001).

Os resultados apresentados no presente trabalho, em conjunto com os relatos bibliográficos, sugerem que a ausência do desenvolvimento do ES, no genótipo bloqueado de *A. angustifolia*, poderia ser decorrente de uma menor síntese de etileno, fato evidenciado pela ausência da enzima SAM sintase neste genótipo. Confirmando esta proposta, observou-se, que ao término da etapa de proliferação, os genótipos que apresentaram o desenvolvimento de ESs possuíam níveis elevados de etileno, enquanto que os genótipos com o desenvolvimento bloqueado não foi detectado este regulador de crescimento (Dados não publicados).

O “spot” 28 foi identificado como a proteína fator de alongamento II (FA-II). Este fator é essencial para síntese de proteínas, catalisando a translocação ribossomal dependente de GTP, e mediando a etapa do alongamento da cadeia peptídica (Proud 1994). Esta proteína foi detectada em baixa abundância em todos os estádios do desenvolvimento do embrião zigótico de *A. angustifolia* (Balbuena et al., 2009). Altos níveis de transcriptos, de uma outra proteína pertencente a classes dos fatores de alongamento, o fator de alongamento 1- α (FA1- α), foi detectado exclusivamente em ESs, no estágio globular de *D. carota* (Kawahara et al., 1992).

Esta proteína tem sido relacionada como uma intensa atividade na divisão celular (Chugh e Kurana, 2002). Em *P. abies*, a incapacidade de alguns genótipos de formarem ESs durante a maturação estaria relacionada com uma redução na expressão do gene responsável por este fator (FA1- α). Genótipos aptos a evoluírem em ESs, durante a maturação, apresentaram uma expressão elevada deste gene durante a embriogênese inicial (Wang et al., 2009).

Na maioria das espécies vegetais, como é o caso de *O. catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2006) e *P. taeda* (Silveira et al., 2004), o desenvolvimento do ES é caracterizado por um acúmulo de proteínas, em particular as proteínas de reserva. Em *A. angustifolia*, foi observado um aumento de até 17 vezes no acúmulo de proteínas, ao término do desenvolvimento do embrião zigótico (Balbuena et al., 2009). Assim, pode ser sugerido que a incapacidade das CEs, dos genótipos bloqueados, em apresentarem o desenvolvimento dos ESs, poderia estar relacionada com distúrbios na síntese *de novo* de proteínas. Corroborando esta hipótese, observou-se, no presente trabalho, que ao término da etapa de proliferação, os genótipos bloqueados apresentaram níveis menores de proteínas totais quando comparados ao genótipo responsivo (Figura 13).

5.2.3.2.2 Proteínas específicas do genótipo bloqueado

A estratégia de identificação dos “spots” exclusivos a partir de géis 2D do genótipo bloqueado de *A. angustifolia*, teve como objetivo a identificação de proteínas que estariam relacionadas com o bloqueio do desenvolvimento do ES.

O “spot” 38 foi identificado como a enzima NADH desidrogenase (Tabela 9). A NADH desidrogenase é a primeira enzima da cadeia de transporte eletrônico mitocondrial, catalisando a oxidação do NADH e a redução da coenzima Q. Além da sua função na cadeia respiratória, alguns autores relatam a atividade desta enzima, com a prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) na mitocôndria (O'Donnel et al., 2011; Moller, 2002; Petrusa et al., 2009). As ERO são importantes moléculas sinalizadoras que atuam nas respostas das plantas aos estresses bióticos e abióticos (Delledone et al., 2001), e no processo de formação de ESs de coníferas (Zhang et al., 2010). Em particular, o acúmulo desta classe de moléculas na mitocôndria resulta na ativação da morte celular programada (MCP)

em células vegetais (Hoeberichts e Woltering, 2002; Vianello et al., 2007). Conforme demonstrado em soja, o aumento na concentração de ERO induziu a MCP (Casolo et al., 2005).

A MCP é um evento crucial para o desenvolvimento normal do ES de coníferas (Bozhkov et al., 2002) e é fundamental durante a transição de MPEs para ES, e a degeneração das células de suspensor no início do desenvolvimento tardio do ES (Bozhkov et al., 2002; Filonova et al., 2000). A inibição deste processo de MCP das MPEs reprime a morfogênese do ES de *P. abies* (Bozhkov et al., 2002). Neste mesmo sistema, foi observado que linhagens que apresentaram um bloqueio na transição de MPEs para ES possuíam um mecanismo de MCP deficiente (Smertenko et al., 2003; van Zyl et al., 2003).

O destino da célula vegetal durante a MCP é controlada por um equilíbrio entre fatores pró-apoptóticos (em particular, ERO) e anti-apoptóticos (capturadores de ERO) na mitocôndria (Parent et al., 2008). Petrusa et al. (2009), relacionaram a alta atividade da enzima NADH desidrogenase e a queda de MCP com a diminuição de ERO em CEs de *Abies alba*. Neste sentido, a inibição do acúmulo de ERO na mitocôndria, pode resultar no bloqueio da MCP necessária para o desenvolvimento do ES. Nas CEs de *A. angustifolia*, a não evolução dos ESs, dos genótipos bloqueados, poderia ser decorrente de uma maior atividade da enzima NADH desidrogenase, a qual previne o acúmulo de ERO na mitocôndria e conseqüentemente bloqueia a MCP de MPEs, durante a transição de MPEs para ES.

Confirmando esta proposição, foi observado exclusivamente nos géis 2D do genótipo responsivo, uma proteína da subunidade beta da ATPase (“spot” 06) (Tabela 9). A presença desta subunidade indica um maior metabolismo energético em CEs de genótipos que apresentaram o desenvolvimento de ESs. Em plantas (Vianello et al., 2007) e animais (Lemasters, 1999) o estado energético, particularmente os níveis de ATP, são considerados cruciais para o progresso da MCP. Em células animais, a diminuição nos valores de ATP é reconhecida pela célula como um sinal de MCP (Skulachev, 2006). Em suspensões celulares de *A. thaliana* (Krause e Durner, 2004; Tiwari et al., 2002) e tabaco BY-2 (Mlejnek et al., 2003), foi relatado um rápido consumo dos níveis de ATP quando do início do processo de MCP. Assim, pode-se supor que CEs do genótipo que apresentou o

desenvolvimento do ES possuam maior atividade de MCP. Identifica-se claramente uma estreita relação entre a regulação da MCP e o potencial embriogênico de CEs de *A. angustifolia*. Novas análises, que visem à quantificação de ERO, e avaliações de MCP, nas CEs dos genótipos celulares com diferentes potenciais embriogênicos, poderão esclarecer estas relações.

5.2.3.2.3 Proteínas comuns com variação em abundância

A análise dos “spots” comuns, porém com variação no nível de abundância, nos mapas 2D dos genótipos responsivo e bloqueado, resultou na identificação de 5 proteínas. Destas, duas foram identificados como enolases (“spots” 10 e 15) (Tabela 10, 11). Esta enzima foi identificada em mais de uma região do gel 2D, nas CEs de *A. angustifolia*. Esta observação é consistente com outros trabalhos, onde múltiplos “spots” foram relacionados com a identificação desta enzima (Balbuena et al., 2009; Hajdich et al., 2007; Mechin et al., 2007; Rode et al., 2011). A identificação de mais de um “spot” relacionados a esta proteína, sugerem a presença de isoformas ou alterações pós-traducionais desta proteína em CEs de *A. angustifolia*.

Durante a embriogênese, a glicólise exerce um papel fundamental no suprimento de energia e fornecendo intermediários para a biossíntese de compostos estruturais como ácidos graxos e aminoácidos (Rode et al., 2011). O final do desenvolvimento do embrião é caracterizado por um acúmulo na quantidade de metabólitos de reserva, como por exemplo, o amido (Balbuena et al., 2009). As enolases, que catalisam a conversão reversível da 2-fosfo-d-glicerato para fosfoenolpiruvato (Wold e Ballou, 1957; Van der Straeten et al., 1991), participam na gliconeogênese sendo importantes no acúmulo destes metabólitos em sementes (Mechin et al., 2007). Andriotis et al. (2010) analisou a abundância de transcritos de enolase e observou uma grande quantidade destes em embriões no estágio torpedo de *A. thaliana*. Lippert et al. (2005) reportou que as enolases são uma das mais abundantes proteínas presentes em estágio mais maduros do ES de *P. glauca*. Estes estudos sugerem um papel importante desta enzima durante os estádios tardios do desenvolvimento embrionário. Em *A. angustifolia*, esta enzima foi identificada em todos os estádios do desenvolvimento do embrião zigótico, apresentando isoformas com um aumento de abundância nas etapas posteriores ao

estádio globular, sugerindo um papel importante desta enzima durante o desenvolvimento tardio do embrião zigótico desta espécie (Balbuena et al., 2009). A sua utilização como potencial marcadora do potencial embriogênico, foi sugerida destacando-se um estudo realizado em *Cyphomandra beatecea*, onde as enolases foram detectadas em maior abundância em CEs quando comparadas a culturas não-embriogênicas (Correia et al., 2012). No entanto, no presente trabalho, não foi possível relacionar esta enzima com as diferenças no potencial embriogênico dos genótipos celulares de *A. angustifolia*. Neste caso esta enzima foi encontrada em maior abundância em géis 2D tanto no genótipo responsivo (“spot” 10), como no genótipo bloqueado (“spot” 45).

No presente trabalho o “spot” 15 foi identificado como a enzima flavonona 3-hidroxilase (F3H), sendo aproximadamente três vezes mais abundante em genótipos responsivos aos agentes de maturação quando comparado ao genótipo bloqueado. A F3H atua nas etapas iniciais da biossíntese de flavonóides, convertendo a flavonona narigenina em dihidroflavonol, que atua como precursor da síntese de flavonóis e antocianinas. Os flavonóides são uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal (Yamaguchi et al., 2009). Esta classe de metabólitos aparenta possuir um papel importante durante o desenvolvimento do pólen e semente de *Arabidopsis* (Debeaujon et al., 2003; Preston et al., 2004). Neste mesmo sistema, a partir da análise da expressão de transcriptos de genes reguladores da biossíntese de flavonóides, foi sugerido um papel desta classe de metabólitos durante a embriogênese (Hennig et al., 2004). Wang et al. (2010), observaram um aumento gradativo na abundância da enzima F3H e acúmulo de flavonóides durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *Dimocarpus longan*.

Diversos estudos relatam a função de proteção das plantas contra radiação UV e o stress oxidativo, promovida pelos flavonóides (Feucht et al., 2004). Recentemente, foi observado que biflavonóides presentes em acículas de *A. angustifolia* são capazes de proteger o DNA de danos oxidativos causados por raios UV (Yamaguchi et al., 2009). Em coníferas, alterações nos potenciais osmóticos do meio de cultura, muitas vezes relatadas como estressantes para as células, são necessárias para organização morfológica do ES (Silveira et al., 2004; Stasolla e Yeung, 2003). Durante a maturação, as CEs são expostas a meios de cultura suplementados com altas concentrações de agentes osmóticos e ABA e em muitas

espécies vegetais, estas condições resultam em um acúmulo de ERO (Beligni e Lamatina 1999; Wei et al., 2009). As ERO são capazes de atravessar as membranas e alterar diferentes substâncias presentes nas células, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, e quando na ausência de mecanismos de proteção podem resultar em diversas adversidades como, alterações da mitocôndrias, bloqueio do desenvolvimento das células embriogênicas, depleção do ATP e morte celular programada (Beligni e Lamatina, 1999; Guérin et al., 2001). Balbuena et al. (2009) verificou que durante o início do desenvolvimento embrião zigótico de *A. angustifolia*, uma das classes de proteínas mais abundantes eram aquelas envolvidas com a defesa contra o stress oxidativo. Podemos sugerir que uma regulação no controle do stress oxidativo durante a embriogênese são cruciais para as respostas aos agentes de maturação. As diferenças nos padrões de respostas das CEs dos genótipos responsivo e bloqueado, durante a etapa de maturação, poderiam ser um reflexo da regulação diferencial da síntese de flavonóides, e conseqüentemente uma maior capacidade de defesa contra o stress oxidativo durante a etapa de maturação.

Em adição ao papel de proteção ao stress oxidativo, foi observado que os flavonóides atuam na regulação do desenvolvimento vegetal (Taylor e Grotewold, 2005). A relação desta classe com o desenvolvimento vegetal está associada, em grande parte, devido ao seu papel na regulação do transporte polar de auxina (Buer e Muday, 2004). Mutantes de *Arabidopsis*, deficientes para a síntese de flavonóides, apresentaram menores valores de auxina e estruturas com anormalidades, como: maior número de inflorescências, redução na altura da planta, aumento no número de raízes secundárias e gravitropismo retardado (Brown et al., 2001). Adicionalmente, ressalta-se a atuação da quercetina, um flavonol, que pode competir com o inibidor do efluxo de auxina, ácido 1-N-naftilfetalâmico (NPA) pelo seu sítio de ligação nas regiões basais da membrana plasmáticas das células vegetais alterando o transporte deste hormônio (Ferte et al., 1999).

Durante a embriogênese, em angiospermas e em gimnospermas, a regulação do padrão morfogênético do embrião é dependente do transporte polar da auxina (Larsson et al., 2008). Em *Arabidopsis*, após a fecundação do zigoto ocorre à primeira divisão assimétrica, tendo início o transporte polar da auxina da célula basal maior para a menor apical (Friml et al., 2003). A formação de um gradiente de auxina determina a evolução e o desenvolvimento dos embriões (Friml et al., 2003).

A importância deste transporte para a embriogênese somática foi confirmada em estudos com inibidores do transporte polar de auxina, em diferentes sistemas vegetais como: *Brassica juncea* (Liu et al., 1993), *Eleutherococcus senticosus* (Choi et al., 2001), *P. abies* (Larsson et al., 2008), *Arachis hypogaea* (Venkatesh et al., 2009). No presente trabalho as diferenças nos potenciais embriogênicos entre os genótipos responsivos e bloqueados poderiam ser decorrentes de uma regulação distinta do transporte polar da auxina, evidenciado pela maior abundância da enzima F3H nos genótipos que apresentaram o desenvolvimento do ES. Estudos mais detalhados em relação à dosagem dos níveis de flavonóides e auxinas, bem como a avaliação da alteração do potencial embriogênico nestes genótipos pela utilização de inibidores do transporte de auxinas, poderiam trazer subsídios para esta relação proposta.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho foram caracterizadas e estabelecidas CEs com diferentes potenciais embriogênicos, onde foram avaliados parâmetros bioquímicos e moleculares, visando uma melhor compreensão do processo de embriogênese somática. Este tipo de pesquisa é inédito, considerando-se o sistema de estudo, ou seja, uma espécie recalcitrante e nativa. Em coníferas, a maioria dos estudos relacionados à embriogênese, tem sido realizados utilizando-se como modelos as espécies que possuem uma semente ortodoxa, i.e. alta tolerância a dessecação. Relatos envolvendo espécies com semente recalcitrante, i.e. baixa tolerância a dessecação, como é o caso de *A. angustifolia*, são raros. Os resultados obtidos permitem um melhor entendimento do processo de embriogênese, sob o ponto de vista básico e aplicado. A compreensão das bases do processo, associada à obtenção de marcadores, bioquímicos e/ou moleculares, e que identifiquem a competência e a evolução para a embriogênese, são aspectos fundamentais para as abordagens biotecnológicas dos sistemas *in vitro*. O estabelecimento de um genótipo celular (R+), e que evolui para a formação do ES, abre perspectivas para estudos de otimização dos protocolos de maturação e germinação de embriogênese somática, com possibilidades de sua utilização como técnica de propagação clonal. Ressalta-se que até o presente, as ausências de genótipos com um alto potencial embriogênico vinham restringindo experimentos de aperfeiçoamento para as etapas de maturação e germinação.

Como observado em outros sistemas vegetais, mas de maneira inédita para o caso de gimnospermas, a razão Put/Spd constitui um marcador das CEs aptas ao desenvolvimento inicial e tardio do ES. Este marcador permite, que no início do estabelecimento das CEs possa ser feita uma avaliação de quais são os genótipos aptos ou não para a evoluírem no processo de embriogênese somática. Adicionalmente, a incorporação aos meios de cultura de PAs, inibidores da síntese de PAs, precursores da síntese de PAs (arginina e ornitina), podem ser propostos como promotores da evolução embriogênica das culturas em *A. angustifolia*. O estudo da atividade das enzimas participantes nas vias de biossíntese (ADC e ODC) e catabolismo de PAs e sua relação com o potencial embriogênico da espécie,

podem trazer novas perspectivas para a otimização e compreensão do sistema *in vitro*.

A identificação da enzima SAM sintase, exclusivamente em genótipos que apresentaram o desenvolvimento do ES, abre perspectivas para estudos do envolvimento do hormônio etileno no desenvolvimento do ES de *A. angustifolia*. Em ensaios preliminares, foram detectadas diferenças quanto ao conteúdo de etileno entre CEs de genótipo com diferentes potenciais embriogênicos. Um estudo com inibidores da síntese de etileno, como o ácido salicílico e suas implicações no desenvolvimento do ES, permitirão uma análise mais detalhada da relação deste regulador do crescimento, ao longo do processo de ES da espécie. Deve-se ressaltar a existência de estudos que demonstram a interação nas rotas biossintéticas das PAs e etileno, através da SAM, e que devem, ser reguladas ao longo da embriogênese somática e zigótica da espécie.

A análise da expressão do gene *AaSERK1*, evidenciou a potencialidade de sua utilização como marcadora positiva, de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, aptos a apresentarem o desenvolvimento de ESs. Estudos mais detalhados dos diferentes tipos celulares presentes nas CEs destes genótipos, a partir do isolamento por gradiente de Ficoll e da análise de expressão *in loco*, como a hibridização *in situ*, permitirão obter conclusões mais precisas do envolvimento deste gene com a competência embriogênica no sistema. Por outro lado, não foi possível relacionar a expressão do gene *AaPP2C* com o potencial embriogênico de CEs de *A. angustifolia*. Entretanto, a análise da expressão deste gene, nas CEs dos genótipos com diferentes potenciais embriogênicos durante a etapa de maturação, demonstrou a sua relação com o ABA, e a evolução da embriogênese somática na espécie. Até o presente, estudos da expressão dos genes *AaSERK1* e *AaPP2C* ao longo da embriogênese zigótica de *A. angustifolia*, não foram realizados. Estas análises poderiam auxiliar a compreensão e participação deste gene durante a embriogênese zigótica e somática na espécie.

A identificação de enzimas NADH desidrogenase e F3H sugere a necessidade de uma regulação do estresse oxidativo no desenvolvimento do ES de *A. angustifolia*. O acúmulo de moléculas envolvidas com o estresse oxidativo, como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, pode resultar em danos ao desenvolvimento do ES. Neste sentido, sugerem-se abordagens utilizando técnicas

quantitativas e qualitativas de detecção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, entre as CEs com diferentes potenciais embriogênicos.

Em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho representam um avanço na compreensão do processo de embriogênese no sistema *A. angustifolia*. Parâmetros bioquímicos, como níveis de diferentes PAs (Put/Spd), e moleculares, como expressão do gene *AaSERK1*, podem ser utilizados como marcadores para determinação do potencial embriogênico das CEs de *A. angustifolia*.

REFERÊNCIAS¹

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit Jr ME. Ethylene in plant biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1992.
- Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patrón M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol Lett.* 2006;28(3):1867-76.
- Almeida AM, Parreira JR, Santos R, Duque AS, Francisco R, Tomé DF, Ricardo CP, Coelho AV, Fevereiro P. A proteomics study of the induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* using 2DE and MALDI-TOF/TOF. *Physiol Plant.* 2012. In press.
- Altamura MM, Torrigiani P, Falasca G, Rossini P, Bagni N. Morpho-funcional gradients in superficial and deep tissues along tobacco stem: polyamine levels, biosynthesis and oxidation, and organogenesis *in vitro*. *J Plant Physiol.* 1993;142:543-51.
- Andriotis VM, Kruger NJ, Pike MJ, Smith AM. Plastidial glycolysis in developing *Arabidopsis* embryos. *New Phytol.* 2010;185(3):649-62.
- Astarita LV, Guerra MP. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* - induction and maintenance of embryonal-suspensor mass culture. *Braz. J. Plant Physiol.* 1998;10:113-8.
- Astarita LV, Guerra MP. Conditioning of culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2000;36:194-200.
- Astarita LV, Floh EIS, Handro W. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biol. Plant.* 2003;47:53-9.
- Attree SM, Fowke LC. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1993;35:1-35.
- Bagni N, Tassoni A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids.* 2001;20:301-17.
- Bais HP, Havishankar GA. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2002;69:1-34.

---

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Balbuena TS. Proteômica do desenvolvimento da semente de *Araucaria angustifolia*. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Biociências; Universidade de São Paulo; 2009.

Balbuena TS, Silveira V, Junqueira M, Dias LLC, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh EIS. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). J Proteomics. 2009;72(3):337-52.

Balbuena TS, Jo L, Pieruzzi FP, Dias LCC, Silveira V, Santa-Catarina C, Junqueira M, Thelen JJ, Shevchenko A, Floh EIS. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. Phytochemistry. 2011;72(4-5):302-11.

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

Basso CMG. A Araucária e a paisagem do planalto brasileiro. Revista de Direito Público. 2010;5:1-11.

Becraft PW. Receptor kinases in plant development. Trends Plant Sci. 1998;3:384-8.

Becwar MR. Maturation, germination and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 1989;25:575-80.

Beligni MV, Lamattina L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. Planta. 1999;208:337-44.

Bertauche N, Leung J, Giraudat J. Protein phosphatase activity of abscisic acid insensitive 1 (ABI1) protein from *Arabidopsis thaliana*. Eur J Biochem. 1996;241:193-200.

Bewley JD, Black M. Seeds: physiology of development and germination. New York: Plenum Press; 1994.

Blanco M, Nieves N, Sanchez M, Borroto C, Castillo R, Gonzalez J, Escalona M, Baez E, Hernandez Z. Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 1997;51:53-158.

Bonga J, Klimaszewska K, von Aderkas P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 2010;100:241-54.

Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J. Polyamines and environmental challenges: recent development. Plant. 1999;140:103-25.

Bozhkov PV, Filonova LH, von Arnold S. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is

associated with cell death and extracellular acidification. *Biotechnol Bioeng.* 2002;77(6):658-67.

Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK. Flavonoids act as negative regulatory of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2001;126:524-35.

Buckeridge MS. *Biologia & mudanças climáticas no Brasil*. São Carlos: Rima Editora; 2008.

Buer CS, Muday GK. The transparent *testa4* mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *Plant Cell*; 2004;16:1191-205.

Casolo V, Petrusa E, Krajňáková J, Macri F, Vianello A. Involvement of the mitochondrial K⁺ATP channel in H₂O₂ or NO induced programmed death of soybean suspension cell cultures. *J Exp Bot.* 2005;56:997-1006.

Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, Righezza M, Delmotte F, Brignollas F, Hagege D, Maury S. DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation stage in sugarbeet cell lines. *Plant Physiol Biochem.* 2005;43:681-91.

Chalupa V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Comm Inst For Czechoslovakia*. 1985;14:54-63.

Chen L, Luthe D. Analysis of proteins from embryogenic and nonembryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Sci*; 1987;48:181-8.

Chen S, Harmon AC. Advances in plant proteomics. *Proteomics.* 2006;6(20):5504-16.

Choi YE, Katsumi M, Sano H. Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Sci.* 2001;160(6):1183-90.

Chugh A, Khurana P. Gene expression during somatic embryogenesis recent advances. *Curr Sci.* 2002;83:715-30.

Colova VM, Boradallo PN, Phulls BR, Bausher M. Synchronized somatic embryo development in embryogenic suspensions of grapevine *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. *Vitis.* 2007;46(1):15-8.

Conforti PA, Lupano CE. Starch characterization of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria aruacana* seeds. *Stach-Starke.* 2007;59:284-89.

Conger B, Hanning G. Registration of Embryogen-P orchardgrass germplasm with a high capacity for somatic embryogenesis from *in vitro* cultures. *Crop Sci.* 1991;31:855.

Correia S, Vinhas R, Manadas B, Lourenço AS, Veríssimo P, Canhoto JM. Comparative Proteomic Analysis of Auxin-Induced Embryogenic and Nonembryogenic Tissues of the Solanaceous Tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). *J Proteome Res.* 2012;11:1666-75.

Correia S, Vinhas R, Mandas B, Lourenço AS, Veríssimo P, Canhoto JM. Comparative proteomic analysis of auxin-induced embryogenic and nonembryogenic tissues of the solanaceous tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). *J Proteome Res.* 2012;11:1666-75.

Cvikrová M, Binavorá P, Eder J, Vágner M, Hrubcová M, Zon J, Machacková I. Effect of inhibition of phenylalanine ammonia-lyase activity on growth of alfalfa cell suspension culture: alterations in mitotic index, ethylene production, and contents of phenolics, cytokinins, and polyamines. *Physiol Plant.* 1999;107:329-37.

Debeaujon I, Nesi N, Perez P, Devic M, Grandjean O, Caboche M, Lepiniec L. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *The Plant Cell.* 2003;15:2514-31.

Delledone M, Zeier J, Marocco A, Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:13454-59.

Di Rienzo JA, Gonzalez LA, Tablada EM. fgStatistics: user manual. Córdoba: Eletronic Edition; 2009. [cited from 2012 Feb. 1]. Available from: <<https://sites.google.com/site/fgstatistics/down/Manual.pdf>>.

Dias LCC, Santa-Catarina C, Ribeiro DM, Barros RS, Floh EIS, Otoni WC. Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2009;99(2):199-208.

Dias LLC, Balbuena TS, Silveira V, Santa-Catarina C, Schevchenko A, Floh EIS. Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinenses*: a recalcitrant seed species. *Braz J Plant Physiol.* 2010;22:23-33.

dos Santos ALW, Silveira V, Steiner N, Vidor M, Guerra MP. Somatic embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). *Braz Arch Biol Technol.* 2002;45:97-105.

dos Santos ALW, Wietholter N, El Gueddari NE, Moerschbacher BM. Protein expression during seed development in *Araucaria angustifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. *Physiol Plant*. 2006;127:138-48.

dos Santos ALW, Steiner N, Guerra MP, Zoglauer K, Moerschbacher BM. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. *Biol Plant*. 2008;52:195-99.

dos Santos ALW, Silveira V, Steiner N, Maraschin M, Guerra MP. Biochemical and morphological parameters during the growth of suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. *Braz Arch Biol Technol*. 2011;53:497-504.

Dowlatabadi R, Weljie AM, Thorpe TA, Yeung EC, Vogel HJ. Metabolic footprinting study of white spruce somatic embryogenesis using NMR spectroscopy. *Plant Physiol Biochem*. 2009;47:343-50.

Durzan DJ, Chalupa V. Growth and metabolism of cell and tissue of jack pine (*Pinus banksiana*). 3. Growth of cells in liquid suspension cultures in light and darkness. *Can J Bot*. 1976;54:456-67.

Park YS, Bonga JM. Application of somatic embryogenesis in forest management and research. In: IUFRO Working Party 2.09.02 conference; 2011; Brno: IUFRO; 2011:3-8.

Durzan DJ. Progress and promise in forest genetics. In: Proceedings of the 50th Anniversary Conference, Paper Science and Technology: The Cutting Edge; 1980; Appleton: The Institute of Paper Chemistry; 1980:31-60.

Durzan DJ. Monozygotic cleavage polyembryogenesis and conifer tree improvement. *Cytol Genet*. 2008;2:159-73.

El Meskaoui A, Tremblay FM. Involvement of ethylene in the maturation of black spruce embryogenic cell lines with different maturation capacities. *J Exp Bot*; 2001;52:761-9.

Fehér A, Pasternak TP, Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2003;74:201-28.

Fellers JP, Guenzi AC, Porter DR. Marker proteins associated with somatic embryogenesis of wheat callus cultures. *J Plant Physiol*. 1997;151:201-8.

Ferte J, Kuhnel J, Chapuis G, Rolland Y, Lewin G, Schwaller M. Flavonoid-related modulators of multidrug resistance: Synthesis, pharmacological activity, and structure-activity relationships. *J Med Chem*. 1999;42:478-89.

Feucht W, Treutter D, Polster J. Flavanol binding of nuclei from tree species, Plant Cell Rep. 2004;22:430-6.

Filonova LH, Bozhkov PV, von Arnold S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. J Exp Bot; 2000;51(343):249-64.

Fim LG. Estudo do crescimento celular em culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Find JI, Norgaard JV, Krogstrup P. Growth parameters, nutrient uptake and maturation capability of two cell lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture. J Plant Physiol. 1998;152:510-7.

Fischerova L, Fischer L, Vondrakova Z, Vagner M. Expression of the gene encoding transcription factor PaVP1 differs in *Picea abies* embryogenic lines depending on their ability to develop somatic embryos. Plant Cell Rep. 2008;27:435-41.

Floh EIS, Santa-Catarina C, Silveira V. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese *in vitro*. Rev Bras Hortic Ornam. 2007;13:1992-2001.

Flores Berrios E, Sarrafi A, Fabre F, Alibert G, Gentzbittel L. Genotypic variation and chromosomal location of QTLs for somatic embryogenesis revealed by epidermal layers culture of recombinant inbred lines in the sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theor Appl Genet. 2000;101:1307-12.

Franco IJ, Fontana VL. Ervas & plantas: a medicina dos simples. Erechim: Imprimax; 1997.

Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwartz H, Hamann T, Offringa R, Jügens G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. Nature. 2003;426:147-53.

Galston AW, Sawhey RK. Polyamines and plant physiology. Plant Physiol. 1990;94(2):406-10.

Garcia RJF. Araucareaceae. In: Wanderley MGL, Shephred GJ, Giulietti AM. Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: Hucitec; 2002. p. 1-4.

Gifford EM, Foster AS. Morphology and evolution of vascular plants. New York: W. H. Freeman Co; 1989.

Godoy JRL, Marabesi MA, Mortari LC, Aidar MPM, Buckeridge MS. A dinâmica da floresta neotropical e as mudanças climáticas globais. Naturalia. 2009;32:53-66.

Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AAR, Vartanian N, Giraudat J. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell*. 1999;11:1897-909.

Gruszczyńska A, Rakoczy-Trojanowska M. Expression analysis of somatic embryogenesis-related SERK, LEC1, VP1 and NiR ortologues in rye (*Secale cereale* L.) *Journal Appl Genet*. 2011;52:1-8.

Guérin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001;7:175-89.

Guerra MP, Kemper E. Tecnologias Futuras: Aplicação de poliembriogênese somática para a propagação massal de plantas elite de *Araucaria angustifolia* (Bert) O Ktze. In: Congresso Nacional Sobre Essências; 1992; São Paulo: Instituto Florestal. 1992:1233-36.

Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa; 1999. p. 533-68.

Guerra MP, Silveira V, Santos ALW, Astarita LV, Nodari RO. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ. Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 457-78.

Guerra MP, Silveira V, Reis MS, Schneider L. Exploração, Manejo e Conservação da Araucária (*Araucaria angustifolia*). In: Simões LL, Lino CF. Manejo Sustentável da Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais. São Paulo: Senac; 2002. p. 85-101.

Guerra MP, Steiner N, Mantovani A, Nodari RO, dos Reis MS, dos Santos KL. Araucarária. In: Barbieri RL, Stumpf ERT. Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; 2008. p. 149-84.

Gupta PK, Durzan DJ. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Biotechnology*. 1987;5:147-51.

Hahne G, Mayer JE, Lorz H. Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. *Plant Sci*. 1988;55:267-79.

Haines RJ, Prakasha N. Proembryo development and suspensor elongation in *Araucaria juss*. *Aust J Bot*. 1980;28:511-22.

Hajduch M, Castell JE, Tang S, Hearne LB, Knapp S, Thelen JJ. Proteomic analysis of near-isogenic sunflower varieties differing in seed oil traits. *J Proteome Res*. 2007;6(8):3232-41.

- Hakman I, Fowke L, von Arnold S, Eriksson T. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Sci.* 1985;38:53-9.
- Handro W, Ferreira CM. *Araucaria* (*Araucaria spp.*) In: Bajaj YPS. *Biotechnology in agriculture and forestry* I. Berlin: Springer-Verlag; 1986. p. 310-5.
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* 2001;127:803-16.
- Hennig L, Gruissem W, Grossniklaus U, Kohler C. Transcriptional programs of early reproductive stages in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2004;135:1765-75.
- Hilbert J, Dubois T, Vasseur J. Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in Cichorium. *Plant Physiol Biochem.* 1991;30:733-41.
- Hochholdinger F, Sauer M, Dembinsky D, Hoecker N, Muthreich N, Saleem M, Liu Y. Proteomic dissection of plant development. *Proteomics.* 2006;6:4076-83.
- Hoeberichts FA, Woltering EJ. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays.* 2002;25:47-57.
- Högberg KA, Bozhkov PV, von Arnold S. Early selection improves clonal performance and reduces intraclonal variation of Norway spruce plants propagated by somatic embryogenesis. *Tree Physiol.* 2003;23:211-6.
- Hu H, Xiong L, Yang Y. Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta.* 2005;222:107-17.
- Hu WW, Gong H, Pua EC. Modulation of SAMDC expression in Arabidopsis thaliana alters in vitro shoot organogenesis. *Physiol Plant.* 2006;128(4):740-50.
- Huang XL, Li XJ, Li Y, Huang LZ. The effect of AOA on ethylene and polyamines metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Physiol Plant.* 2001;113:424-29.
- Hvoslef-Eide A, Corke F. Embryogenesis-specific protein changes in birch suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1997;51:35-41.
- Imin N, De Jong F, Mathesius U, van Noorden G, Saeed NA, Wang X, Rose RJ, Rolfe BG. Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics.* 2004;4:1883-96.

Imin N, Nizamudin M, Daniher D, Nolan KE, Rose RJ, Rolfe BG. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6-benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiol.* 2005;137:1250-60.

International Union for Conservation of Nature. The IUCN list of threatened species [homepage on the internet]. Cambridge: IUCN. [cited from 2012 ago. 1]. Available from: <<http://www.iucnredlist.org/details/32975/0>>.

Jalonen P, von Arnold S. Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation. *Plant Cell Rep.* 1991;10:384-7.

Johnson T, Cruse-Sanders JM, Pullman GS. Micropropagation and seed cryopreservation of the critically endangered species Tennessee yellow-eye grass, *Xyris tennesseensis* Kral. *In Vitro Cell Dev Bio Plant.* 2012;48(3):369-76.

Kakkar RK, Sawhney VK. Polyamine research in plants - a changing perspective. *Physiol Plant.* 2002;116:281-92.

Kawahara R, Sunabori S, Fukuda H, Komamine A. A gene expressed preferentially in the globular stage of somatic embryogenesis encodes elongation-factor 1 alpha in carrot. *Eur J Biochem.* 1992;209:157-62.

Kepczynska E, Zielinska S. Disturbance of ethylene biosynthesis and perception during somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. reduces embryos' ability to regenerate. *Acta Physiol Plant.* 2011;33:1969-80.

Kershaw P, Wagstaff B. The southern conifer family Araucariaceae: history, status, and value for paleoenvironmental reconstruction. *Annu Rev Ecol Syst.* 2001;32:397-414.

Klimaszewska K, Jean-François T, Becwar MR, Devillard C, Park YS, Lelu-Walter M. Recent progress in somatic embryogenesis of Four Pinus spp. *Tree For Sci Biotech.* 2007;1:11-25.

Klimaszewska K, Morency F, Jones-overton C, Cooke J. Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. *Physiol Plant.* 2004;121:682-90.

Klimaszewska K, Noceda C, Pelletier G, Label P, Rodriguez R, Lelu-Walter MA. Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro Cell Dev Bio Plant.* 2009;45(1):20-33.

- Kong L, Attree SM, Fowke LC. Effects of polyethylene glycol and methylglyoxal bis (guanylhydrazone) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*). *Plant Sci.* 1998;133(2):211-20.
- Kong L, Yeung EC. Effects of ethylene and ethylene inhibitors on white spruce somatic embryo maturation. *Plant Sci.* 1994;104:71-80.
- Krause M, Durner J. Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells. *Mol Plant Microbe Interact.* 2004;17(2):131-9.
- Kumar A, Altabella T, Taylor M. Recent advances in polyamines research. *Trends Plant Sci.* 1997;2:124-30.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta.* 2008;228:367-1.
- Larsson E, Sitbon F, von Arnold S. Polar auxin transport controls suspensor fate. *Plant Signal Behav.* 2008;3(7):469-70.
- Laux T, Jürgens G. Embryogenesis: a new start in life. *The Plant Cell.* 1997;9:989-1000.
- Leljak-Levanić D, Bauer N, Mihaljević S, Jelaska S. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep.* 2004;23(3):120-7.
- Lemasters JL. Mechanisms of hepatic toxicity. V. Necroptosis and mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol.* 1999;276:G1-6.
- Leroux B, Carmou N, Girudet D, Potin P, Larher F, Bodin M. Inhibition of ethylene biosynthesis enhances embryogenesis of cultured microspores of *Brassica napus*. *Plant Biotech Rep.* 2009;3(4):347-53.
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Cheddor F, Giraudat J. *Arabidopsis* ABA-response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science.* 1994;264:1448-52.
- Leung J, Merlot S, Giraudat J. The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 2 (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell.* 1997;9:759-71.
- Li ZL, Burritt DJ. Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. *Plant Growth Regul.* 2003;40:65-74.

Lipavská H, Konrádová H. Invited review: Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2004;40:23-30.

Lippert D, Zhuang J, Ralph S, Ellis DE, Gilbert M, Olafson R, Ritland K, Ellis B, Douglas CJ, Bohlmann J. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics*. 2005;5:461-73.

Liu CM, Xu ZH, Chua NH. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell*. 1993;5:621-30.

Lo Schiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti Ronchi V, Marazzati D, Vergara R, Orselli S, Terzi M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiations, hormones and demethylating drugs. *Theor Appl Genet*. 1989;77:325-31.

Loenen WAM. S-Adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochem Soc Trans*. 2006;34:330-3.

Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum; 1992.

Lyngved R, Renault J, Hausman J, Iversen T, Hvoslef-Eide AK. Embryo-specific Proteins in *Cyclamen persicum* analyzed with 2-D DIGE. *J Plant Growth Regul*. 2008;27:353-69.

Ma J, He YH, Wu CH, Liu HP, Hu ZY, Shun GM. Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus*. cv. Shenwan. *Plant Mol Bio Rep*. 2012;30:195-203.

Ma X, Bucalo K, Determann RO, Cruse-Sanders JM, G.S. Pullman GS. Somatic embryogenesis, plant regeneration and cryopreservation for *Torreya taxifolia*, a highly endangered coniferous species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2012;48(3):324-34.

MacKay J, Park Y, Becwar M, Cordero J, Pullman G. Genetics of Somatic Embryogenesis in Loblolly Pine and Implications for Breeding. *Tree Genet Genomes*. 2006;2:1-9.

Maillot P, Lebel S, Schellenbaum P, Jacques A, Walter B. Differential regulation of SERK, LEC1-like and pathogenesis-related genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. *Plant Physiol Biochem*. 2009;47(8):743-52.

Malá J, Cvikrová M, Machová P, Martincová O. Polyamines during somatic embryo development in Norway spruce (*Picea abies* [L.]). *J For Sci*. 2009;55(2):75-80.

Malmberg RL, Watson MB, Gregory LG, Yu W. Molecular genetic analyses of plant polyamines. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 1998;17(2):199-224.

Mantiri FR, Kurdyukov S, Lohar DP, Sharopova N, Saeed NA, Wang XD, Vandenbosch KA, Rose RJ. The transcription factor MtSERF1 of the ERF subfamily identified by transcriptional profiling is required for somatic embryogenesis induced by auxin plus cytokinin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 2008;a46(4):1622-36.

Marques TP. Subsídios à recuperação de formações florestais ripárias da Floresta Ombrófila Mista do Estado do Paraná, a partir do uso espécies fontes de produtos florestais não-madeiráveis. [dissertação (Mestrado em Agronomia)]. Curitiba: Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Paraná; 2007.

Marquesini NR. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil: guarani, kaingáng, xokleng, ava-guarani, kraô, cayuá. [dissertação (Mestrado em Botânica)]. Curitiba: Departamento de Biologia, Universidade Federal do Paraná; 1995.

Marsoni M, Bracale M, Espen L, Prinsi B, Negri AS, Vannini C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep.* 2008;27(2):347-56.

Martin AB, Cuadrado Y, Guerra H, Gallego P, Hita O, Margin L, Dorado A, Villalobos N. Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Sci.* 2000;154;154-1.

Martínez LE, Agüero CB, López ME, Galmarini CR. Improvement of in vitro gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. *Plant Sci.* 2000;156(2):221-6.

Mattos JR. O pinheiro brasileiro. Lages: Artes Gráficas Princesa Ltda.; 1994.

Mauri PV, Manzanera JA. Somatic embryogenesis of holm oak (*Quercus ilex* L.): ethylene production and polyamine content. *Acta Physiol Plant.* 2011;33(3):717-23.

Méchin V, Thévenot C, Le Guilloux M, Prioul JL, Damerval C. Developmental analysis of maize endosperm proteome suggest a pivotal role pyruvate orthophosphate dikinase. *Plant Physiol.* 2007;143:1203-19.

Merkle AS. The case for hardwood varietals: How hardwood somatic embryogenesis can enhance forest productivity in the Southeastern United States. In: IUFRO Working Party 2.09.02 conference; 2011; Brno: IUFRO; 2011:37-43.

Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, Giraudat J. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J.* 2001;25(3):295-303.

Meyer K, Luebe MP, Grill E. A protein phosphatases 2C involved in ABA signaling transduction in *Arabidopsis thaliana*. Science. 1994;264:1452-55.

Minocha SC, Minocha R. Role of polyamines in somatic embryogenesis. In: Bajaj YPS. Biotechnology in agriculture and forestry: Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Berlin: Springer-Verlag; 1995:53-66.

Minocha R, Smith DR, Reeves C, Steele KD, Minocha SC. Polyamines levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. Physiol Plant. 1999;105:155-64.

Mlejnek P, Dolezel P, Procházka S. Intracellular phosphorylation of benzyladenosine is related to apoptosis induction in tobacco BY-2 cells. Plant Cell Environ. 2003; 26(10):1723-35.

Moffatt BA, Stevens YY, Allen MS, Snider JD, Pereira LA, Todorova MI, Summers PS, Weretilnyk EA, Martin-McCaffrey L, Wagner C. Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. Plant Physiol. 2002;128:812-21.

Møller IM. A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases. Trends in Plant Sci. 2002;7:235-37.

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

Monteiro M, Kevers C, Dommes J, Gaspar T. A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2002;68:225-32.

Moraes FMS. Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). [dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)]. Brasília: Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília; 2006.

Mordhost AP, Toonen MAJ, de Vries SC. Plant embryogenesis. Crit Rev Plant Sci. 1997;16:535-76.

Mordhorst AP, Charbit, E, de Vries, SC. Some developmental and molecular aspects of somatic embryogenesis (nonzygotic embryogenesis). In: Trigiano RN, Gray DJ. Plant development and biotechnology. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 201-9.

Munksgaard D, Mattsson O, Okkels FT. Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. Physiol Plant. 1995;1:5-10.

Namasivayam P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2007;90:1-8.

National Center for Biotechnology information. Protein database [database]. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>>. [2012 Ago. 1].

Nieves N, Segura-Nieto M, Blanco MA, Sanchez M, González A, Gonzáles JL, Castillo R. Biochemical characterization of embryonic and non-embryonic calluses of sugarcane. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2003;39:343-5.

Niskanen AM, Lu J, Seitz S, Keinonen K, Von Weissenberg K, Pappinen A. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Tree Physiol.* 2004;24(11):1259-65.

Noceda C, Salaj T, Pérez M, Viejo M, Cañaç M, Salaj J, Rodriguez R. DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees (Berl West).* 2009;23(6):1285-93.

Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol.* 2003;133:218-30.

O'Donnel A, Harvey LM, Mcneil B. The roles of the alternative NADH dehydrogenases during oxidative stress in cultures of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Fungal Biol.* 2011;115:359-69.

Oropeza M, Marcano AK, De Garcia E. Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharum sp.*). *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2001;37:211-6.

Pan Z, Guan R, Zhu S, Deng X. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep.* 2009;28:281-9.

Parent C, Capelli N, Dat J. Reactive oxygen species, stress and cell death in plants. *C R Biol.* 2008;331:255-61.

Park SY, Lee WY, Kim YW, Moon HK. Characterization of metabolic differences between embryogenic and non-embryogenic cells in forest trees. *BMC Proc.* 2011; 5(7);146.

Park YS, Pond SE, Bonga JM. Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. *Theor Appl Genet.* 1993;86:427-36.

Park YS, Pond SE, Bonga JM. Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination and cryopreservation. *Theor Appl Genet.* 1994;89:742-50.

Park YS, Bonga JM. Application of somatic embryogenesis in forest management and research. In: IUFRO Working Party 2.09.02 conference; 2011; Brno: IUFRO; 2011:3-8.

Pedroso MC, Hilbert JL, Vasseur J, Pais S. Polypeptides associated with the induction of direct embryogenesis in *Camellia japonica* leaves. I. Identification of embryo-specific polypeptides. *J Exp Bot.* 1995;46:1579-84.

Perez-Nunez MT, Souza R, , Saenz L, Chan JL, Zuniga-Aguilar JJ, Oropeza C. Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Rep.* 2009;28:11-9.

Petrussa E, Bertolini A, Casolo V, Krajňáková J, Macri F, Vianello A. Mitochondrial bioenergetics linked to the manifestation of programmed cell death during somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Planta.* 2009;231(1):93-107.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(9):e36.

Pieruzzi FP, Dias LLC, Balbuena TS, Santa-Catarina C, dos Santos ALW, Floh EIS. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Ann Bot.* 2011;108:337-45.

Preston J, Wheeler J, Heazlewood Li SF, Parish RW. At Myb32 is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.* 2004;40:979-95.

Priyono, Bruno F, Michel R, Jean-Paul D, Ucu S, Surip M, Charles L, Pierre B, Vincent P, Teguh W, Dominique C. Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. *Plant Cell Rep.* 2010;29:343-57.

Proud CG. Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Mol Biol Rep.* 1994; 19(3):161-70.

Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera F, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2006;86:285-301.

Conselho Nacional Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Projeto Inventário dos Recursos Florestais da Mata Atlântica [homepage on the internet]. São Paulo:

Conselho Nacional Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. [citado em 2012 ago. 01]. Disponível em: <http://www.rbma.org.br/anuario/mata_03_anosdedestruicao_dest_araucaria.asp>.

Reed BM, Kane M, Bunn E, Pense VC. Biodiversity conservation and conservation tools. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*; 2011;47:1-4.

Reitz R, Klein RM. Araucarieaceas. Itajaí: HBR; 1966.

Reitz R, Klein RM, Reis A. Projeto madeira de Santa Catarina. Itajaí: HBR; 1978.

Rizzini CT. Árvores e madeiras úteis do Brasil. São Paulo: EDUSP; 1976.

Robert N, Merlot S, N'Guyen V, Boisson-Dernier A, Schroeder JI. A hypermorphic mutation in the protein phosphatase 2C HAB1 strongly affects ABA signaling in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*. 2006;580:4691-6.

Rode C, Gallien S, Heintz D, Van Dorsselaer A, Braun HP, Winkelmann T. Enolases: storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Mol Biol*. 2011;75(3):305-19.

Rodriguez PL, Leube MP, Grill E. Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol Biol*. 1998;38:879-83.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(6):e45.

Salaj J, von Recklinghausen IR, Hecht V, de Vries SC, Schel JHN, van Lammeren AM. *AtSERK1* expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*. 2008;46:709-14.

Sallandrouze A, Faurobert M, El Maataoui M, Espagnac H. Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins associated with somatic embryogenesis development in *Cupressus sempervirens* L. *Electrophoresis*. 1999;20:1109-19.

Samaj J, Salaj T, Matúsová R, Salaj J, Takác T, Samajová O, Volkmann D. Arabinogalactan-protein epitope Gal4 is differentially regulated and localized in cell lines of hybrid fir (*Abies alba* x *Abies cephalonica*) with different embryogenic and regeneration potential. *Plant Cell Rep*. 2008;27:221-9.

Santa-Catarina C, Hanai LR, Dornelas MC, Viana AM, Floh EIS. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2004;79:53-61.

Santa-Catarina C, Vanildo S, Balbuena TS, Viana AM, Estelita MEM, Handro W, Floh EIS. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regul.* 2006;49:237-47.

Santa-Catarina C, Silveira V, Scherer GFE, Floh EIS. Polyamine and nitric oxide levels correlate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2007; 90:93-101.

Santanen A, Simola LK. Changes in polyamine metabolism during somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Journal of Plant Physiol.* 1992;140:475-80.

Sasaki G, Katoh K, Hirose N, Suga H, Kuma K, Miyata T, Su ZH. Multiple receptor-like kinase cDNAs from liverwort *Marchantia polymorpha* and two charophycean green algae, *Closterium ehrenbergii* and *Nitella axillaris*: Extensive gene duplications and gene shufflings in the early evolution of streptophytes. *Gene.* 2007;401(1-2):135-44.

Savona M, Mattioli R, Nigro S, Falasca G, Della Rovere F, Costantino P, De Vries S, Ruffoni B, Trovato M, Altamura MM. Two SERK genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. *J Exp Bot.* 2012;63:471-88.

Scaramagli S, Biodin S, Capitani F, Gerola P, Altamura MM, Torrigiani P. Polyamine conjugate levels and ethylene biosynthesis: inverse relationship with vegetative bud formation in tobacco thin layers. *Physiol Plant.* 1999;105:366-75.

Schellenbaum P, Jacques A, Maillot P, Bertsch C, Mazet F, Farine S, Walter B. Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3* and *VvL1L* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep.* 2008;27(12):1799-809.

Schlogl PS, dos Santos ALW, Vieira LN, Guerra MP, Floh EIS. Gene expression during early somatic embryogenesis in Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2012;108:173-80.

Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development.* 1997;124:2049-62.

Setoguchi H, Osawa TA, Pintaud JC, Jaffré T, Veillon JM. Phylogenetic relationships within *Araucariaceae* based on *rbcL* gene sequences. *Am J Bot.* 1998;85:1507-16.

Sharma SK, Millam S, Hein I, Bryan GJ. Cloning and molecular characterization of a potato SERK gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta.* 2008;228:319-30.

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Prot.* 2006;1:2856-60.

Shimizu JY, Oliveira YMM. Distribuição, variação e uso dos recursos genéticos da *Araucaria* no sul do Brasil. Curitiba: Embrapa; 1981.

Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Sci.* 2001;160(6):1229-35.

Silveira V, Steiner N, Santos ALW, Nodari NO, Guerra MP. Biotechnology tolls in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. *Crop Breed Appl Biotechnol.* 2002;2:463-70.

Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular proteins, starch and polyamines in embryogenic suspensions cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2004;76:53-60.

Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Guerra MP, Floh EIS. 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.* 2006;171:91-8.

Silveira V, Santa-Catrina C, Balbuena TS, Moraes FMS, Ricart CAO, Souza MV, Guerra MP, Handro W, Floh, EIS. Endogenous abscisic acid levels and comparative proteome during seed development of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Biol Plant.* 2008;52:101-4.

Singh H. Embryology of gymnosperms. Berlin: Borntrager; 1978.

Skulachev VP. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis.* 2006;11(4):473-85.

Smertenko AP, Bozhkov PV, Filonova LH, von Arnold S, Hussey PJ. Re-organisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. *Plant J.* 2003;33(5):813-24.

Smith DL, Krikorian AD. Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: external pH control over morphogenesis. *Am J Bot.* 1990;77:1634-47.

Soderman EM, Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR. Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol.* 2000;124:1752-65.

Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep.* 2000;19:718-26.

Song X, Han Y, Teng W, Sun G, Li W. Identification of QTL underlying somatic embryogenesis capacity of immature embryos in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Cell Rep.* 2010;29(2):125-31.

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

Stasolla C, Bozhkov PV, Chu TM, Van Zyl L, Egertsdotter U, Suarez MF, Craig D, Wolfinger RD, Von Arnold S, Sederoff RR. Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiol.* 2004;24(10):1073-85.

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

Steiner N, Santa-Catarina C, Andrade JBR, Balbuena TS, Guerra MP, Handro W, Floh EIS, Silveira V. *Araucaria angustifolia* Biotechnology. *Funct Plant Sci Biotechnol.* 2008;2:20-8.

Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra MP, Lucas C, Dornelas MC, Floh EIS. A gymnosperm homolog of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2012;109:41-50.

Steiner N, Santa-Catarina C, Silveira V, Floh EIS, Guerra MP. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2007;89:55-62.

Steiner N, Vieira, FN, Maldonado S, Guerra MP. Carbon source affects morphogenesis and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Braz Arch Biol Technol.* 2005;48:895-903.

Sung Z, Okimoto R. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:3683-87.

Taurus TE, Fowke LC, Dunstan DI. Somatic embryogenesis in conifers. *Can J Bot.* 1991;69:1873-99.

Taylor LP, Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol.* 2005;8:317-23.

Tchorbadjieva M, Kalmukova R, Pantchev I, Kyurkchiev S. Monoclonal antibody against a cell wall marker protein for embryogenic potential of *Dactylis glomerata* L. suspension cultures. *Planta*. 2005;222:811-9.

Thomas C, Meyer D, Himber C, Steinmetz A. Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol Biochem*. 2004;42:35-42.

Thompson RG, von Aderkas P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. *Plant Cell Rep*. 1992;11:379-85.

Timmis R. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. *Biotechnol Prog*. 1998;14:156-66.

Tiwari BS, Belenghi B, Levine A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol*. 2002;128(4):1271-81.

Torrigiana P, Scramaglia S, Castiglione S, Altamurac MM, Biondia S. Downregulation of ethylene production and biosynthetic gene expression is associated to changes in putrescine metabolism in shoot-forming tobacco thin layers. *Plant Sci*. 2003;164(6):1087-94.

UniProt Knowledgebase. UniProtKB/Swiss-Prot [database]. Available from: <<http://www.uniprot.org>>. [2012 ago. 1].

Van der Straeten D, Rodrigues-Pousada RA, H M Goodman HM, Van Montagu M. Plant enolase: gene structure, expression, and evolution. *The Plant Cell*. 1991;3(7):719-35.

Van Engelen FA, De Vries SC. Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet*. 1992;8:66-70.

van Zyl L, Bozhkov PV, Clapham DH, Sederoff RR, von Arnold S. Up, down and up again is a signature global gene expression pattern at the beginning of gymnosperm embryogenesis. *Gene Expr Patterns*. 2003;3(1):83-91.

Venkatesh K, Rani AR, Baburao N, Padmaja G. Effect of auxins and auxin polar transport inhibitor (TIBA) on somatic embryogenesis in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *AJPS*. 2009;3(12):277-82.

Vianello A, Zancani M, Peresson C, Petrusa E, Casolo V, Krajňáková J, Patriu S, Braidot E, Macri F. Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. *Physiol Plant*. 2007;129(1):242-52.

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

von Arnold S, Bozhkov P, Clapham D, Dyachok J, Filanova L, Hogberg KA, Ingouff M, Wiweger M. Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2005;81:323-9.

Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 2003;376:1-14.

Walters C, Wesley-Smith J, Crane J, Hill LM, Chmielarz P, Pammenter NW, Berjak P. Cryopreservation of Recalcitrant (i.e. Desiccation-Sensitive) Seeds. In: Reed BBM. *Plant cryopreservation: a practical guide.* New York: Springerlink; 2008. p. 465-84.

Wang J, Weng ZX, Cheng CL, Liu H, Liang WY, Jiang JM, Chen W. Identification and analysis of differentially expressed proteins during cotyledon embryo stage in longan. *Sci Hortic.* 2010;126:426-33.

Wang W, Park YS, Riding R, Beardmore T. Norway spruce somatic embryogenesis: improvement of somatic embryo maturation. *Propag Ornament Plants.* 2009;9:185-97.

Wann SR, Becwar MR, Nagmani R, Feirer RP, Johnson MA. Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic calli of conifers. *Trees.* 1989;3:173-8.

Wei K, Jin X, Chen X, Wu F, Zhou W, Qiu B, Qiu L, Wang X, Li C, Zhang G. The effect of H₂O₂ and abscisic acid (ABA) interaction on α -amylase activity under osmotic stress during grain development in barley. *Plant Physiol Biochem.* 2009;47:778-84.

Weretilnyk EA, Alexander KJ, Drebenstedt M, Snider JD, Summers PS, Moffatt BA. Maintaining methylation activities during salt stress: the involvement of adenosine kinase. *Plant Physiol.* 2001;125:856-65.

West MAL, Harada JJ. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *The Plant Cell.* 1993;5:1361-69.

Williams EG, Maheswaran G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot.* 1986;57:443-62.

Winkelmann T, Heintz D, Dorsselaer AV, Serek M, Braun HP. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta.* 2006;224:508-19.

Wold F, Ballou CE. Studies on the enzyme enolase. II. Kinetic studies. *J Biol Chem.* 1957;227(1):313-28.

Xiong L, Zhu JK. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 2003;133:29-36.

Yadav JS, Rajam MV. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiol.* 1998;116:617-25.

Yamaguchi LF, Vassão DG, Kato MJ. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry.* 2009;66:2238-47.

Yang X, Zhang X. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *CRC Cr Rev Plant Sci.* 2010;29(1):36-57.

Yeung EC, Kong L, Stasolla C. Apical meristem formation during zygotic embryo development of white spruce. *Can J Bot.* 1998;76:751-61.

Yin L, Lan U, Zhu L. Analysis of the protein expression profiling during rice callus differentiation under different plant hormone conditions. *Plant Mol Biol.* 2008;68:597-617.

Zhang SG, Han SY, Yang WH, Wei HL, Zhang M, Qi LW. Changes in H₂O₂ content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2010;100:21-9.

Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X. Phospholipase Da1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:9508-13.

Zimmerman JL. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *Plant Cell.* 1993;5(10):1411-23.

ANEXO A - Análise da integridade do RNA obtidos a partir da extração de RNA de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Culturas embriogênicas dos genótipos altamente responsivo (R+), responsivo (R) e bloqueado (B1). Gel de eletroforese em Agarose 1% (p/v), corados em brometo de etídio. FONTE: Jo (2012).

ANEXO B - Gel bidimensional de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, em faixa de pH 3-10.

Abreviações: pM: Peso molecular; pI: Ponto isoelétrico; kDa: quilodáltons
FONTE: Jo (2012)

ANEXO C- Análise preliminar da expressão do gene *AaPP2C* e do gene endógeno *AaUBI1* em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* durante a etapa de proliferação e maturação.

Culturas embriogênicas do genótipo MSG01 cultivadas em meios de proliferação (P) (MSG sem reguladores de crescimento) (P) e meios de maturação (M) (MSG suplementado com ABA, PEG e maltose)

FONTE: Jo (2012)

ANEXO D - Quantidade e qualidade do RNA extraído (ng/ mg MF) a partir de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* de genótipos com diferentes potenciais embriogênicos.

Genótipo	RNA (ng/ mg MF)	260/280
R+	34,56 ± 10,00 a	2,07
R	30,13 ± 6,21 a	2,12
B1	40,1 ± 7,11 a	2,03

Culturas embriogênicas dos genótipos altamente responsivo (R+), reponsivo (R) e bloqueado (B1) 21 dias após o cultivo em meio de proliferação. As médias acompanhadas das mesmas letras indicam a ausência de diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$). (Média ± desvio padrão n=3)
 FONTE: Jo (2012)