

Giovanni Victório Cerruti

Elucidação das respostas bioquímicas mediadas por L-arginina durante o desenvolvimento de embriões somáticos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

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

São Paulo
2019

Giovanni Victório Cerruti

Elucidação das respostas bioquímicas mediadas por L-arginina durante o desenvolvimento de embriões somáticos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

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

Orientador: Dr. André Luis Wendt dos Santos

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP(BDTD).

São Paulo
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

CERRUTI, GIOVANNI VICTÓRIO

Elucidação das respostas bioquímicas mediadas por
L-arginina durante o desenvolvimento de embriões
somáticos de Araucaria angustifolia (Bertol.)

Kuntze / GIOVANNI VICTÓRIO CERRUTI; orientador André
Luis Wendt dos Santos. -- São Paulo, 2019.

84 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Embriogênese somática. 2. Óxido nítrico. 3.
Araucaria angustifolia. 4. Poliaminas. I. Wendt dos
Santos, André Luis, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Candidato(a): Giovanni Victório Cerruti

Título da Dissertação: Elucidação das respostas bioquímicas
mediadas por L-arginina durante o
desenvolvimento de embriões somáticos de
Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze

Orientador(a): André Luis Wendt dos Santos.

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:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 830/2016 referente ao projeto intitulado: *"Influência do metabolismo da glutathiona na geração de óxido nítrico e níveis de auxinas durante o desenvolvimento embrionário de Araucaria angustifolia (Bertol.)Kuntze"* sob a responsabilidade de *Giovanni Victório Cerruti* e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) *Eny I. S. Floh*, do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela CEPESH - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 17 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. Paolo Marinho A. Zanotto
Coordenador CEPESH ICB/USP

Retirei original em 05/12/2016
Amanda F. Almeida

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sentimento de gratidão à todos que participaram da conclusão de mais uma etapa do meu crescimento tanto profissional, quanto pessoal. Dessa forma:

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Cleide e Vitório, que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida. Obrigado por sempre estarem presentes ao meu lado nessa caminhada de formação profissional. Obrigado por todos os aprendizados e pelo amor incondicional. Amo vocês.

Ao meu orientador, Dr. André L. W. dos Santos, pela orientação, e pela confiança no trabalho. Agradeço pela paciência, pelos ensinamentos desde o ingresso no mestrado, e também pela compreensão frente as minhas falhas no decorrer do caminho. A conclusão desse trabalho deve-se a sua participação em todas as etapas desse projeto. Obrigado.

A Prof. Eny. I. S. Floh pelo aceite em seu laboratório, pelo seu envolvimento durante a execução do trabalho e por possibilitar grande parte das experiências acadêmicas adquiridas no mestrado que agragaram muito em meu crescimento profissional.

Ao Dr. Leandro de Oliveira, pelos ensinamentos e paciência nas inúmeras dúvidas e conselhos sempre buscando a melhor execução do trabalho. Sua participação foi de essencial importância na realização desse projeto

As técnicas Amanda F. Macedo e Silvia Blanco, agradeço imensamente o apoio técnico e disposição, as quais foram essenciais para a execução desse trabalho.

A todos os amigos que conquistei ao longo dessa caminhada e que tornaram o caminho menos tortuoso e infinitamente mais divertido: Frederico Rocha, Débora Pagliuso, Dani Rosado e Paula Elbl. Em especial a Marcella Simões por estar sempre ao meu lado e ao amigo Bruno Navarro pelos debates construtivos e pela sinceridade.

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

A CAPES pela bolsa concedida.

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

As funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação em Biotecnologia, Fábria e Eliana, pelo auxílio em todos os momentos.

Aos amigos de graduação, Monize, Camila, Roberta, Luiza e Carlos pelas brincadeiras e risadas.

A todos vocês, muito obrigado!

RESUMO

CERRUTI, Giovanni Victorio. **“Elucidação das respostas bioquímicas mediadas por L-arginina durante o desenvolvimento de embriões somáticos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze”**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A *Araucaria angustifolia* é uma conífera endêmica do Brasil e devido à sua exploração predatória, a espécie ocupa hoje apenas 2% do seu território original. Técnicas biotecnológicas como a embriogênese somática (ES) podem ser associadas a programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma de espécies em situação de vulnerabilidade ou ameaçadas de extinção. A similaridade entre a embriogênese zigótica e somática tem sido utilizada para estudos visando o aprimoramento do cultivo *in vitro* dos embriões somático, bem como para melhor compreensão acerca dos mecanismos moleculares e bioquímicos que regulam a embriogênese. Nesse contexto, a homeostase *redox* é um fator determinante para o correto desenvolvimento embrionário. Dentre os eventos envolvidos no balanço oxidativo, está o metabolismo de poliaminas (PAs) e óxido nítrico (ON), cujas vias metabólicas são associadas ao aminoácido L-arginina. O presente trabalho teve como objetivo analisar a influência do aminoácido L-arginina na biossíntese de ON, PAs e aminoácidos durante a fase de transição entre a proliferação das massas suspensor embrionárias e o desenvolvimento inicial dos embriões somáticos (pré-maturação) em culturas embriogênicas responsivas (R) e bloqueadas (B) ao desenvolvimento embrionário. Foram analisados: I) emissão de ON endógeno e a dinâmica de proliferação celular em suspensões celulares suplementadas com a L-arg (5 e 10 mM); II) perfil de PAs livres e aminoácidos (AAs); e III) a influência da manipulação do ambiente *redox* no desenvolvimento dos embriões utilizando glutationa (GSH) e butionina sulfoxilamina (BSO). Posteriormente à pré-maturação (14 dias), nas suspensões celulares suplementadas com 5 e 10 mM de L-arginina os níveis de ON observados na linhagem B foram maiores nos grupos suplementados com L-arginina em comparação ao controle, em contrapartida a linhagem R apresentou maior emissão no grupo controle e queda gradual nos tratamentos. Frente às condições de maturação, após 60 dias de cultivo, o tratamento suplementado com 5 mM de L-arginina apresentou o maior número de embriões no estágio I e II de desenvolvimento. Durante a fase de proliferação, na biossíntese de PAs observou-se um incremento no conteúdo de putrescina (Put) e espermina (Spm) nos grupos da linhagem B suplementados com L-arginina, enquanto que para ambas as linhagens a biossíntese de espermidina (Spd) permaneceu constante. Em relação à manipulação do ambiente *redox*, o

grupo controle apresentou maior formação de embriões. Os resultados aqui obtidos fornecem informações relevantes acerca da interação entre o metabolismo da L-arginina e embriogênese somática, onde a suplementação de 5 mM do aminoácido favoreceu a geração de embriões, fato associado à diminuição no conteúdo de ON, bem como outros comportamentos bioquímicos aqui observados, como o acúmulo da poliamina putrescina e a variação no conteúdo de aminoácidos. O conhecimento oriundo do presente trabalho fornece novas abordagens para o aprimoramento das condições artificiais aplicadas no processo de embriogênese somática em *Araucaria angustifolia*.

Palavras-chave: Embriogênese somática. Óxido nítrico. *Araucaria angustifolia*. Poliaminas.

ABSTRACT

CERRUTI, Giovanni Victorio. **“Elucidação das respostas bioquímicas mediadas por L-arginina durante o desenvolvimento de embriões somáticos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze”**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Araucaria angustifolia is a native conifer species of Brazil. Due to its intense exploitation, the species cover only 2% of its original forest area. Biotechnological tools, like somatic embryogenesis, may improve breeding and conservation programs. The similarity between zygotic and somatic embryogenesis have been used in studies in order to optimize somatic embryo *in vitro* culture, as well as a better understanding regarding molecular and biochemical mechanisms underlying embryogenesis. In this context, the maintenance of redox homeostasis determine the correct embryo development. Among the biological events regulating the oxidative balance is polyamine (PA) and nitric oxide (ON) metabolism, both biochemical pathways associated with the amino acid L-arginine. Herein, we aimed to analyse the influence of L-arginine on nitric oxide, polyamines and amino acids metabolism during proliferation of embryogenic somatic masses and initial development of somatic embryos (pre-maturation) in responsive (R) and blocked (B) cell lines. We investigated: I) endogenous nitric oxide and growth dynamics in suspensions culture supplemented with 5 and 10 mM of L-arginine; II) PAs and amino acid profiles; and III) manipulation of redox balance with glutathione and buthionine sulfoximine over embryo development. Nitric oxide content was higher on blocked cell line supplemented with L-arginine (5 and 10 m M), in the responsive cell line, the control group presented the higher content of endogenous nitric oxide. After 60 days of culture on maturation phase, the treatment with 5 mM of L-arginine presented the higher number of embryos on stage I and II of development. The biochemical profiles of polyamines was marked by a higher content of putrescine and spermine on blocked cell line in the presence of L-arginine, the content of spermidine remained constant in both cell lines. Control group presented higher embryo formation during disturbances in the redox environment. The results obtained here provide relevant information regarding the interaction between L-arginine metabolism and somatic embryogenesis, the presente of L-arginina (5 Mm) favored the generation of embryos, a fact associated with a decrease in NO content, as well as other biochemical behaviors, such as the accumulation of polyamine putrescine and variation in amino acid content. The knowledge from the present work provides new approaches for the improvement of the artificial conditions applied in the process of somatic embryogenesis in Brazilian Pine

Keywords: Somatic embryogenesis. Nitric oxide. *Araucaria angustifolia*. Polyamines.

Sumário

ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Embriogênese zigótica	13
1.2. Embriogênese somática	14
1.3. Poliembriogênese zigótica e somática em gimnospermas	15
1.4. Poliembriogênese somática em <i>Araucaria angustifolia</i>	19
1.5. L-arginina	21
1.6. Poliaminas	24
1.7. Óxido nítrico	27
1.8. Glutathione (GSH)	28
1.9. Importância do estudo	30
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Material vegetal	34
3.1.1. Embriogênese zigótica	34
3.2. Embriogênese somática	34
3.2.1. Indução das culturas embriogênicas	34
3.2.2. Proliferação das culturas embriogênicas	35
3.2.3. Estabelecimento de suspensões celulares	35
3.2.4. Maturação das culturas embriogênicas	35
3.2.4.1. Maturação das CEs suplementadas com L-arginina durante a proliferação	35
3.2.4.2. Manipulação do ambiente <i>redox</i> durante maturação utilizando GSH e BSO	36
3.2.5. Dinâmica de crescimento das suspensões celulares	37
3.3. Análises bioquímicas	37
3.3.1. Manipulação e quantificação dos níveis endógenos de óxido nítrico (ON)	37
3.3.2. Perfil e conteúdo de aminoácidos	37
3.3.3. Perfil e conteúdo de poliaminas (PAs)	38
3.3.2. Perfil da atividade enzimática da arginina decarboxilase	39
3.4. Delineamento experimental	40
4. RESULTADOS	41

4.1. Dinâmica de crescimento e incremento de biomassa	41
4.2. Determinações bioquímicas nas linhagens celulares B e R cultivadas em meio MSG suplementado com a L-arg	42
4.3. Determinação do conteúdo endógeno de óxido nítrico	43
4.4. Teste de viabilidade celular	43
4.5. Determinação dos perfis de poliaminas (PAs) livres e da relação Put/Spd	45
4.6. Determinação dos perfis de aminoácidos	49
4.7. Perfil da atividade enzimática	53
4.8. Maturação das CEs suplementadas com L-arginina durante a fase de proliferação	54
4.9. Indução de culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i>	55
4.10. Testes de maturação utilizando a suplementação com GSH e BSO	56
5. DISCUSSÃO	58
5.1. Influência da L-arginina na embriogênese somática	58
5.2. Óxido nítrico	59
5.4. Interação entre a suplementação da L-arginina e o perfil de aminoácidos	64
5.5. Influência na manipulação do ambiente <i>redox</i> na maturação	66
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Embriogênese zigótica

A embriogênese vegetal tem início 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 and Jurgens, 1997). A fase embrionária é considerada crucial uma vez que durante esta fase é especificado o meristema apical e radicular assim como o padrão morfogenético dos vegetais (von Arnold et al. 2002). Nas plantas superiores, 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 apomíticos (apomixia gametofítica ou esporofítica) (West and Harada, 1993; Sharma and Thorpe, 1995).

Desde o início do desenvolvimento embrionário são observadas diferenças morfológicas que permitem separar as Gimnospermas das Angiospermas (Jurzitza, 1987). Nas Gimnospermas o desenvolvimento do embrião inicia com uma fase de núcleo livre, enquanto que em Angiospermas a primeira divisão celular é acompanhada pela formação da parede celular (Singh, 1978; Kong et al., 1999; Hakman and Oliviusson, 2002). Nas Gimnospermas são reconhecidas três fases distintas durante o desenvolvimento embrionário: 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 (Singh, 1978; Haines and Prakash, 1980). Tanto em 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 and 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 pelo ácido abscísico (ABA) (Walters and Reich, 2000).

1.2. Embriogênese somática

Diferente dos animais, as células somáticas dos vegetais possuem a programação genética para a regeneração de indivíduos adultos pela via assexuada. A embriogênese somática (ES) é uma das vias de propagação assexuada em vegetais, sendo definida como a reestruturação no desenvolvimento das células somáticas em direção à rota embriogênica (Fehér et al., 2003). O processo de ES representa uma das demonstrações mais claras da totipotencialidade em células de plantas superiores via a formação *in vitro* de estruturas embrionárias bipolares (Floh, 2015). De acordo com Haccius (1978) a ES é o processo pelo qual embriões (novos indivíduos) se originam a partir de células simples, que não são produto da fusão de gametas e que não apresentam conexões vasculares com o tecido materno. A indução e o desenvolvimento de embriões somáticos *in vitro* foi obtida pela primeira vez por Steward et al. (1958) em cenoura (*Daucus carota*). Desde 2000, foram publicados cerca de 46 artigos científicos sobre o aperfeiçoamento da técnica de ES para *Pinus taeda*, *Pinus strobus*, *Pinus sylvestris*, *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pinus patula*, *Pseudotsuga menziesii*, *Abies nordmanniana*, *Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, e *Larix hybrids*. Ademais, aproximadamente 40 artigos científicos descreveram a aplicação da técnica pela primeira vez, demonstrando a importância da ES para a propagação massal de coníferas (Klimaszewska et al., 2016).

A ES é considerada uma ferramenta biotecnológica importante para aplicação na agricultura e para o setor florestal, por possibilitar a clonagem massal de genótipos elite (Bozhkov et al., 2002) e por ser uma fonte de material para programas de transformação genética (Klimaszewska et al., 2016). Além disso, a ES pode ser utilizada em associação com outras técnicas biotecnológicas, como a tecnologia de sementes sintéticas e a criopreservação, possibilitando o estabelecimento de bancos *ex situ* de germoplasma de espécies em situação vulnerável ou que não podem ser armazenadas em

bancos de sementes (Guerra et al., 2001; Auler et al., 2002). A ES também pode ser utilizada como um sistema de referência para o estudo de aspectos morfológicos, moleculares e fisiológicos da embriogênese vegetal (Floh, 2015).

Apesar da regeneração de plantas via ES já ter sido estabelecida em espécies como a cenoura, algodão, cacau, cana-de-açúcar e arbóreas como pinus, laureto e abeto (Correia et al., 2012; Quint et al., 2012; Klimaszewska et al., 2016), para a grande maioria das espécies vegetais as condições de cultivo empregadas (estímulos físicos e químicos) ainda são ineficazes para o correto desenvolvimento embrionário *in vitro* (Silveira et al., 2013). Portanto é extremamente importante a realização estudos que propiciem um maior conhecimento sobre os mecanismos que controlam a embriogênese vegetal, a fim de propiciar *in vitro* as condições necessárias para o correto desenvolvimento embrionário (Garcia-Mendiguren et al., 2015).

1.3. Poliembriogênese zigótica e somática em gimnospermas

As gimnospermas, dentre elas as coníferas, representam mais de 50% das reservas florestais existentes no mundo. Além da sua grande importância para o setor florestal, desempenham também uma função ecológica importante nos ecossistemas em que habitam (FAO, 2005). Dentre as 800 espécies de gimnospermas existentes, a maior parte está concentrada na ordem Pinales composta pelas famílias Pinaceae, Cupressaceae, Araucariaceae, Taxodiaceae, Podocarpaceae e Cephalotaxaceae (Durzan, 1996).

Na grande maioria das gimnospermas é comum, durante a fase embrionária inicial, a formação de múltiplos embriões via a ocorrência da poliembrionia simples e da poliembrionia por clivagem. Na poliembrionia simples, ocorre à formação de mais de um embrião, a partir da fertilização de mais de uma arquegônia (Becwar and Pullman, 1995; Kong et al., 1999). Já na poliembrionia por clivagem, poliembriões podem ser formados a partir da bipartição das células da cabeça embrionária (Gupta and Durzan, 1987; Durzan, 2008). Independente do processo de poliembriogênese (simples ou por clivagem), apenas o embrião zigótico que atinge a cavidade de corrosão é mantido na semente, sendo que os demais poliembriões (embriões subordinados) são eliminados por morte celular programada (Vuosku et al.,

2009). Contudo, o resgate *in vitro* destes poliembriões no período que antecede o processo de morte celular programada, permite a continuidade do processo de clivagem e formação de novos embriões em espécies que apresentam tanto a poliembrião simples como por clivagem (Durzan and Gupta, 1988; Guerra et al., 1999; Durzan, 2008). Em coníferas, este processo de formação de poliembriões *in vitro* é denominado de clivagem monozigótica ou de poliembriogênese somática (PS) (Durzan, 2008).

Em gimnospermas, o primeiro relato da formação *in vitro* de poliembriões somáticos foi feito por Norstog, (1965), utilizando embriões zigóticos de *Zamia* spp. Contudo em coníferas, apenas 20 anos mais tarde foi feito o primeiro relato da regeneração de plantas a partir da poliembriogênese somática em *Picea abies* (Hakman and Arnold, 1985). Atualmente, existem relatos de PS em 43 espécies de coníferas, sendo que a grande maioria concentrada em membros da família Pinaceae (*Pinus*, *Picea*, *Abies* e *Larix*) (Ben Sutton, 2002; Bonga, 2016). Na família Araucariaceae, apesar de existirem cerca de 40 espécies em todo o mundo, apenas na *Araucaria angustifolia* a técnica de PS tem sido utilizada (Schlögl et al., 2012).

Desde o início do seu estabelecimento, a técnica de PS tem sido referenciada como uma das alternativas mais promissoras para a clonagem massal de genótipos elite de espécies arbóreas, e para a perpetuação do ganho genético em programas de melhoramento florestal (Klimaszewska et al., 2011). Além disso, a PS é considerada como fonte de material para a transformação genética de espécies arbóreas e posterior regeneração dos transformantes (Tang and Newton, 2003). Em função da sua similaridade morfológica e molecular com a embriogênese zigótica, a PS tem sido utilizada como fonte de material para a realização de estudos de biologia celular e molecular (Schlögl et al., 2012; Steiner et al., 2012) (Scholgl et al. 2012a; Steiner et al. 2012; Durzan et al. 2012), fisiologia e bioquímica vegetal (Silveira et al., 2006; Steiner et al., 2012; Vieira et al., 2012), e fitopatologia molecular (Wendt dos Santos et al., 2008) durante fases do desenvolvimento embrionário de difícil manipulação *in vivo* (correspondente as fases pró-embrionária e embrionária inicial do embrião zigótico).

Atualmente, em função da necessidade da conservação e recomposição dos remanescentes florestais com espécies ameaçadas de extinção (Park &

Bonga, 2011), e dos possíveis danos à distribuição de espécies endêmicas em função das mudanças climáticas globais (da Silva et al., 2008), a PS tem sido cada vez mais utilizada em programas de conservação de germoplasma em gimnospermas (Merkel, 2011; Ma et al. 2012; Johnson et al. 2012). Além disso, a associação da PS 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).

A regeneração de plântulas utilizando a técnica de PS em espécies da família Pinaceae ocorre através de quatro etapas distintas de desenvolvimento (**Figura 1**): 1) indução de massa suspensor-embriônica (MSE) a partir de embriões zigóticos em meios de cultura contendo auxinas (mais frequentes) e citocininas (menos frequentes); 2) multiplicação da MSE em meios contendo auxinas e citocininas em níveis mais baixos que os utilizados na indução; 3) maturação dos embriões somáticos em presença de ácido abscísico (ABA) e/ou agentes osmóticos e; 4) germinação dos embriões somáticos em meios de cultura isentos de reguladores de crescimento (Tautorus et al., 1991; von Arnold et al., 2002). Apesar de inúmeros protocolos de PS já terem sido estabelecidos para espécies da família Pinaceae, ao ponto de permitir a produção de plantas em escala comercial (Teyssier et al., 2011) em outras famílias de gimnospermas ainda existem uma série de limitações que impossibilitam a regeneração de plantas via PS (Ben Sutton, 2002).

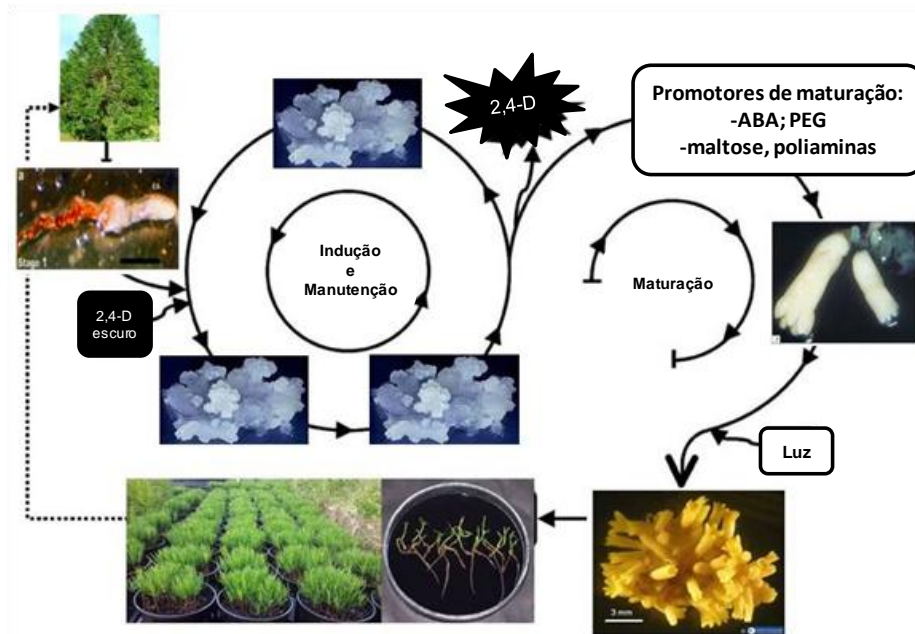


Figura 1- Modulação da poliembrionese somática em coníferas, via os ciclos de indução/manutenção e maturação/conversão em plântulas.

Grande parte desta dificuldade está associada às condições subótimas do ambiente artificial onde os poliembrões são cultivados (Durzan, 2008; Wendt dos Santos et al., 2008). De acordo com Stasolla et al., (2002), a otimização das fases iniciais no desenvolvimento embrionário é essencial para que não sejam acumulados “erros” na etapa seguinte do desenvolvimento embrionário. Portanto, o aperfeiçoamento das condições *in vitro* nas fases iniciais do desenvolvimento embrionários (indução e multiplicação da MSE) pode aumentar, substancialmente, o número e a qualidade dos embriões somáticos nas fases tardias de desenvolvimento (maturação e regeneração) (Stasolla and Yeung, 2003).

Evidências recentes apontam que, durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*, a resposta ao estresse oxidativo gerada pelos estímulos físicos e químicos aplicados nas culturas embriogênicas também possui uma função relevante na indução e desenvolvimento dos embriões somáticos (Remakanthan et al., 2014; Pullman et al., 2015; Guan et al., 2016). Alterações no ambiente redox durante a ES podem interferir em uma série de compostos importantes para a sinalização celular durante a embriogênese, incluindo hormônios como auxinas (Li et al., 2016), ácido abscísico (Hauser et al., 2011), poliaminas e etileno (Jo et al., 2014), bem como alterar o metabolismo de

antioxidantes (Schenk et al., 2014) e a deposição de substâncias de reserva (Bailly, 2004). Além disso, o balanço redox parece ser importante para o correto desenvolvimento dos meristemas apical e radicular durante a ES (Stasolla and Yeung, 2001). De acordo com Stasolla et al., (2001) gimnospermas e angiospermas compartilham semelhanças com relação ao ambiente redox durante o desenvolvimento embrionário, sendo as fases iniciais do desenvolvimento embrionário caracterizadas por uma maior atividade de compostos redutores, e as tardias por uma maior atividade de compostos oxidantes.

1.4. Poliembriogênese somática em *Araucaria angustifolia*

A. angustifolia é a uma espécie de conífera nativa do Brasil, cuja origem data possivelmente do período carbonífero tardio (300 milhões de anos atrás) com distribuição nos hemisférios norte e sul (Liu et al., 2009). Apesar da sua ampla distribuição no período mesozoico, as mudanças edafoclimáticas sofridas após a separação dos continentes (Haworth et al., 2011)(e o surgimento das angiospermas, fizeram com que a *A. angustifolia* ficasse restrita a regiões de altitude no sul da América do Sul (van Zonneveld et al., 2012). Além das restrições impostas pelo ambiente, à intensa exploração florestal sofrida (Figura 2) pela *A. angustifolia* desde o início do século XX, fizeram com que a espécie fosse dizimada para apenas 2% da sua população original (dos Reis et al., 2000).

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* (Roesch et al., 2009). Dentre estes estudos, o Laboratório de Biologia Celular de Plantas do IB/USP (BIOCEL) foi uma das instituições pioneiras no Brasil no estabelecimento de protocolos regenerativos na *Araucaria* utilizando a técnica de organogênese direta e indireta (Handro, 1986). Contudo, assim como o observado nas demais coníferas (Figura 3), a baixa taxa de multiplicação e a alta oxidação dos explantes impossibilitaram o uso desta técnica em larga escala para *A. angustifolia* (Handro, 1986) .

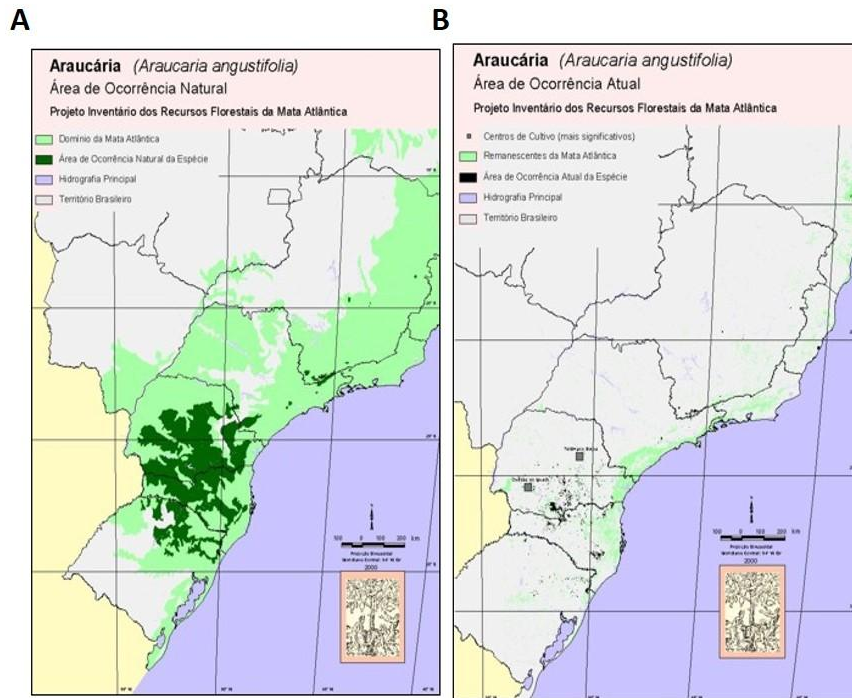


Figura 2: Distribuição geográfica da *Araucaria angustifolia* no Brasil representada na cor verde escura. Comparação entre a distribuição no início do século XX (A), e a área de cobertura atual da espécie (B). Fonte: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (2012).

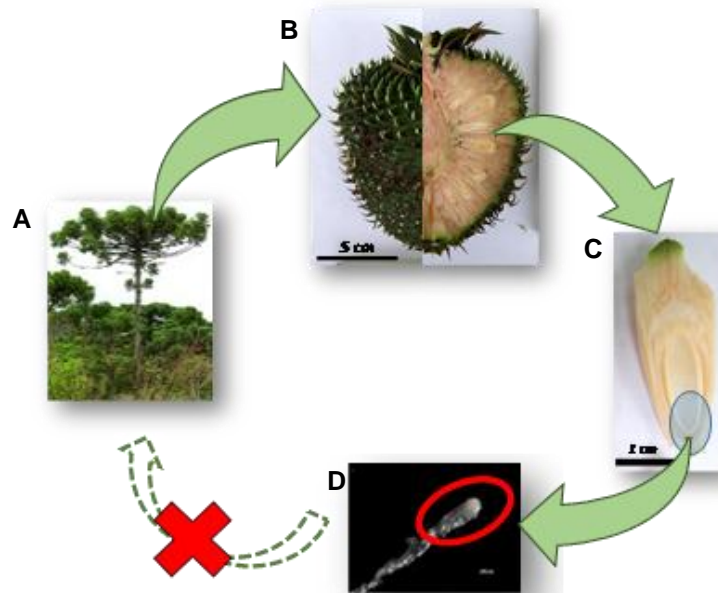


Figura 3: Representação da obtenção de embriões zigóticos imaturos presente no megagametófito de sementes de *A. angustifolia*. Partindo da coleta da planta matriz (A), onde são coletadas pinhas imaturas (B) das quais são retirados às sementes (C) contendo os embriões imaturos (D). Fonte: adaptado de de Oliveira *et al* (2017).

Em 1992 com o primeiro relato da indução de culturas embriogênicas em *A. angustifolia* por Guerra and Kemper (1992), abriu-se a possibilidade da utilização da rota de PS e das demais técnicas associadas (sementes sintéticas e criopreservação) para o estabelecimento de programas de melhoramento genético e conservação baseado no uso de ferramentas biotecnológicas. Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos visando o aperfeiçoamento e desenvolvimento de protocolos para indução, proliferação e maturação de embriões somáticos nesta espécie (Astarita & Guerra 1998, 2000; Guerra et al. 2000; (Astarita and Guerra, 1998; Silveira et al., 2002; Steiner et al., 2005; Silveira et al., 2006; Steiner et al., 2007; Dos Santos et al., 2008; Schlögl et al., 2012; Jo et al., 2013).

Estudos dos aspectos bioquímicos, fisiológicos e moleculares durante o desenvolvimento do embrião zigótico, visando uma abordagem integrada com o processo de poliembriogênese somática em *A. angustifolia* também tem sido desenvolvidos. Dentre eles, destacam-se os trabalhos relativos ao envolvimento do ácido indol-acético (Astarita et al., 2003b), ácido abscísico (Silveira et al., 2008), poliaminas (Astarita et al., 2003a; de Oliveira et al., 2017), aminoácidos (Astarita et al., 2003c) e proteínas (Dos Santos et al., 2006; Silveira et al., 2008; Balbuena et al., 2009) durante o desenvolvimento da semente. Esses estudos, além de propiciarem um maior conhecimento dos aspectos bioquímicos e fisiológicos durante a embriogênese zigótica em *A. angustifolia*, vem permitindo o estabelecimento de condições de cultivo *in vitro* mais apropriadas para os poliembriões. Para *A. angustifolia*, tem sido demonstrado que a manipulação do meio de cultura com relação ao metabolismo de aminoácidos (Wendt dos Santos et al., 2008), óxido nítrico (Silveira et al., 2006; Vieira et al., 2012) e poliaminas (Silveira et al., 2006; Steiner et al., 2007; Dutra et al., 2013; Douétts-Peres et al., 2019) tem desencadeado mudanças morfológicas adequadas para a formação dos poliembriões somáticos. Neste sistema *in vitro*, a clivagem monozigótica ocorre na ausência de auxinas e citocininas, e, portanto outros fatores do meio de cultura podem influenciar o processo de formação dos poliembriões somáticos.

1.5. L-arginina

Dentre os 20 aminoácidos envolvidos na síntese de proteínas, a L-arginina é um dos principais componentes do metabolismo intermediário de nitrogênio (N) em coníferas (Durzan and Pedroso, 2002). A L-arginina é o aminoácido que possui a maior razão de nitrogênio em relação ao carbono, o que a torna, em conjunto com o glutamato, uma das fontes mais utilizadas pelas coníferas como armazenamento de nitrogênio na forma orgânica. O aminoácido constitui até 40% do nitrogênio encontrado em proteínas das sementes e entre 50-90% do armazenamento livre (Chernobrovkina et al., 2016). A L-arginina pode ser utilizada tanto para a síntese proteica quanto como fonte para a formação de prolina e poliaminas e, conseqüentemente, de óxido nítrico (Gupta et al., 2016).

A inter-conversão cíclica da arginina e das amidas representadas pela glutamina e asparagina possuem uma função vital no metabolismo e na economia do N durante o longo ciclo de vida das coníferas. Evidências apontam que a L-arginina é sintetizada nas micorrizas e que sua associação com raízes de plantas vasculares permite a translocação do aminoácido para o micélio intraradicular onde ocorre sua degradação e a formação de amônia que é, então, assimilada pela planta (Cánovas et al., 2007).

As vias de biossíntese da L-arginina (Figura 4) ocorrem nos cloroplastos e envolvem dois processos: primeiro, é sintetizada a partir da ornitina oriunda de um precursor do glutamato, numa via cíclica através de diversos intermediários N-acetilados. A ornitina é posteriormente liberada transferindo um acetil para o glutamato através da enzima N²-acetilornitina:*N*-acetilglutamato acetiltransferase (NAOGAcT; EC 3.5.1.16). Alternativamente, o grupamento acetil da N²-acetilornitina pode ser liberado na forma de acetato pela enzima N²-acetilornitina deacetilase (NAOD; EC 3.5.1.16). Por fim, a ornitina é convertida em arginina numa série de reações que envolvem citrulina e argininosuccinato como intermediários (Llebrés et al., 2018).

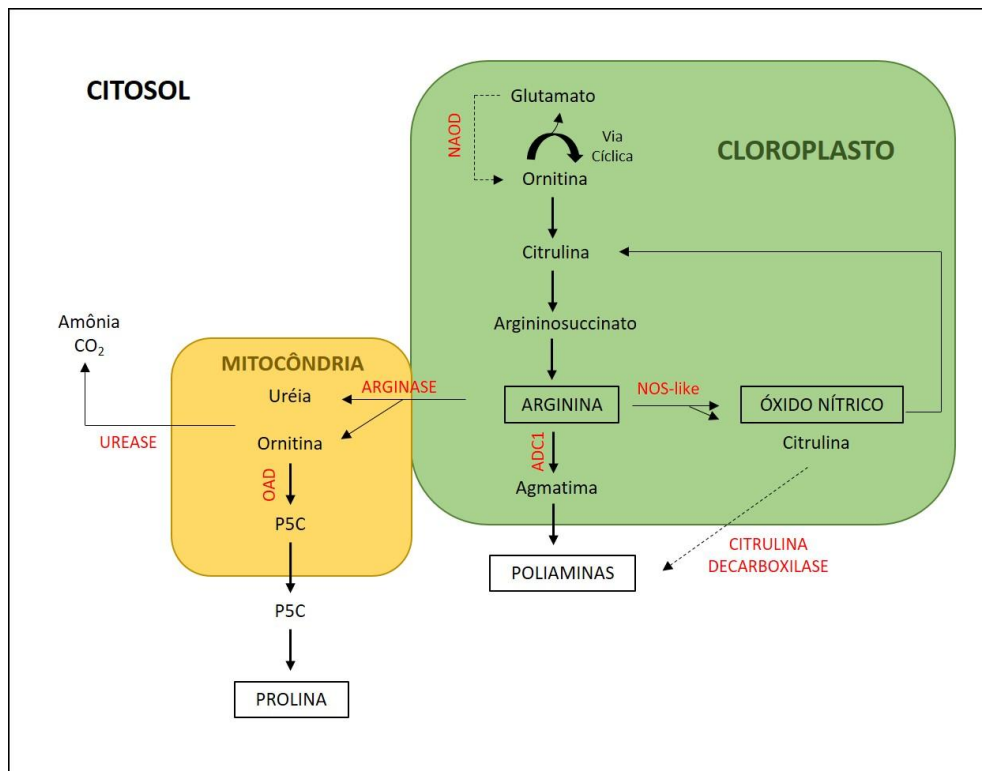


Figura 4: Via de biossíntese da L-arginina em plantas. Diagrama representando a via de biossíntese de arginina no cloroplasto e no citosol. ADC1, arginina descarboxilase; NOS-like, óxido nítrico sintase; NAOD, N²-acetilornitina deacetilase; OAD, ornitina-aminotransferase; P5C, pirrolina-5-carboxilato. Fonte: adaptado de (Llebrés et al., 2018).

A enzima arginase (EC 3.5.3.1) é responsável pela hidrólise da L-arginina em ornitina e uréia na mitocôndria. A ornitina é convertida em pirrolina-5-carboxilato (P5C) pela ornitina-aminotransferase (OAD; EC 2.6.1.13), exportada para o citosol e utilizada para a síntese de prolina, a qual pode ser utilizada como aminoácido para a síntese proteica ou como intermediário em respostas ao estresse, mais especificamente como quelante de metais e antioxidante (Iqbal et al., 2016).

Estudos abordando o metabolismo de arginina em modelos vegetais indicam que o aminoácido participa da síntese de óxido nítrico (ON), no entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na reação ainda são pouco conhecidos (Winter et al., 2015). Ensaios bioquímicos acerca da síntese de ON em animais confirmaram a participação da enzima NO-sintase (NOS; EC 1.14.13.39) na conversão de L-arginina em L-citrulina e ON (Domingos et al., 2014). Em situações onde a disponibilidade de arginina é reduzida, tais enzimas produzem o ânion superóxido (O₂⁻) e ON, o que pode levar a produção

de peroxinitrito, uma espécie reativa citotóxica em diversos processos fisiológicos (Wendehenne et al., 2001). Ainda não foram identificados homólogos da enzima em espécies vegetais, no entanto, na alga *Ostreococcus tauri* foi identificada uma sequência gênica com 40% de similaridade com a sequência identificada em animais (Foresi et al., 2010).

Além do ON, a L-arginina também é precursora de poliaminas (PAs), moléculas envolvidas em diversos processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo resposta a estresses bióticos e abióticos. Foi sugerido por Correa et al (2016) que o aminoácido pode atenuar os danos causados pelo estresse oxidativo, ou seja, possui a capacidade de manter o ambiente pró-oxidante/antioxidante em equilíbrio dentro de condições fisiológicas favoráveis, sem implicações na produção de ON e PAs. Estudos abordando a influência da L-arginina na suplementação do meio de cultura foram realizados, onde a presença do aminoácido favoreceu o crescimento *in vitro* da parte aérea de *Hibiscus moscheutos* (Greenwell et al., 2018). Em *Pinus radiata*, a L-arginina favoreceu a maturação de embriões somáticos e conversão em plântula por promover o acúmulo de proteínas de reserva (Morcillo et al., 1999).

1.6. Poliaminas

As poliaminas (PAs) são substâncias ubíquas já identificadas em bactérias, fungos, animais e plantas (Vuosku et al., 2006; Lasanajak et al., 2014; Majumdar et al., 2016). São compostos nitrogenados alifáticos carregados positivamente em pH fisiológico (Groppa et al., 2008). Visto que as PAs são carregadas positivamente, elas podem interagir com macromoléculas carregadas negativamente, como DNA, RNA, proteínas e fosfolípidos, exercendo sua ação na regulação de propriedades físico-químicas de membranas e modulação da atividade enzimática (Galston and Sawhney, 1990). As PAs estão associadas a diversos processos do desenvolvimento vegetal, como: divisão celular, resposta adaptativa ao estresse biótico e abiótico, senescência, amadurecimento de frutos, metabolismo de ON, metabolismo secundário e embriogênese (Santa-Catarina et al., 2006; Silveira et al., 2006; Steiner et al., 2007).

As principais PAs encontradas nos vegetais são: putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) (Jo et al., 2014; de Oliveira et al., 2017). Nos vegetais, a Put é sintetizada pela descarboxilação do aminoácido arginina ou ornitina pelas enzimas arginina descarboxilase (ADC; EC 4.1.1.19) ou ornitina descarboxilase (ODC; EC 4.1.1.17). A via da ADC é considerada a mais ativa em plantas durante a embriogênese e respostas a estresse abiótico, enquanto que a via da ODC seria mais ativa em regiões com alta atividade de divisão celular como nos meristemas (Baron and Stasolla, 2008).

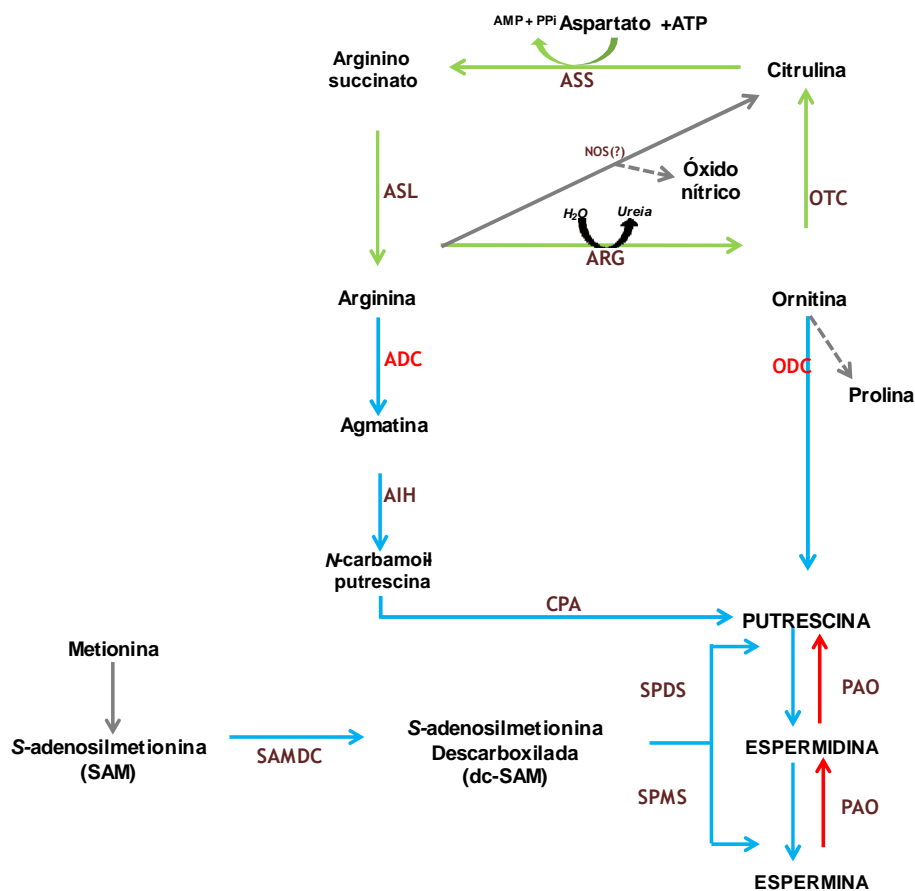


Figura 5 - Via de biossíntese da arginina/ornitina e poliaminas. AIH, agmatina deiminase; ARG, arginase; ADC, arginina descarboxilase; ASS, argininosuccinato sintase; CPA, N-carbamoilputrescina amidase; DAO, diamino oxidase; NOS, óxido nítrico sintase (putativa); ODC, ornitina descarboxilase; OTC, ornitina carbamoiltransferase; PAO, poliamina oxidase; SAMDC, S- adenosilmetionina descarboxilase; SPDS, espermidina sintase; SPMS, espermina sintase. Fonte: de Oliveira (2017).

A consecutiva adição de dois grupamentos aminopropil (Figura 5) na estrutura da putrescina resulta na formação da Spd pela Spd-sintase (SPMS; EC 2.5.1.22) e da Spm pela Spm-sintase (SPMS; EC 2.5.1.22). Os

grupamentos amino (Figura 6) são oriundos da descarboxilação da S-adenosilmetionina (SAM) pela enzima S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC; 4.1.1.50) (Slocum, 1991). A integração das vias bioquímicas de PAs e etileno se dá através da SAM, sendo um precursor comum entre os dois metabolismos (Jo et al., 2014).

Duas enzimas são responsáveis pelo catabolismo de PAs: a poliamina oxidase (PAO; EC 1.5.3.3), degradando tanto Spm em Spd, como Spd em Put, e a diamino oxidase (DAO; EC 1.4.3.6), ou a amina oxidase contendo cobre (CuAO), responsável por degradar a Put em Δ^1 -pirrolina, e posteriormente em GABA o qual é direcionado para o ciclo do ácido tricarbóxico (Sequera-Mutiozabal et al., 2016). A importância do catabolismo de PAs se dá no envolvimento dos produtos de tal reação em processos bioquímicos adjacentes, destacando o H_2O_2 , o qual participa do remodelamento da parede celular nos processos de lignificação e rigidez da parede (Saha and Blumwald, 2016).

O metabolismo de poliaminas e óxido nítrico aparentemente está associado à mecanismos regulatórios que possuem papel importante em diferentes processos do desenvolvimento vegetal (Silveira et al., 2006). A associação bioquímica entre PAs, ON e arginina foi relatada em *Arabidopsis thaliana*, onde a suplementação das sementes com poliaminas estimulou a liberação de ON, no entanto, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não foi caracterizado (Tun et al., 2006; Gao et al., 2008). Estudos realizados com mutantes de *A. thaliana* alterados para a síntese de PAs reforçam a ideia de que essas são moléculas de grande importância para o desenvolvimento embrionário vegetal (Imai et al., 2004).

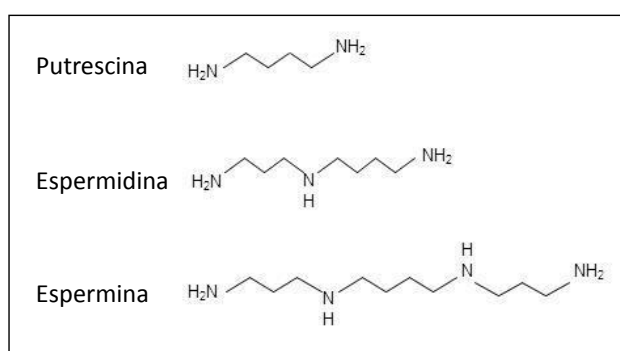


Figura 6- Estrutura molecular das poliaminas putrescina, espermidina e espermina. Fonte: de Oliveira (2017).

1.7. Óxido nítrico

O óxido nítrico (ON) é um radical livre altamente difusível pela membrana plasmática, atuando como mensageiro inter- e intracelular em diversos processos biológicos, incluindo a embriogênese, germinação, rizogênese, morte celular programada, regulação hormonal e respostas ao estresse biótico e abiótico (Santa-Catarina et al., 2007). A síntese de óxido nítrico em plantas, pode ocorrer através da via oxidativa a partir da L-arginina, poliaminas ou hidroxilaminas, enquanto que as reações redutoras ocorrem pela rota da nitrato redutase (NR) associada à membrana plasmática e a mitocôndria (NiNOR) (Tun et al., 2006; Gupta et al., 2011).

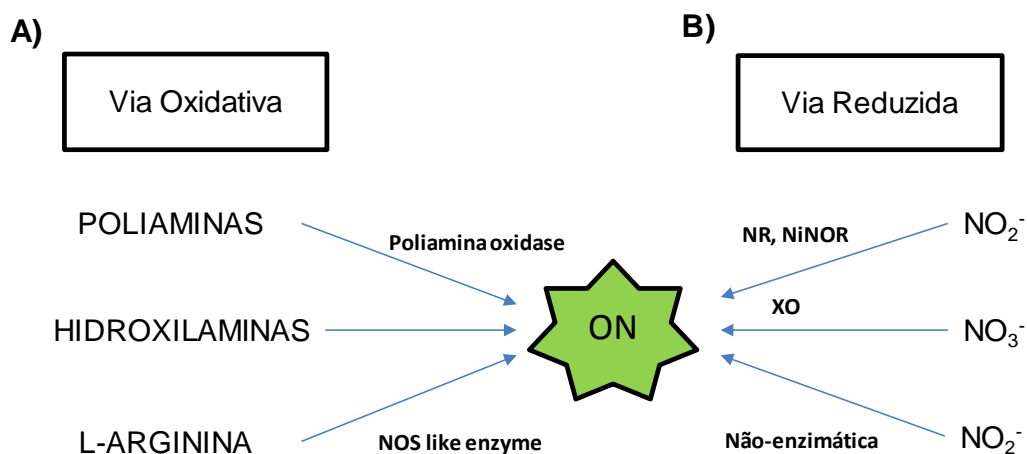


Figura 7: Vias para a biossíntese de ON. **A-** Oxidativa, derivada da oxidação de PAs, hidroxilaminas ou L-arginina; e **B-** Reduzida, decorrente da redução do nitrato (NO₃⁻) ou nitrito (NO₂⁻). NR – nitrato redutase; NiNOR – nitrito:NO redutase; NOS – óxido nítrico sintase; XO – xantina oxidoreductase. Fonte: adaptado de (Procházková et al., 2014).

A estrutura da molécula de ON possui grande capacidade para formar espécies reativas de nitrogênio (ERNs). O radical livre NO[•] pode ganhar ou perder elétrons para formar NO⁻ ou NO⁺; também pode reagir com O₂ para formar NO₂⁻, ou com espécies reativas de oxigênio (EROs), como O₂⁻ para dar origem ao peroxinitrito (ONOO⁻) (Baudouin, 2011). Ademais, o ON atua sobre processos pós-traducionais como S-nitrosação e S-nitrosilação (nitrosilação de metais) (Astier et al., 2018). A S-nitrosação corresponde às modificações pós-traducionais reversíveis onde o ON se associa a resíduos de cisteína, promovendo alterações conformacionais, as quais podem afetar a atividade

proteica, localização celular e interação com outras moléculas (Lamotte et al., 2015). O processo inverso, denominado denitrosilação também é responsável por regular a atividade proteica e a sinalização celular (Martínez-Ruiz et al., 2011). Por ser um radical livre, o ON é capaz de doar elétrons, interagindo com metais de transição através de ligações covalentes com os grupamentos Fe-S, heme e também com proteínas “zinc-finger”, alterando a atividade proteica.

De acordo com (Röszer, 2014), durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*, o ON promove a divisão celular e a formação de células embriogênicas, participando em conjunto com o ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) do estabelecimento de uma população de células competentes para a rota embriogênica. Em *A. angustifolia* a suplementação do meio de cultura com glutathiona (GSH) promoveu uma diminuição nos níveis endógenos de ON e um aumento na diferenciação das massas suspensor embrionárias em embriões somáticos iniciais (estádios I e II de desenvolvimento) (Vieira et al. 2012). Ademais, como relatado por Osti et al. (2010), a aplicação de doadores de ON ao meio de cultura promoveu incremento no crescimento celular após 21 dias de cultivo em culturas de *A. angustifolia*.

A relação entre óxido nítrico e poliaminas durante a embriogênese somática foi relatada em *Ocotea catharinenses* onde a suplementação com Spd e Spm permitiu o total desenvolvimento de embriões através de alterações nos níveis endógenos de ON e PA, sendo que ambos aumentaram durante o cultivo (Santa-Catarina et al., 2007). Estudos reforçando a interação ON/PAs em plantas confirmam a atuação de putrescina sobre o óxido nítrico, onde massas pró-embriogênicas de *A. angustifolia* foram submetidas à aplicação exógena de Put (1.0 mM) provocando incremento na biossíntese de ON (Silveira et al., 2006).

1.8. Glutathiona (GSH)

Glutathiona (γ -glutamilcisteína-glicina) é o principal tiol de baixo peso molecular em células eucarióticas e procarióticas (Noctor et al., 2012; Hausladen et al., 2017). A síntese de GSH se dá através de duas etapas ATP-dependentes (Figura 8), sendo inicialmente catalisada pela γ -glutamilcisteína sintetase (EC 6.3.2.2) originando γ -glutamilcisteína (γ -EC) a partir dos

aminoácidos glutamato e cisteína, em seguida, a glicina é adicionada à extremidade C-terminal de γ -EC pela glutathiona sintetase (GS), dando origem à glutathiona reduzida (Noctor et al., 1998).

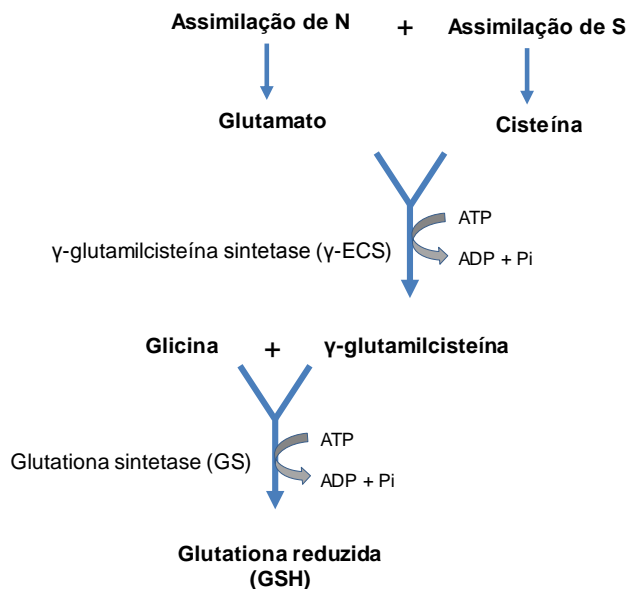


Figura 8: Via de biossíntese da glutathiona reduzida (GSH) a partir dos seus aminoácidos constituintes. Fonte: adaptado de (Noctor et al., 1998).

Dentre as propriedades químicas da glutathiona (GSH) esta a capacidade antioxidante da molécula, mediada pelo grupamento sulfidril da cisteína, a qual frente à oxidação, forma ligações dissulfeto com outra molécula de GSH, gerando a glutathiona oxidada (GSSG). A GSH também pode formar ligações dissulfeto com proteínas e outros grupo tiol, como a Coenzima A (Hausladen et al., 2017). O estado *redox* é um indicador da proteção antioxidante da célula (Hardeland et al., 2000), tal estado se deve à sinais externos que moderam o equilíbrio entre as formas reduzidas e oxidadas de moléculas (Pastori and Foyer, 2002), como a glutathiona reduzida (GSH)/ glutathiona dissulfeto (GSSG), capazes de se interconverterem entre suas formas oxidada e reduzida (Stasolla, 2010).

A redução do GSSG para GSH é mediada pela enzima glutathiona-redutase (GR; EC 1.8.1.7) com o uso de NADPH. Essa interconversão é responsável indiretamente por modular os níveis de ácido ascórbico, já que a GSH é substrato para a reação de redução do dehidroascorbato em ascorbato, um agente antioxidante envolvido na remoção de espécies reativas de oxigênio

(Noctor et al., 2012). Estudos utilizando o modelo *Picea glauca* demonstraram que a manipulação da razão GSH/GSSG promoveu o aumento na formação de pró-embriões, a partir da inversão da razão com a suplementação com GSSG, denotando a importância do balanço oxidativo para o desenvolvimento de embriões somáticos (Belmonte et al., 2005). Somado ao balanço GSH/GSSG, foi sugerido por Vieira (et al, 2012) que em *A. angustifolia* a presença do óxido nítrico pode interferir na polarização dos pró-embriões. A suplementação do meio de cultura com glutatona em baixas concentrações (0,01 e 0,1 mM) pode ter agido como “sequestradora” de ON na pré-maturação de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. No mesmo estudo, foi observado que a suplementação com GSH (5 mM) promoveu queda nos níveis de PAs livres, fato que pode ser associado com a diminuição na taxa de proliferação durante a maturação (Vieira et al., 2012)

No âmbito de manipulação do ambiente *redox*, observou-se em *A. thaliana* indução no crescimento radicular quando GSH exógena foi aplicada, em contrapartida, quando inserido L-butionina sulfoximina (BSO), o efeito da glutatona foi inibido (Sánchez-Fernández et al., 1997).

1.9. Importância do estudo

Na família Pinaceae, a proliferação da massa pró-embrionária (MPE) ocorre na presença de auxinas e citocininas, sendo que a formação dos poliembriões somáticos somente é acionada após a retirada por 14 dias dos reguladores de crescimento do meio de cultura (dos Santos et al., 2016) (Figura 9A). Este procedimento permite uma maior sincronização das culturas embriogênicas, e o desenvolvimento de um grande número de estruturas receptivas aos agentes promotores de maturação (ABA e agentes osmóticos).

Diferentemente ao observado para outras coníferas, a indução e proliferação das culturas embriogênicas em *A. angustifolia* pode ser feita em meio de cultura isento de auxinas e citocininas. Este fato, apesar de ser considerado como uma vantagem por atenuar os problemas associados ao cultivo prolongado em meio contendo reguladores de crescimento (variação somaclonal), impossibilita a formação de poliembriões somáticos (estádio I)

pela simples retirada das auxinas e citocininas do meio de cultura. Como resultado, as culturas embriogênicas de *A. angustifolia* são formadas apenas por agregados celulares contendo células embrionárias e de suspensor com diferentes tamanhos, e por um baixo número de poliembriões somáticos (Figura 9B). A ausência de embriões somáticos e a genótipo-dependência da resposta das culturas ao ABA tem dificultado a fase de maturação dos embriões, haja vista que o ABA provoca a oxidação das estruturas embrionárias menos evoluídas morfologicamente (Jo et al., 2014).

Os resultados até agora observados, com a manipulação *in vitro* dos poliembriões somáticos, e dos estudos dos aspectos bioquímicos e fisiológicos da semente de *A. angustifolia* (Vieira et al., 2012; Jo et al., 2014; Elbl et al., 2015; dos Santos et al., 2016; Navarro et al., 2017; de Oliveira et al., 2018), é possível sugerir que muitas das condições utilizadas para a regeneração de plantas via PS em espécies da família Pinaceae não possam ser integralmente utilizadas para *A. angustifolia*. Portanto, para *A. angustifolia* é necessário que sejam feitos aperfeiçoamentos no meio de cultura visando aumentar a quantidade e a qualidade dos embriões somáticos produzidos. Durante o cultivo *in vitro*, a aplicação de condições estressantes via estímulos físicos e/ou químicos são muitas vezes utilizadas para o desencadeamento de respostas morfogenéticas. Portanto, o nível de tolerância ao estresse apresentado por cada linhagem celular pode influenciar a sua adaptação às condições artificiais utilizadas no cultivo *in vitro*. Linhagens celulares com alto potencial embriogênico apresentam um aparato redox mais ativo quando comparado a linhagens celulares incapazes de desenvolverem embriões somáticos. No presente trabalho foi testada a suplementação do meio de cultura com a L-arginina (5 e 10 mM) durante a fase de pré-maturação das culturas embriogênicas. A incorporação da L-arginina teve como objetivo avaliar as alterações promovidas em compostos relacionados a resistência ao estresse como o óxido nítrico, poliaminas, aminoácidos e atividade da arginina descarboxilase e ornitina descarboxilase em culturas com diferentes potenciais embriogênicos, e na formação de embriões somáticos estádios I e II de desenvolvimento (Figura 9C).

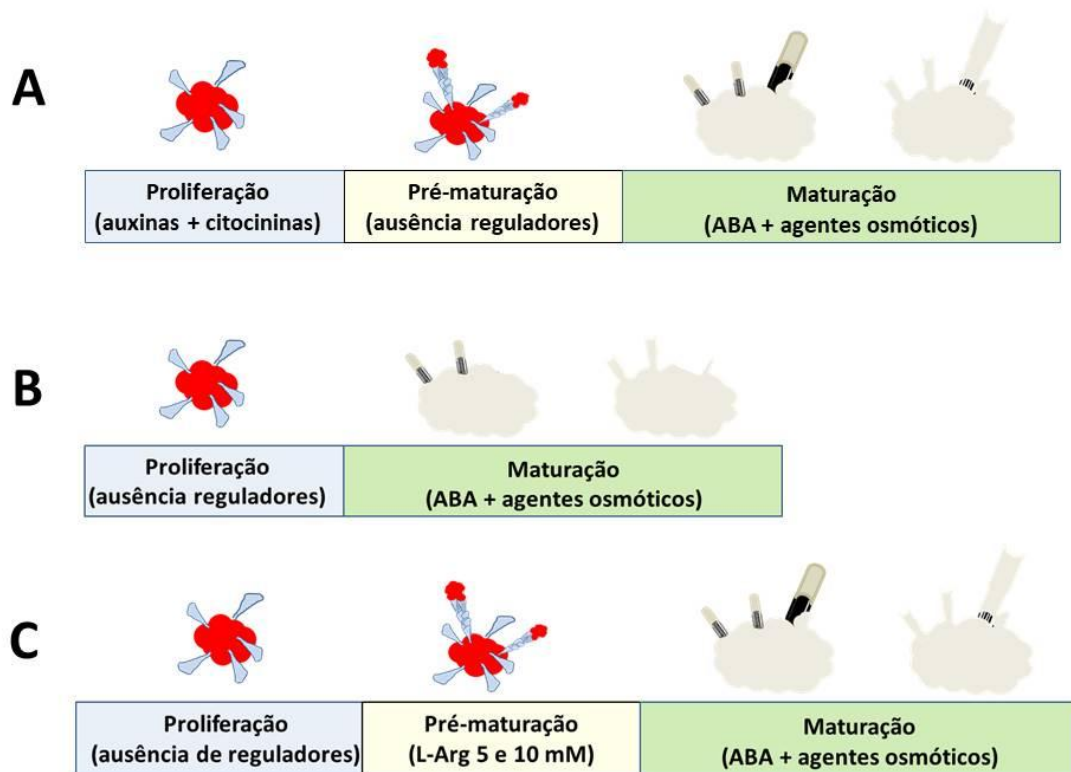


Figura 9 – Desenvolvimento de embriões somáticos em membros da família Pinaceae e a estratégia utilizada em *Araucaria angustifolia*. **A-** Nos membros da família Pinaceae a transição entre os ciclos de proliferação e desenvolvimento dos embriões somáticos ocorre após a retirada dos reguladores de crescimento do meio de cultura (meio de pré-maturação). **B-** Na *A. angustifolia* não é feita a pré-maturação das culturas, o que pode acarretar em um número reduzido de embriões somáticos. **C-** Abordagem do presente estudo. Realização de uma pré-maturação em meio suplementado com L-arginina levaria a alteração de compostos relacionados a uma maior resistência ao estresse (poliaminas, óxido nítrico, aminoácidos e atividade da ADC e ODC) decorrente durante a fase de maturação.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da suplementação da L-arginina durante a proliferação e maturação dos embriões somáticos de *Araucaria angustifolia*, e sua influência na emissão de óxido nítrico intracelular, perfis de poliaminas e aminoácidos.

As estratégias para o desenvolvimento do trabalho estão apresentadas abaixo:

- 1- Induzir e proliferar linhagens celulares embriogênicas em meio de cultura isento de reguladores de crescimento
- 2- Avaliar a emissão de óxido nítrico intracelular e o incremento em biomassa (massa fresca e peso seco) em linhagens celulares com diferentes potenciais embriogênicos proliferadas em meio líquido suplementado com L-arginina (5 e 10 mM)
- 3- Analisar o perfil de poliaminas e aminoácidos, e sua associação com a emissão de ON nas linhagens celulares proliferadas na presença de L-arginina (5 e 10 mM)
- 4- Aperfeiçoar o meio de maturação dos embriões somáticos utilizando diferentes concentrações de glutatona e butionina sulfoxilamina (BSO).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

3.1.1. Embriogênese zigótica

Embriões zigóticos imaturos de *A. angustifolia* foram coletados entre os meses de novembro e dezembro de 2016 no Parque Estadual de Campos do Jordão **Latitude: -22.7386, Longitude: -45.5921 22° 44' 19" Sul, 45° 35' 32" Oeste** , localizado no município de Campos do Jordão, Estado de São Paulo.

3.2. Embriogênese somática

Para a realização de estudos envolvendo a embriogênese somática foram utilizadas linhagens celulares embriogênicas induzidas e proliferadas no BIOCEL de acordo com dos Santos *et al* (2008). Os genótipos já estabelecidos foram caracterizados quanto ao seu potencial embriogênico (classificadas como responsivas ou bloqueadas para a formação de embriões somáticos) por Jo *et al*, (2014) e de Oliveira *et al* (2017). Linhagens celulares bloqueadas (B) não respondem aos estímulos fornecidos por agentes osmóticos e ácido abscísico (ABA), não formando embriões somáticos. Linhagens celulares responsivas (R) produzem embriões somáticos pré-cotiledonares e cotiledonares quando cultivadas na presença de agentes osmóticos e ABA (de Oliveira *et al.*, 2018)

3.2.1. Indução das culturas embriogênicas

Para a indução, sementes imaturas de *A. angustifolia* (provenientes de três matrizes) foram removidas dos seus cones e em seguida submetidas à assepsia com etanol 70% (v/v) por 5 minutos e em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v) por 20 minutos, ambas sob agitação, seguido de três lavagens com H₂O destilada autoclavada. Os embriões zigóticos imaturos foram retirados do megagametófito para serem utilizados como explantes e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura BM (Gupta and Pullman, 1991) (10 mL/tubo) 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}). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com 1 mM de NaOH e HCl. O meio de cultura foi autoclavado à temperatura de $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. Os tubos com embriões inoculados foram mantidos durante 45 dias, no escuro à temperatura de $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período foi calculada a porcentagem de indução onde cada embrião inoculado apresentando uma massa celular branco translúcida e de aspecto mucilaginoso foi caracterizado como uma cultura embriogênica (CE).

3.2.2. Proliferação das culturas embriogênicas

Após 45 dias, as CE das linhagens induzidos no ano de 2016, foram proliferadas em meio de cultura MSG-0 (Becwar et al., 1989) suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}) e glutamina ($1,46 \text{ g.L}^{-1}$) e mantidas no escuro, à temperatura de $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Em intervalo de 15 dias, as culturas embriogênicas foram subcultivadas em meio de cultura fresco de mesma constituição. A caracterização das linhagens celulares com relação a presença de estruturas pró-embriogênicas foi realizada através da técnica de coloração com acetocarmine 1% (p/v) e azul de Evans 0,05% (p/v) (Gupta and Durzan, 1987).

3.2.3. Estabelecimento de suspensões celulares

De acordo com dos Santos et al (2008) foram estabelecidas suspensões celulares utilizando 500 mg de CE dissociadas em 4 mL de meio MSG-0 líquido, sendo posteriormente transferidas para frascos Erlenmeyer (150 mL) contendo 25 mL de meio MSG-0 líquido . As suspensões foram mantidas no escuro, à temperatura de $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ em agitadores com rotação de 120 rpm. Após três ciclos de subcultivo de 12 dias as suspensões celulares foram consideradas estabelecidas. .

3.2.4. Maturação das culturas embriogênicas

3.2.4.1. Maturação das CEs suplementadas com L-arginina durante a proliferação

O experimento de maturação com pré-tratamento com L-arginina (5 e 10 mM) foi realizado durante a fase de proliferação nas mesmas condições de cultivo do item 3.3.2, as CEs foram cultivadas em placas de seis poços, cada um contendo 50 mg/ mL de CEs dissociadas em 5 mL de MSG-0. Após a fase

de pré-maturação, 100 mg (peso fresco) de cada uma das suspensões celulares foram transferidas em triplicata para placas de Petri (90x15) e dispostas sob papel filtro (70 mm), o meio de cultura utilizado foi o MSG básico, solidificado com com Gelrite[®] (Sigma-Aldrich[®]) (3 g.L⁻¹), suplementado com L-glutamina (1,46 g.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), carvão ativado (3 g.l⁻¹) e ABA. As CEs em triplicata foram mantidas no escuro, à temperatura de 25° ± 2°C durante 60 dias . Após 60 dias de cultivo, amostras contendo 50 mg de calos embriogênicos contendo na sua superfície embriões somáticos nas fases I e II de desenvolvimento foram dissociados em 0,5 mL de água destilada autoclavada. Alíquotas contendo 0,1 mL destas suspensões foram dispersos em laminas (30 lâminas por tratamento) e inspecionadas em microscópio para a contagem do número de embriões somáticos (foram anotados os embriões formados nos estádios I e II).

3.2.4.2. Manipulação do ambiente *redox* durante maturação utilizando GSH e BSO

Para o experimento de maturação nos pré-tratamentos (14 dias) utilizando glutathione (0.1 mM), as CEs estabelecidas foram cultivadas em triplicata em placas de Petri (90x15) contendo 50 mg/ mL (peso fresco) de CEs dissociadas e dispostas sob discos de papel filtro (70 mm) na forma de quatro gotas, o meio de cultura utilizado foi o MSG, solidificado com Gelrite[®] (Sigma-Aldrich[®]) (3 g.L⁻¹), suplementado com L-glutamina (1,46 g.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), carvão ativado (3 g.l⁻¹). As culturas foram mantidas no escuro, à temperatura de 25° ± 2°C. Posteriormente, as CEs foram transferidas para novo meio de maturação suplementado com BSO e ácido absísico (ABA).

Para os experimentos de maturação no pré-tratamento com 0.1 mM de glutathione (14 dias) e BSO (60 dias), as CEs estabelecidas foram cultivadas em placas de Petri (90x15) contendo 50 mg/ mL (peso fresco) de CEs dissociadas e dispostas sob discos de papel filtro (70 mm) na forma de quatro gotas (Figura 1 - material suplementar), o meio de cultura utilizado foi o MSG , solidificado com com Gelrite[®] (Sigma-Aldrich[®]) (3 g.L⁻¹), suplementado com L-glutamina (1,46 g.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), carvão ativado (3 g.l⁻¹) e o agente promotor de maturação, ácido absísico (ABA). Para ambos experimentos, foi

realizado a contagem de embriões após o período de incubação, em conjunto com a análise morfológica dos embriões formados.

3.2.5. Dinâmica de crescimento das suspensões celulares

A metodologia descrita por Osti et al. (2010), durante 16 dias, em intervalos de 2 dias o crescimento foi observado e mensurado em milímetros. Para tal, suspensões celulares em triplicatas contendo 100 mg de células dissociadas em meio de cultivo idêntico ao descrito no item 3.3.2. e foram depositados em frasco Erlenmeyers próprios para crescimento na presença de 5 e 10 mM de L-arginina.

3.3. Análises bioquímicas

3.3.1. Manipulação e quantificação dos níveis endógenos de óxido nítrico (ON)

As linhagens celulares foram estabelecidas como suspensões de acordo com dos Santos *et al*, (2008). A manipulação dos níveis endógenos de ON foi realizada utilizando 600 mg de massa fresca (MF) inoculadas em 2 mL do meio MSG-0 líquido suplementado com 5 e 10 mM de L-arginina em cultivo durante 12 dias. Massas celulares embriogênicas não utilizadas para a quantificação do ON foram coletadas em triplicata (200 mg de peso fresco por replicata) para o ponto de 12 dias em cada uma das linhagens celulares e posteriormente utilizada nas análises bioquímicas.

Para a quantificação do ON endógeno nas culturas embriogênicas foi realizada análises de acordo com a metodologia descrita por Silveira et al. (2006). O ON intracelular pela aplicação do fluoróforo permeável DAR 4M AM (Diaminorhodamina 4M acetoxymethyl) (5 μ M). A quantificação da fluorescência foi realizada com o fluorômetro (Victor 3TM) e a visualização em um microscópio de fluorescência Axio Imager M2 (Zeiss).

3.3.2. Perfil e conteúdo de aminoácidos

Para a determinação do perfil de aminoácidos nas CEs foi utilizada a extração de acordo com Minocha et al. (1994). Alíquotas de 200 mg MF das CEs armazenadas a -80°C foram descongeladas à temperatura ambiente e

posteriormente homogeneizadas com 800 μL de ácido perclórico 5% (v/v) e submetidas a três ciclos de congelamento (a -20°C durante 4h) e descongelamento (em temperatura ambiente durante 1h30). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante contendo os aminoácidos foi coletado e derivatizados com oftalaldeído-borato e identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa C_{18} ($5\mu\text{m} \times 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ – (Shim-pack CLC ODS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). O detector de fluorescência (Shimadzu, RF-20A) foi ajustado para excitação em 250 nm e emissão em 480 nm. Áreas de picos e tempos de retenção foram mensurados pela comparação com quantidades conhecidas de padrões de aminoácidos: alanina (Ala), ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), arginina (Arg), glutamina (Gln), histidina (His), ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina (Gly), treonina (Ter), tirosina (Tir), metionina (Met), triptofano (Trp), valina (Val), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lis) e ornitina (Orn). As análises foram realizadas em triplicatas biológicas.

3.3.3. Perfil e conteúdo de poliaminas (PAs)

A extração de poliaminas livres e conjugadas foi realizada de acordo com o procedimento descrito por (Bhatnagar et al., 2001)), utilizando três replicatas biológicas. As amostras foram extraídas utilizando ácido perclórico 5% (PCA) na proporção 1:4 (w/v), seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento, em seguida foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 11.000 rpm e subsequente coleta do sobrenadante. As amostras foram armazenadas a -20°C até análise.

A derivatização das poliaminas livres foi executada de acordo com Silveira (et al., 2006). Quarenta μL de amostra foram adicionados à 100 μL de cloreto de dansil (5 mg ml^{-1} em acetona), 20 μL de diaminoheptano 0.05 mM (padrão), e 50 μL de carbonato de sódio saturado. Após 50 minutos de incubação do escuro a 70°C , o excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansilalanina pela adição de 25 μL de alanina (100 mg ml^{-1}), seguido de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. As poliaminas foram extraídas com 200 μL de tolueno e o sobrenadante coletado e seco com o

auxílio do Speed-Vac a 45 °C. As poliaminas dansiladas foram dissolvidas em 200 µL de acetonitrila.

As poliaminas foram separadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando uma coluna C18 de fase reversa (Shim-pack CLC ODS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). A área de cada pico e o tempo de retenção para cada poliamina foi determinado por comparação com concentrações conhecidas das principais poliaminas encontradas em plantas: putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm).

3.3.2. Perfil da atividade enzimática da arginina decarboxilase

A determinação da atividade enzimática foi realizada de acordo com de Oliveira *et al* (2017). As amostras foram homogeneizadas em nitrogênio líquido em conjunto ao tampão de extração (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.5 mM pyridoxal-5-phosphate, 0.1 mM EDTA e 5 mM ditioneitol) na proporção 1:1 (100 µL para 100 mg de massa fresca). A solução foi centrifugada (11.000 rpm, 4°C por 20 minutos) e o sobrenadante coletado para os ensaios enzimáticos da arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC). Para os ensaios, utilizou-se um mix de reação contendo 200 µL de extrato protéico, 8.3 µL do tampão de extração, 12 mM L-Arg ou L-Orn não marcadas e 25 nCi de L-[¹⁴C(U)]-Arg ou L-[1-¹⁴C]-Orn. Como controle amostral, foi utilizado apenas 200 µL do tampão de extração. A reação foi incubada em frascos de vidro vedados contendo discos de papel filtro embebidos em 2 N KOH. O material foi mantido à 37°C, à 120 rpm durante 90 minutos até a adição de 200 µL de ácido perclórico 5% (v/v), seguido de incubação por 15 minutos. O papel filtro contendo ¹⁴CO₂ foi imerso em 1 mL do líquido de cintilação (PerkinElmer) e a radiatividade mensurada utilizando cintilador (Tri-Carb2910TR, PerkinElmer). As atividades foram expressas em nmol ¹⁴CO₂ mg protein⁻¹h⁻¹. O conteúdo proteico foi mensurado utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976) com albumina sérica bovina como padrão. A atividades específicas foram mensuradas a partir de três réplicas biológicas.

3.4. Delineamento experimental

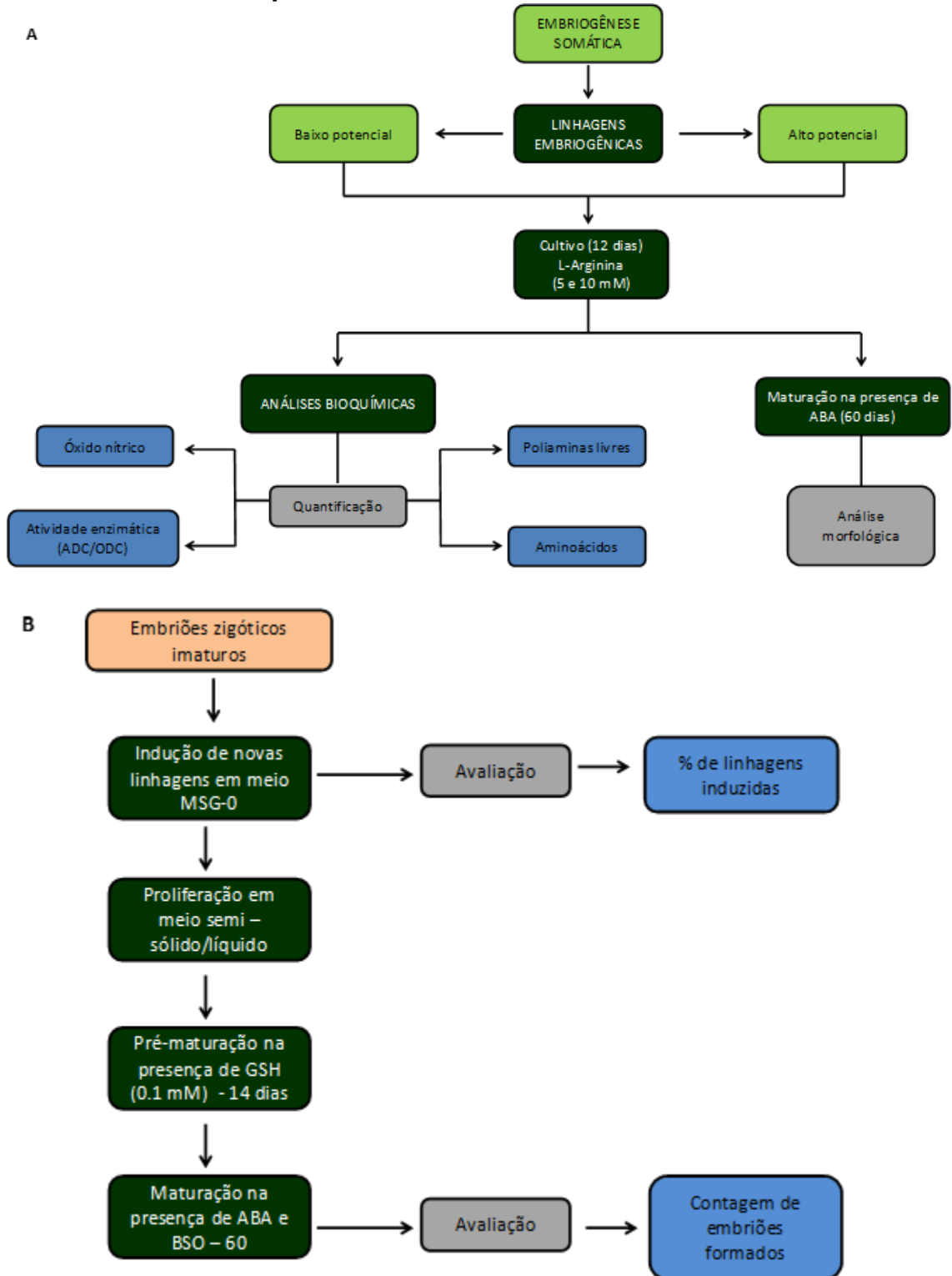


Figura 10: Fluxogramas para o desenvolvimento do trabalho. **A** – fluxograma para análises com linhagens celulares já estabelecidas no Biocel; **B** – fluxograma para indução, estabelecimento e maturação de novas linhagens celulares.

4. RESULTADOS

4.1. Dinâmica de crescimento e incremento de biomassa

Afim de determinar a influência da suplementação da L-arginina na proliferação e incremento de biomassa das linhagens celulares de *A. angustifolia*, as linhagens B e R foram cultivadas durante 15 dias na presença de 5 ou 10 mM de L-arginina. Com relação a dinâmica de crescimento, não foi possível observar de forma clara todas as fases de crescimento normalmente presentes em suspensões celulares (fases lag, log, linear e estacionária). A linhagem B apresentou uma fase lag que se estendeu até o sexto dia de proliferação, entrando posteriormente na fase linear que se estendeu para os tratamentos contendo L-arg (5 e 10 mM) até o décimo quinto dia de medição. Apenas para o tratamento controle (linhagem B) foi possível observar a fase estacionária de crescimento, a qual foi registrada entre os dias 12 e 15 de medição. Para a linhagem R, todos os tratamentos apresentaram ausência da fase lag e log, entrando diretamente na fase linear de crescimento. A partir do décimo dia de medição foi observado o início do declínio no volume celular sedimentado indicando a entrada das suspensões celulares na fase estacionária de crescimento.

Comparativamente, a linhagem R apresentou ao final do décimo quinto dia de medição os maiores valores para o volume celular sedimentado (VSC), quando comparada aos valores registrados para a linhagem B (diferenças de até 45% entre os controles). Contudo, em ambas as linhagens celulares foi observado uma diminuição do VCS nos tratamentos suplementados com L-arg (5 e 10 mM) quando comparada aos respectivos controles. Com relação ao incremento de biomassa (peso seco) registrado ao final do décimo quinto dia de cultivo, a linhagem R apresentou uma diminuição significativa no peso seco ($P < 0,05$) para o tratamento com 5 mM de L-arg. Para a linhagem B, ambos os tratamentos contendo a L-arg tiveram uma redução significativa ($P < 0,05$) para o incremento de biomassa.

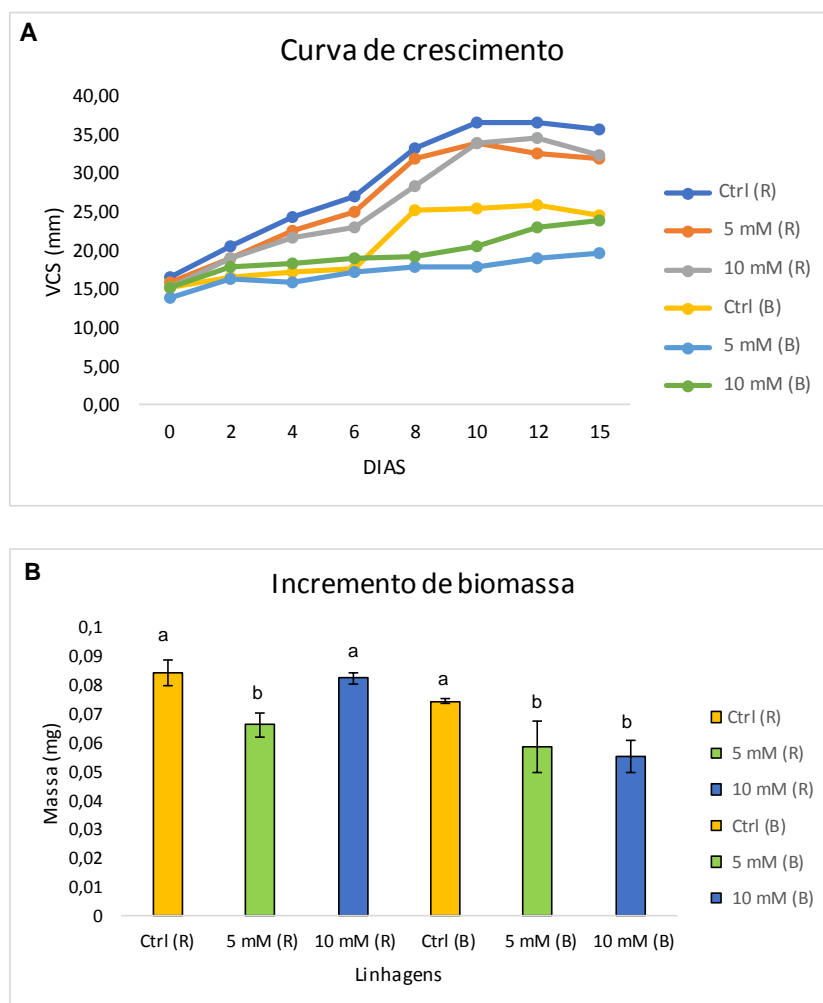


Figura 11- Dinâmica de crescimento e incremento de biomassa em suspensões celulares de *A. angustifolia* cultivadas em meio suplementado com L-arginina (5 e 10 mM). **A-** Volume celular sedimentado das suspensões celulares das linhagens Responsiva (R) e Bloqueada (B) após 12 dias de cultivo em meio MSG suplementado com L-arginina. **B-** Incremento em biomassa (peso seco) das linhagens Responsiva (R) e Bloqueada (B) após 12 dias de cultivo em meio líquido MSG suplementado com L-arginina. As barras verticais representam valores do erro padrão derivados de três réplicas biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$ ajustado pelo método de Tukey); Letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

4.2. Determinações bioquímicas nas linhagens celulares B e R cultivadas em meio MSG suplementado com a L-arg

Após doze dias de cultivo na presença da L-arg (5 e 10 mM) as suspensões celulares das linhagens celulares R e B foram analisadas com relação a: a) conteúdo endógeno de óxido nítrico, b) determinação da viabilidade celular, c) níveis de poliaminas livres, d) quantificação de

aminoácidos e e) atividade das enzimas arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC).

4.3. Determinação do conteúdo endógeno de óxido nítrico

Para a linhagem celular B foi observado um aumento significativo ($P < 0,01$) na emissão do ON endógeno no 12º de cultivo em tratamentos suplementados com a L-arg. Já para a linhagem R foi observada uma diminuição significativa ($P < 0,01$) na emissão do ON endógeno nos tratamentos suplementados com a L-arg.

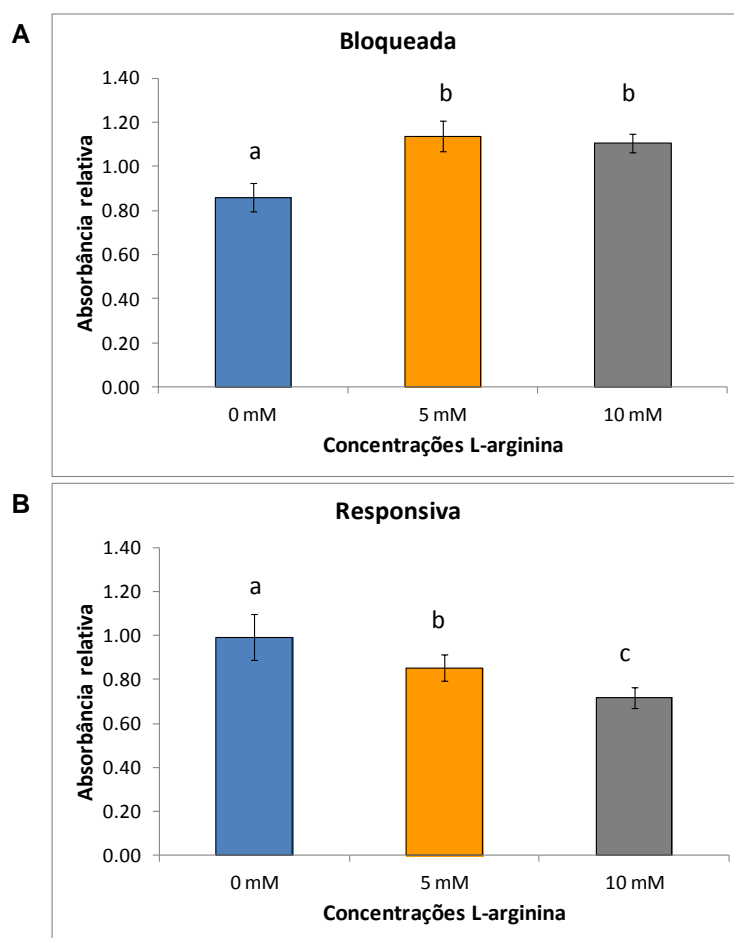


Figura 12 – Emissão do óxido nítrico endógeno registrado com o fluoróforo DAR 4M-AM em suspensões celulares de *A. angustifolia* cultivadas durante 12 dias em meio líquido MSG suplementado com L-arginina. **A** - Linhagem celular bloqueada para a formação de embriões somáticos e **B** - linhagem celular responsiva para a formação de embriões somáticos. As barras verticais representam valores do erro padrão derivados de três réplicas biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,01$ ajustado pelo método de Tukey); Letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

4.4. Teste de viabilidade celular

Para o teste de viabilidade celular foi utilizada a reação com o diacetato de fluoresceína (FDA). Neste teste apenas células que apresentam integridade de membrana plasmática conseguem reter o produto da degradação do FDA por esterases (fluoresceína). Na linhagem B foi observada uma diminuição significativa da viabilidade celular no tratamento contendo 5 mM de L-arg ($P < 0,01$), sendo que os tratamentos controle e 10 mM L-arg não diferiram significativamente entre si ($P < 0,01$). Já para a linhagem R não foi possível observar diferenças significativas ($P < 0,01$) para a viabilidade celular entre os tratamentos testados.

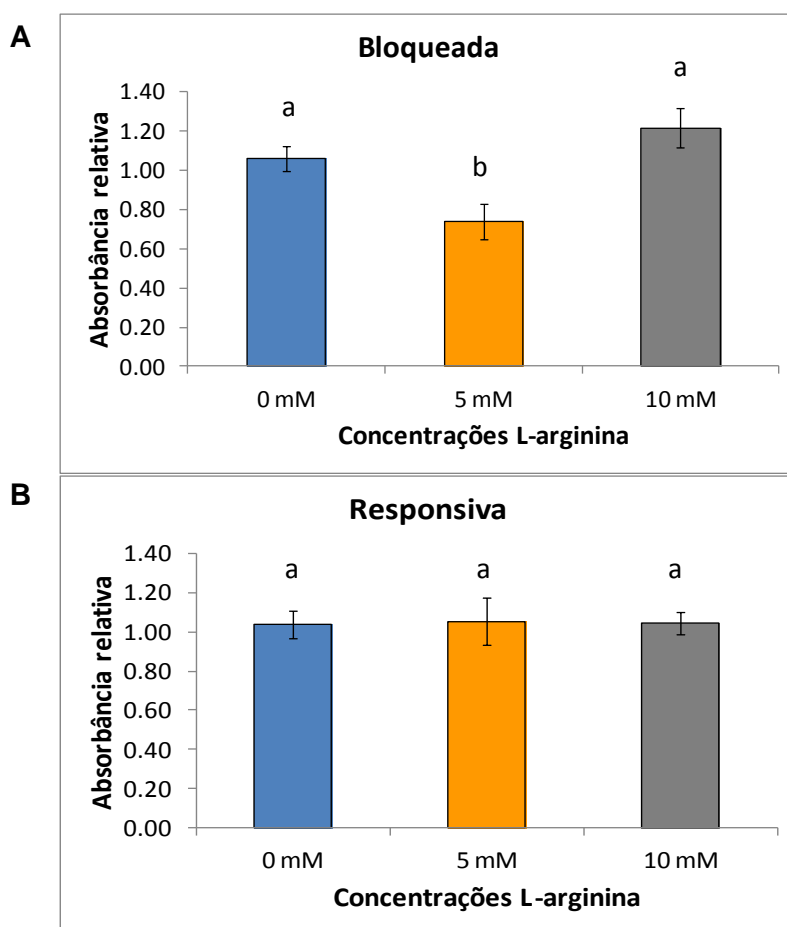


Figura 13 – Determinação da viabilidade celular utilizando o teste com diacetato de fluoresceína (FDA) em suspensões celulares de *A. angustifolia* cultivadas durante 12 dias em meio líquido MSG suplementado com L-arginina. **A** - Linhagem celular bloqueada para a formação de embriões somáticos e **B** - linhagem celular responsiva para a formação de embriões somáticos. As barras verticais representam valores do erro padrão derivados de três réplicas biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,01$ ajustado pelo método de Tukey); Letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

4.5. Determinação dos perfis de poliaminas (PAs) livres e da relação Put/Spd

A determinação do perfil de poliaminas livres (PAs) foi baseado na identificação das principais PAs que ocorrem em plantas (putrescina, espermidina e espermina). Independentemente da linhagem celular e do tratamento aplicado, a putrescina (Put) foi a poliamina livre (PA) registrada em maior quantidade, seguida pelo acúmulo de espermidina (Spd) e espermina (Spm).

Na linhagem B, a suplementação do meio de cultura com a L-arg (5 e 10 mM) provocou um aumento significativo ($P < 0,01$) na quantidade de Put acumulada pelas células (Figura 14). Uma situação semelhante ocorreu para a Spm (Figura 15), onde a L-arg também provocou um aumento significativo ($P < 0,01$) desta PA em relação ao tratamento controle. Já para a Spd (Figura 16) não foi possível observar diferenças significativas ($P < 0,01$) entre o tratamento controle e os suplementados com a L-arg. Na linhagem R, a presença da L-arg não alterou, após 12 dias de cultivo, significativamente os valores de Put, Spd e Spm.

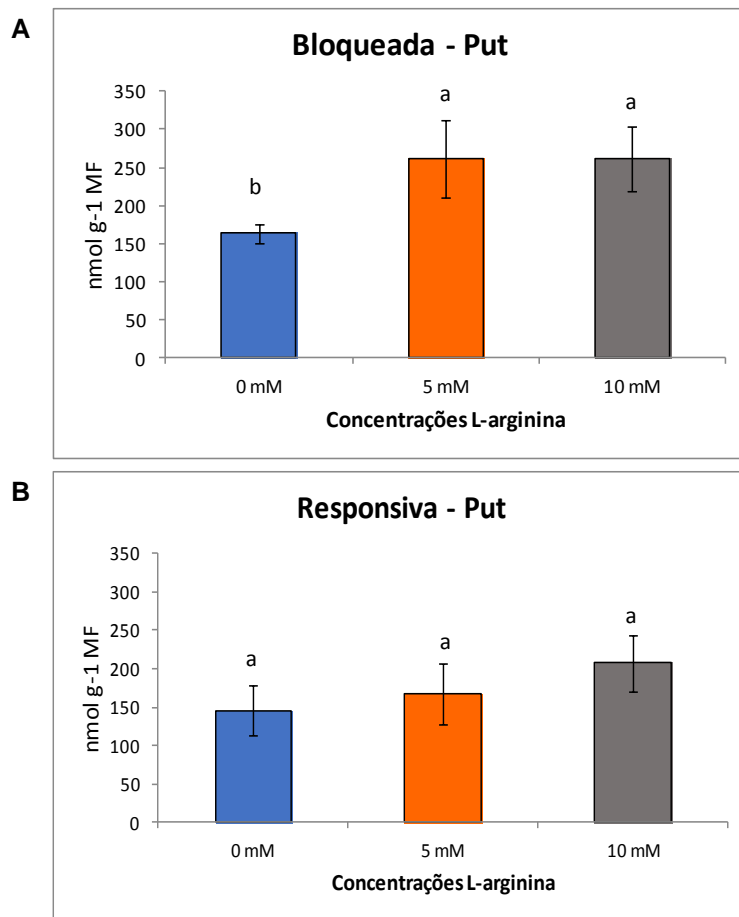


Figura 14- Conteúdo de putrescina (nmol g⁻¹ MF) em suspensões celulares de *A. angustifolia* cultivadas durante 12 dias em meio líquido MSG suplementado com L-arginina. **A-** Linhagem celular bloqueada para a formação de embriões somáticos e **B-** Linhagem celular responsiva para a formação de embriões somáticos. As barras verticais representam valores do erro padrão derivados de três réplicas biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,01$ ajustado pelo método de Tukey); Letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

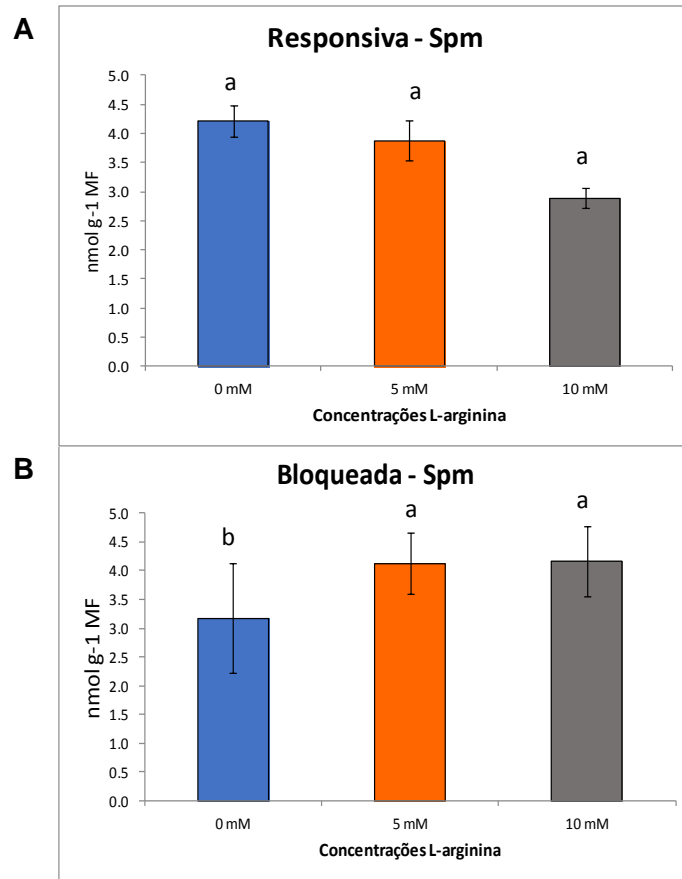


Figura 15 - Conteúdo de espermina (nmol g⁻¹ MF) em suspensões celulares de *A. angustifolia* cultivadas durante 12 dias em meio líquido MSG suplementado com L-arginina. **A**- Linhagem celular bloqueada para a formação de embriões somáticos e **B**- Linhagem celular responsiva para a formação de embriões somáticos. As barras verticais representam valores do erro padrão derivados de três réplicas biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,01$ ajustado pelo método de Tukey); Letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

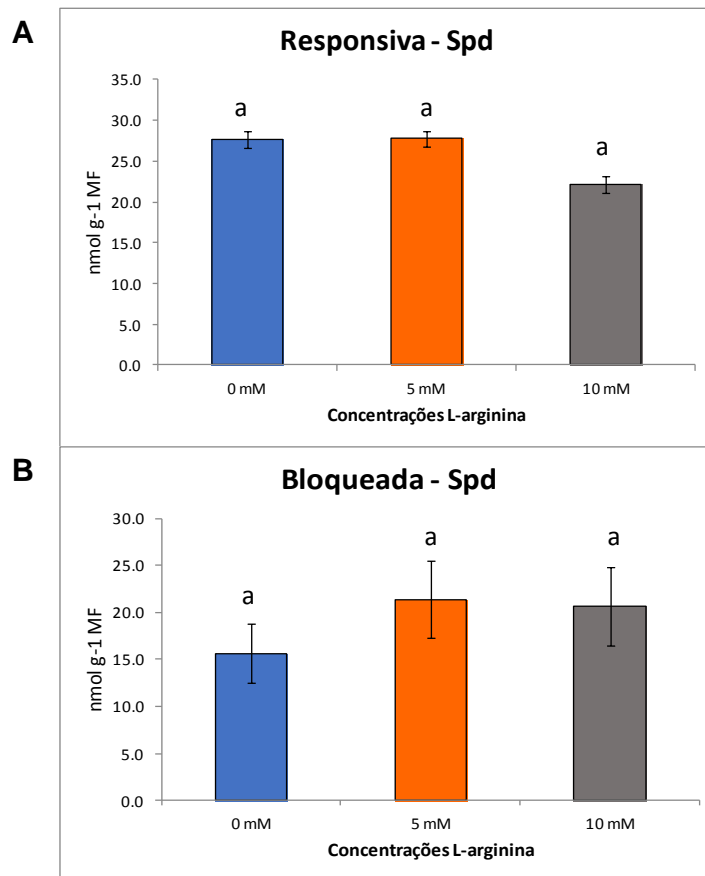


Figura 16 – Conteúdo de espermidina (nmol g⁻¹ MF) em suspensões celulares de *A. angustifolia* cultivadas durante 12 dias em meio líquido MSG suplementado com L-arginina. **A-** Linhagem celular bloqueada para a formação de embriões somáticos e **B-** Linhagem celular responsiva para a formação de embriões somáticos. As barras verticais representam valores do erro padrão derivados de três réplicas biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,01$ ajustado pelo método de Tukey); Letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

Além da determinação dos perfis de PAs livres, foi feita também a determinação da relação Put/Sdp livre (Figura 17). Esta relação tem sido sugerida na embriogênese somática de Angiospermas e Gimnospermas como um marcador para a identificação de linhagens celulares com maior potencial embriogênico (de Oliveira et al., 2018). De acordo com esta relação, quanto menor o valor da relação Put/Sdp, maior o potencial embriogênico da linhagem celular. Para os testes realizados com as linhagens R e B foi possível observar um valor significativamente menor ($P < 0,05$) para a relação Put/Sdp na linhagem com maior potencial embriogênico (R). Contudo, foi possível também observar na linhagem R que a suplementação com a 10 mM L-arg provocou um aumento significativo ($P < 0,01$) da relação Put/Sdp, sugerindo uma perda do potencial embriogênico na linhagem responsiva.

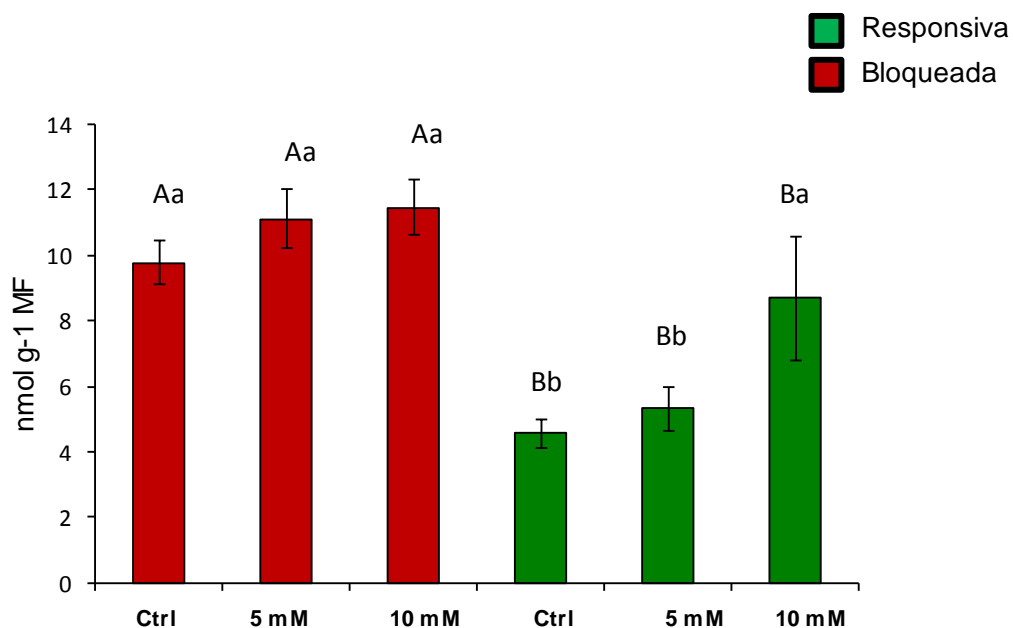


Figura 17 - Relação Put/Spd livre em suspensões celulares de *A. angustifolia* com diferentes potenciais embriogênicos (linhagem Responsiva e Bloqueada), cultivadas durante 12 dias em meio líquido MSG suplementado com L-arginina. As barras verticais representam valores do erro padrão derivados de três réplicas biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,01$ ajustado pelo método de Tukey); Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$ ajustado pelo teste T de Student) quando feita a comparação entre os pares (ex: controle da linhagem R x controle da linhagem B). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si.

4.6. Determinação dos perfis de aminoácidos

No total 18 aminoácidos foram identificados nas linhagens responsiva (R) e bloqueada (B), cultivadas em meio suplementado com L-arginina (5 e 10 mM) (Tabela 1). Destes, apenas nove (Figura 18) apresentação diferenças significativas entre si, dos quais a treonina foi o único aminoácido que não apresentou diferenças significativas ($P > 0,01$) entre a condição controle das linhagens R e B. Para a linhagem R foram observadas alterações significativas ($P < 0,01$) após a suplementação com a L-arg (5 ou 10 mM) no nível dos aminoácidos ácido aspártico, citrulina, serina, glutamina, arginina, treonina. Já para a linhagem B foram observadas alterações significativas ($P < 0,01$) para os aminoácidos ácido glutâmico, asparagina, serina, glutamina, glicina, treonina e ornitina.

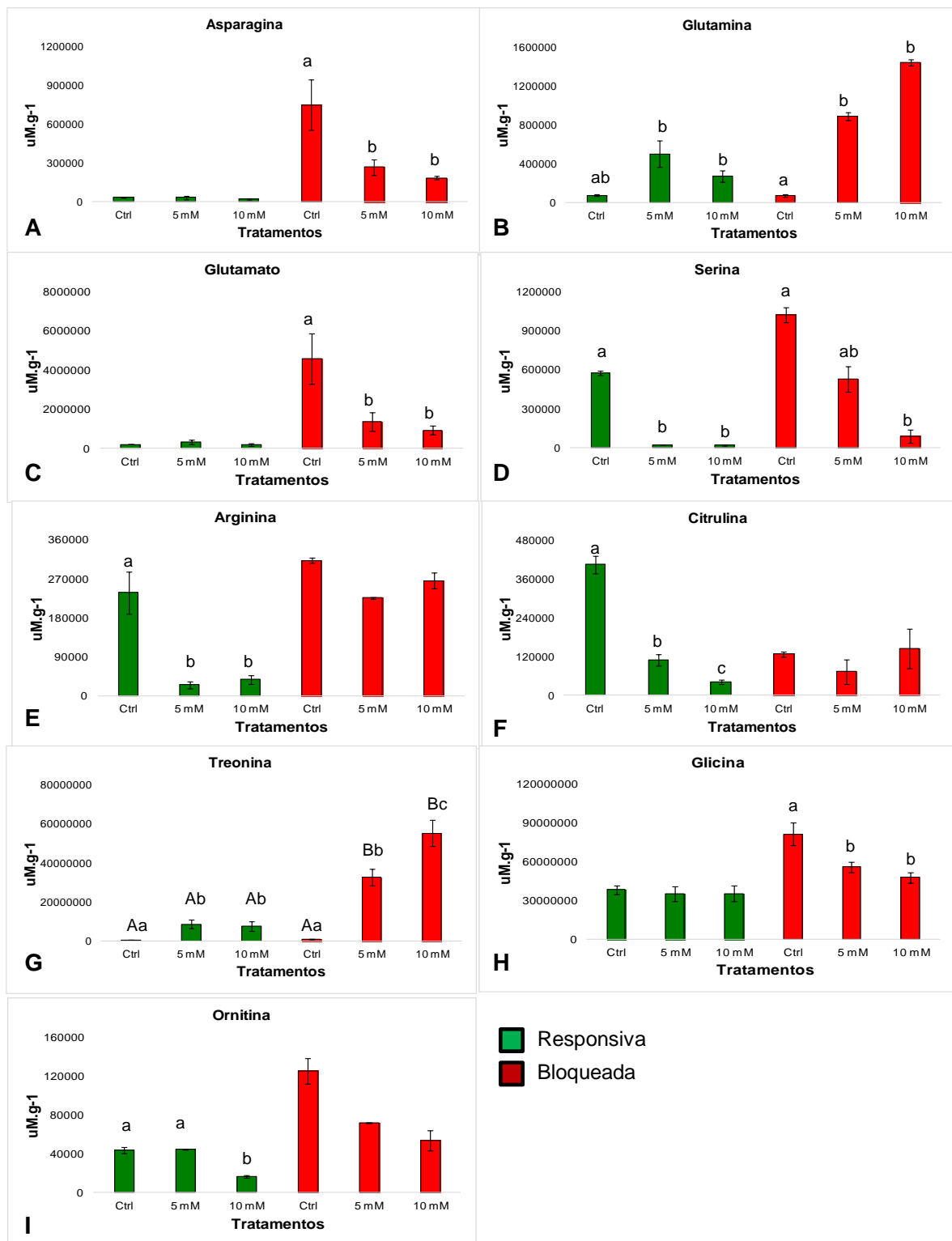


Figura 18 - Conteúdo de aminoácidos (mol g⁻¹ MF) em suspensões celulares de *A. angustifolia* cultivadas durante 12 dias em meio líquido MSG suplementado com L-arginina. Os nove aminoácidos significativamente diferentes identificados foram: **A** - Asparagina; **B** - Glutamina; **C** - Glutamato; **D** - Serina; **E** - Arginina; **F** - Citrulina; **G** - Treonina; **H** - Glicina; **I** - Ornitina. As barras verticais representam valores do erro padrão derivados de três réplicas biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam

diferença estatística ($P < 0,01$ ajustado pelo método de Tukey); Ausência de letras indicam que as amostras não diferem estatisticamente entre si.

Na linhagem R, com exceção da glutamina e da treonina, a suplementação com 10 mM de L-arg provocou uma redução significativa ($P < 0,01$) no nível do ácido aspártico, citrulina, serina, arginina, tirosina e ornitina. Para 5 mM de L-arg os níveis destes aminoácidos foram semelhantes ou então inferiores ao tratamento controle. Para a linhagem B, com exceção da glutamina, treonina e serina, a suplementação com 10 mM de L-arg provocou uma redução significativa ($P < 0,01$) no nível do ácido glutâmico, asparagina, glicina e ornitina. No tratamento contendo 5 mM (linhagem B) foi observada uma diminuição significativa ($P < 0,01$) para o ácido glutâmico, asparagina, serina, glicina, e ornitina. Para ambas as linhagens celulares, a suplementação com a L-arg provocou um aumento significativo ($P < 0,01$) nos níveis da treonina e da glutamina.

Tabela 1 – Conteúdo de aminoácidos ($\mu\text{g/g}$ de MF) identificados durante a fase de proliferação de linhagens celulares de *Araucaria angustifolia* submetidas à suplementação com 5 e 10 mM do aminoácido L-arginina. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,01$ ajustado pelo método de Tukey); Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$ ajustado pelo teste T de Student) quando feita a comparação entre os pares (ex: controle da linhagem R x controle da linhagem B). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si.

Aminoácidos ($\mu\text{g/g}$ de MF)	RESPONSIVA				BLOQUEADA			
	controle	5 mM	10 mM	<i>p value</i>	controle	5 mM	10 mM	<i>p value</i>
Ácido aspártico	31978.00a	34955.67a	18218.00b	0.01684	244568	203959	274983	0.512
Ácido glutâmico	213276.00	325159.67	189675.00	0.08	4603925a	1360537b	933509.67b	0.003316
Citrulina	405690.50a	109256.00b	41814.50c	0.0000533	127640	74035.33	145664	0.1739
Asparagina	35928.00	33147.33	22235.50	0.1774	752105a	269915.33b	185283.33b	0.00291
Serina	577244.33a	22922.50b	19161.50b	0.0000158	1024062a	824491.5ab	90565.67a	0.00826
Glutamina	71158.00ab	498860.33b	324375.50b	0.00787	67215a	1176978b	1446307.67b	0.00393
Histidina	519680.00	315391.00	259430.00	0.5149	7920114	4299215	8361837.33	0.1549
Glicina	38490620.00	35344158.33	35484017.50	0.7191	81688828a	56073060.33b	47874798.67b	0.001766
Arginina	238479.67a	20572.00b	37133.00b	0.0004904	312753	182320.5	265965.33	0.1414
Treonina	328529.67Aa	8588609.33Ab	7460786.00Ab	0.004038	840715Aa	32731110.67Bb	55418737.33Bc	0.000168
Alanina	2831106.67ab	4076932.33a	2369286.00b	0.04132	16133825	8378089	5427434.67	0.09
GABA	1039151.67	914694.67	580166.50	0.0839	2827370.5	4836789.67	6853729	0.9136
Tirosina	37487.33ab	39047.33a	22580.50b	0.0238	131635.5	60736.33	45324.67	0.1307
Valina	258579.50ab	262805.33a	143452.75b	0.03674	94372.5	69069	60693.33	0.6377
Fenilalanina	92410.67	110856.67	71778.00	0.3149	286855	152623.67	115518.33	0.2871
Isoleucina	73570.00	108470.50	54273.50	0.2246	284881.5	123103.33	94895	0.1253
Leucina	30949	34571.5	12244	0.0614	176350.5	116176.33	90936.67	0.3502
Ornitina	44124.5a	44690a	16819.5b	0.010914	124958.75a	71750.5b	53710.5b	0.0006

4.7. Perfil da atividade enzimática

A fim de verificar as possíveis vias de incorporação da L-arginina pelas linhagens celulares R e B, foi realizado a quantificação da atividade enzimática para as enzimas arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC) utilizando precursores de putrescina marcados com C¹⁴. Para a ODC, não foi detectada atividade da enzima em ambas linhagens submetidas ou não ao cultivo com a L-arginina (5 e 10 mM) (dados não apresentados). Para a ADC foi possível observar em ambas as linhagens celulares, uma redução significativa ($P < 0,01$) na atividade enzimática dos tratamentos suplementados com a L-argina. Além disso foi possível observar uma atividade aproximadamente seis vezes maior da ADC na linhagem B quando comparada a linhagem R (tratamento controle). Níveis maiores para a atividade da ADC também foram registrados na linhagem B em relação a linhagem R ($P < 0,05$) quando suplementada com a L-arginina.

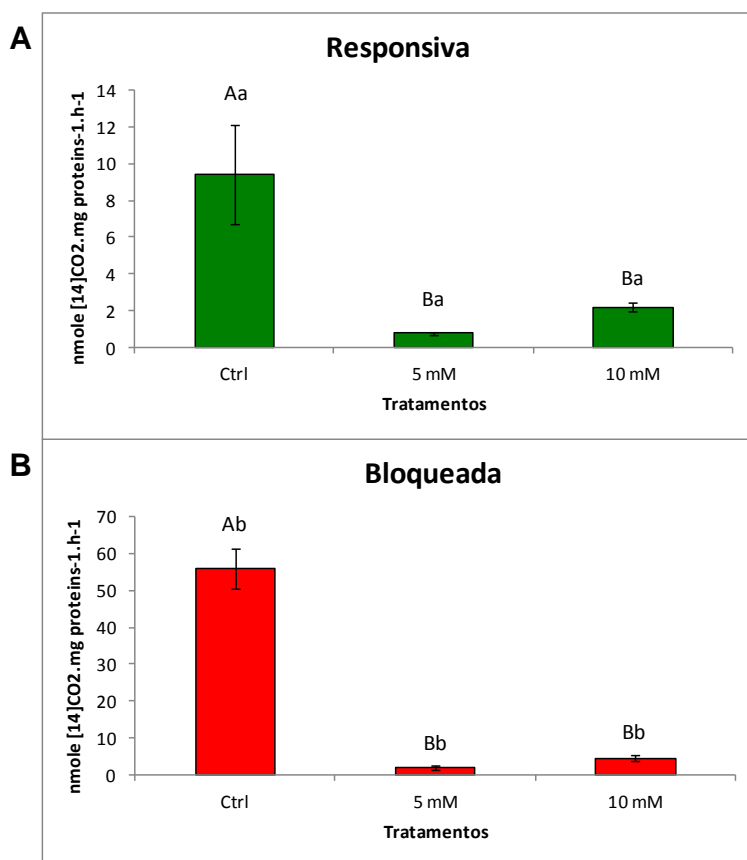


Figura 19 – Atividade enzimática da arginina descarboxilase (ADC), quantificada a partir da incorporação de L-[U-¹⁴C] Arg em extratos de linhagens celulares responsiva (A) e bloqueada (B) de *Araucaria angustifolia* submetidas a proliferação por 14 dias em meio suplementado com L-arginina (5 e 10 mM). Valores oriundos de três

replicatas biológicas. Para cada barra, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com os teste ANOVA one-way ($P \leq 0,01$) e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as linhagens de acordo com o Teste-t de Student ($P \leq 0,05$).

4.8. Maturação das CEs suplementadas com L-arginina durante a fase de proliferação

Após a fase de proliferação em meio de cultura líquido suplementado com a L-arginina (5 e 10 mM), a linhagem R foi transferida para o meio de maturação para avaliação dos efeitos da L-arginina na formação de embriões somáticos (estádios I e II de desenvolvimento). Após 60 dias de cultivo em meio semi-sólido MSG suplementado com 120 μM de ABA e solidificado com 1% Gelrite[®], amostras contendo 50 mg de massa suspensor embrionária e embriões somáticos no estádios I e II de desenvolvimento foram dissociados em água destilada para a contagem do número de embriões. Dentre os tratamentos testados, a inclusão de 5 mM de L-arginina durante a fase de proliferação promoveu um aumento significativo para o número de embriões somáticos nos estádio I e II ($P < 0,01$) quando comparada aos tratamentos controle e com 10 mM de L-arginina. Já os tratamentos controle e suplementado com 10 mM de L-arginina não diferiram estatisticamente entre si ($P < 0,01$).

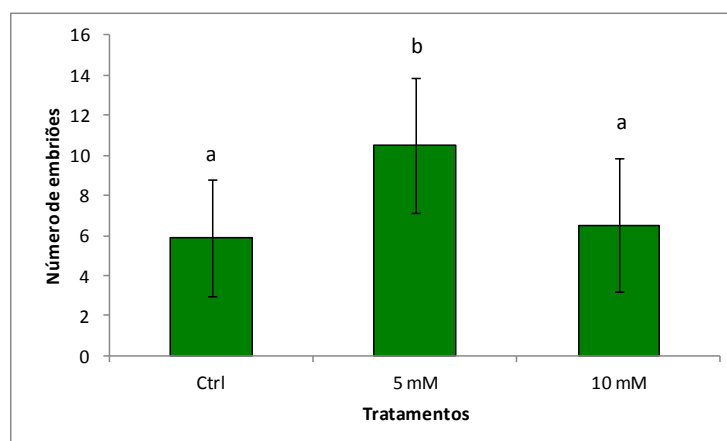


Figura 20 - Número de embriões formados na linhagem responsiva após dois meses de cultivo em condições de maturação. Dados gerados são oriundos de 30 lâminas contendo 100 μL de uma suspensão celular composta de massa suspensor embrionária e embriões somáticos dissociados em água destilada. Barras representam o desvio padrão. As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com os teste ANOVA one-way ($P \leq 0,01$)

Em relação a morfologia (Figura 21), a suplementação com L-arginina promoveu desorganização nas massas pró-embriogênicas, de forma que, após

60 dias de cultivo, o apex embrionário e as células do suspensor nos tratamentos de 5 e 10 mM formaram aglomerados, diferentemente do grupo controle, o qual apresentou ambas estruturas visivelmente distintas.

Ademais, após 14 dias de proliferação, as células do tratamento de 10 mM apresentaram pouca presença da cabeça embrionária frente à situação controle.

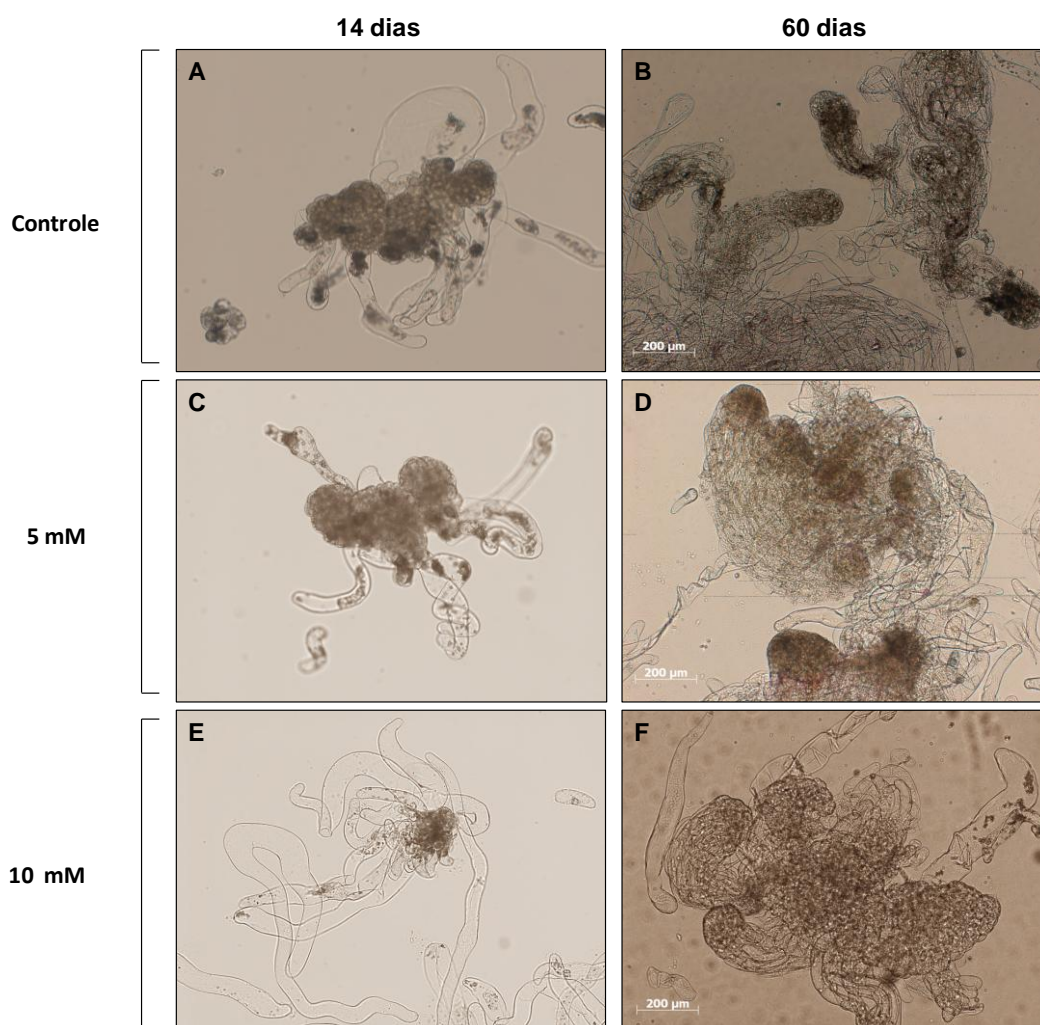


Figura 21- Desenvolvimento de embriões somáticos (estádios I e II) na linhagem celular R após 14 dias de proliferação em meio líquido suplementado com L-arginina (5 e 10 mM) e após 60 dias em meio de maturação suplementado com, 3% (p/v) de sacarose, 3% (p/v) sorbitol, 120 µM de ABA e 1% (p/v) de Gelrite®. Imagens geradas são oriundas de 30 lâminas contendo 100 µL de uma suspensão celular composta de massa suspensor embrionária e embriões somáticos dissociados em água destilada

4.9. Indução de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*

Para a realização dos testes de maturação utilizando o BSO e o GSH foram induzidas novas culturas embriogênicas. Três matrizes (A, B e C) foram selecionadas no Parque Estadual de Campos de Jordão para a coleta de

sementes imaturas. Dentre as matrizes selecionadas, a matriz B apresentou as melhores taxas de indução, seguidas pelas matrizes C e A (Tabela 2).

Matriz	Taxa de indução de culturas embriogênicas
A	5.8 %
B	59 %
C	33 %

Tabela 2: Efeito da matriz na taxa de indução de culturas embriogênicas oriundas de embriões zigóticos imaturos de *Araucaria angustifolia* no ano de 2016.

4.10. Testes de maturação utilizando a suplementação com GSH e BSO

A manipulação do ambiente *redox* submetendo as CEs recém-induzidas à um ambiente reduzido com glutathiona 0.1 mM (GSH) durante 14 dias de cultivo e, posteriormente ao oxidado com butionina sulfoxilamina (BSO) 1 mM durante 60 dias promoveu uma menor produção de embriões em ambas linhagens testadas, em comparação ao grupo controle (Tabela 3).

Em relação à morfologia das estruturas (Figura 21), o tratamento desfavoreceu o estabelecimento de estruturas associadas ao correto desenvolvimento do embrião globular. As culturas apresentaram pouca diferenciação celular, e manutenção da divisão celular, características da fase de proliferação.

Tratamentos	Linhagem 1	Linhagem 2
Controle	27 Ab	32 ± 0.58 Ab
BSO 1 mM	12 ± 2 Bb	22 ± 0.58 Ab

Tabela 3 – Número de embriões formados nas linhagens 1 e 2 após 14 dias de cultivo em meio MSG suplementado com GSH 0,1 mM seguido de subcultivo por 60 dias em meio de maturação suplementado com BSO 1 mM. Dados gerados são oriundos de três replicatas biológicas com contagem de embriões por placa. Dados representados pela média seguidos do desvio padrão. As letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com os teste ANOVA one-way

($P \leq 0,01$) e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as linhagens de acordo com o Teste-t de Student ($P \leq 0,05$)

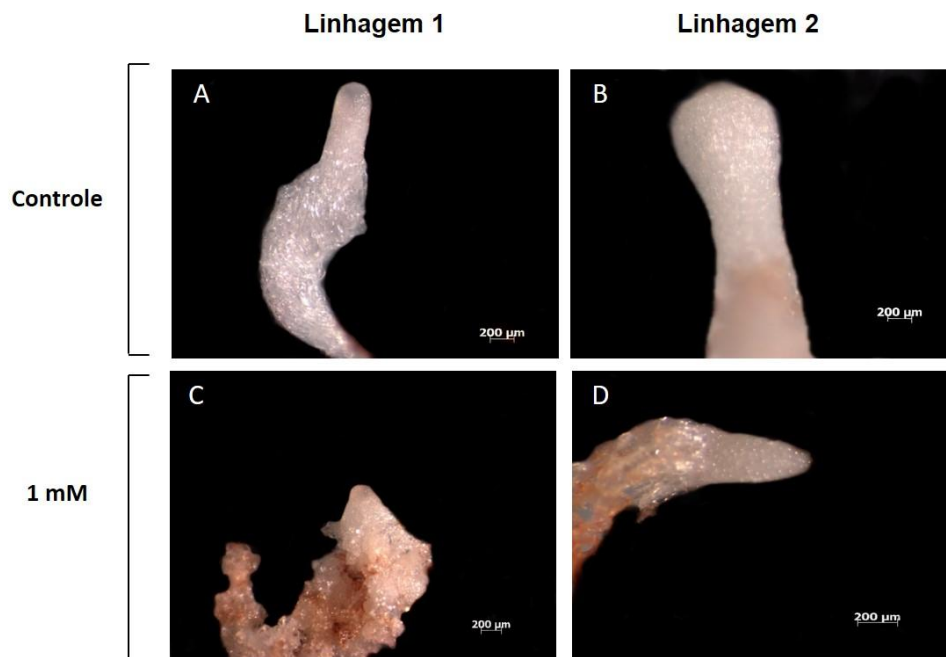


Figura 22 – Culturas embriogênicas durante o desenvolvimento de embrião somático de *A. angustifolia*, após 14 dias sob a influência de GSH 0.1 mM, seguido de dois meses de cultivo com BSO 1 mM (**C, D**) e na ausência de BSO (**A, B**), nas condições de maturação em meio MSG suplementado com 1.46 g⁻¹ de L-glutamina, 3% (p/v) de sacarose, 0,3% (p/v) de carvão ativado, 120 µM de ABA e 1% (p/v) de Gelrite®.

5. DISCUSSÃO

5.1. Influência da L-arginina na embriogênese somática

No presente trabalho, culturas celulares de *Araucaria angustifolia* com diferentes potenciais embriogênicos foram avaliadas frente à resposta bioquímicas geradas sob a influência do aminoácido L-arginina e agentes redutores/oxidativos a fim de melhor compreender o comportamento celular durante o processo de desenvolvimento embrionário.

A percepção do ambiente celular e intracelular *redox* é baseada na ativação específica de uma rede sinalizadora que pode gerar respostas a curto e longo prazo. Dentre os processos celulares dependentes dessa sinalização estão morte celular programada (MCP), defesa contra patógenos, fotossíntese e respostas a estresses (Buchanan, 1980; Grant et al., 2000; Schützendübel and Polle, 2002; Mahalingam and Fedoroff, 2003). Evidências recentes apontam que, durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*, os estímulos químicos e físicos utilizados na indução e desenvolvimento dos embriões somáticos podem provocar a emissão de uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (Pullman and Bucalo, 2014; Zhou et al., 2016), compostos atuante em diversas vias bioquímicas, como a de poliaminas (Santa-Catarina et al., 2007; Jo et al., 2014).

As etapas do processo de embriogênese somática são inter-relacionadas, sendo cada passo dependente do anterior, tendo isso em vista, a diferenciação das MPEs em embriões somáticos iniciais é um ponto crucial para o correto desenvolvimento embrionário (Högberg et al., 2003). No presente trabalho, durante a etapa de proliferação, todas as CEs de *A. angustifolia* suplementadas com L-arginina apresentaram menor crescimento em comparação a situação controle (Figura 11), sugerindo a utilização do aminoácido como agente pré-maturação, como o reportado em *Heliantus annuus*, onde o aminoácido amenizou danos oxidativos causados por estresse hídrico (Nejadalimoradi et al., 2014). A aplicação da L-arginina como agente de pré-maturação se respalda na manutenção da viabilidade celular observada para todos os tratamentos tendo em vista que o catabolismo do aminoácido

produz ON, o qual, em conjunto com a arginina, está envolvido no mecanismo de MCP (Clarke et al., 2000; Reape and McCabe, 2010).

Dentre as funções bioquímicas da L-arg (Winter et al., 2015; Chernobrovkina et al., 2016; Greenwell et al., 2018; Llebrés et al., 2018) esta a sua participação na via oxidativa de biossíntese de ON (Procházková et al., 2014). No contexto da embriogênese somática de *A. angustifolia*, o ON pode influenciar em uma melhor organização dos estádios iniciais dos embriões somáticos, estando envolvido na manutenção da polaridade celular durante o desenvolvimento da MPEs, como reportado por Silveira (et al., 2006). No entanto, o comportamento observado nas CEs submetidas ao pré-tratamento com L-arginina e após 60 dias de cultivo nas condições de maturação (Figura 21) sugere que a presença do aminoácido nas concentrações testadas provocou uma perturbação na morfologia das células (von Arnold et al., 2002).

5.2. Óxido nítrico

A importância fisiológica do óxido nítrico é reconhecida em todos os seres vivos. Em animais, foi identificada a enzima responsável pela conversão da L-arginina em citrulina e ON, denominada óxido-nítrico sintase (NOS) (Knowles and Moncada, 1994). Em plantas, a geração enzimática de ON não é canônica (Figura 7), no entanto, na alga *Ostreococcus tauri* foi identificada uma enzima putativa da NOS animal (Santolini et al., 2017) com até 42% de similaridade.

No presente trabalho, a suplementação com o aminoácido L-arginina nas linhagens celulares analisadas promoveu um incremento na emissão de ON endógeno na linhagem bloqueada. Já para a linhagem responsiva foi observada uma diminuição da emissão endógena do ON na presença da L-arg (Figura 12B).

Tendo em vista que o óxido nítrico pode atuar como neutralizador das ERO (Beligni and Lamattina, 1999), o acúmulo da molécula na linhagem bloqueada, aliado à baixa presença de ERO nas culturas analisadas anteriormente, aqui podemos sugerir que o óxido nítrico neutralizou as espécies reativas de oxigênio.

Os resultados sugerem que o incremento na biossíntese de óxido nítrico (Figura 12A) e a redução do conteúdo de ON endógeno (Figura 12B) no 12º dia de cultivo das CEs é necessário para a diferenciação das MPE em embriões globulares iniciais, como observado no 60º dia de cultivo (Figura 21). Possivelmente, o aumento do conteúdo endógeno de ON em MPE mantida em condição de proliferação (linhagem B) é necessário para a multiplicação das MPE, enquanto que a redução no conteúdo endógeno de ON (linhagem R) é acompanhada da evolução e diferenciação das MPEs para embriões globulares iniciais. Tal hipótese corrobora com os resultados observados anteriormente em *A. angustifolia* (Silveira et al., 2006; Osti et al., 2010). A redução nos níveis de ON em suspensões celulares suplementadas com espermidina e espermina foram associadas à diferenciação celular (Silveira et al., 2006). Além disso, Osti (et al., 2010) relatou que a adição de doadores de ON em CEs de *A. angustifolia* promoveu a proliferação celular isenta de alterações morfológicas. Vieira (et al., 2012) associou a diminuição de óxido nítrico em CEs suplementadas com glutathione,

e a geração de embriões em MPEs de *A. angustifolia* suplementadas com glutathione. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a ação do óxido nítrico durante o processo de divisão celular e maturação em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

5.3. Óxido nítrico e poliaminas (PAs): evidências de interação durante o desenvolvimento vegetal

Putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) são as principais poliaminas encontradas em plantas (Silveira et al., 2006), e os níveis endógenos desses compostos são afetados por sua biossíntese, compartimentalização e mecanismos de conjugação (Sagor et al., 2016; Alcázar and Tiburcio, 2018). Dentre suas funções no metabolismo vegetal pode-se citar a participação nos mecanismos de resposta adaptativa aos tipos de estresses e divisão celular (Silveira et al., 2006)

PAs são bioquimicamente relacionadas ao ON via a arginina. A arginina é um precursor comum nas vias de biossíntese de PAs e ON, sugerindo que alterações na homeostase de ON possa influenciar a disponibilidade de PAs e

vice-versa (Santa-Catarina et al., 2007; Filippou et al., 2013; Tanou et al., 2014). Além disso, existem relatos sobre a produção de ON utilizando como substrato as PAs através de um mecanismo ainda não caracterizado (Silveira et al., 2006; Tun et al., 2006). A sobreposição de funções entre o ON e PAs fornecem ainda mais evidências, sobre uma possível ação coordenada de ambas as substâncias durante o desenvolvimento vegetal, como observado neste trabalho, onde o aumento da emissão de ON (Figura 12A) foi acompanhado pelo acúmulo de Put na linhagem B (Figura 14B), enquanto que para a linhagem R ambos valores permaneceram estáveis (Figura 14A). De acordo com Fortes et al. (2011) a biossíntese de PAs é regulada de uma forma bastante complexa com possível participação de processos relacionados a regulação pós-traducional. Em vegetais tem sido sugerido que a atividade da ADC possa ser controlada em situações de estresse ambiental por mecanismo de modificação pós-traducional (Vuosku et al., 2006; Fortes et al., 2011).

Os resultados relatados no presente trabalho acerca dos valores observados para as PAs vão de encontro com associações sobre a relação entre os níveis de Put e a capacidade embriogênica das culturas (Jo et al., 2014; de Oliveira et al., 2018), tendo em vista que os menores níveis de putrescina (Figura 14B) indicam alta competência embriogênica da cultura de *A. angustifolia*, diferentemente de outras espécies vegetais nas quais altos valores de PAs foram associados com a capacidade embriogênica (Altamura et al., 1991; Shoeb et al., 2001; Li and Burritt, 2003).

Segundo Stasolla e Yeung (2003), a poliamina Spd está envolvida em processos morfológicos tardios da formação do embrião, atuando em vias de diferenciação e evolução morfogenética. Em *Picea abies* foi observado que em estágios iniciais do desenvolvimento, os níveis de Put e Spd são equivalentes, no entanto, após quatro semanas na condição de maturação, os níveis de Spd eram significativamente maiores (Vondráková et al., 2015). Ademais, em *Panax ginseng* o conteúdo endógeno de Spd observado em calos com alto potencial embriogênico foi maior do que para aqueles não embriogênicos, nos quais observou-se um acúmulo de Put (Monteiro et al., 2002). Tais resultados corroboram com os observados no presente trabalho, haja vista que os valores de Spd detectados para a linhagem R (Figura 16A) foram maiores do que

aqueles observados na linhagem B (Figura 16B), de modo diferente em relação à Put, onde na linhagem bloqueada observou-se um acúmulo do composto (Figura 14A).

A poliamina livre Spm foi detectada em menor quantidade para ambas linhagens analisadas (Figura 15). Apesar da pouca elucidação, a função biológica da Spm relatada é o seu envolvimento na determinação do crescimento vegetal, como reportado em *Arabidopsis thaliana* (Sagor et al., 2016). Em *A. angustifolia*, a presença de Spm foi identificada no desenvolvimento tardio sendo associada ao desenvolvimento dos cotilédones (Astarita et al., 2003c), comportamento similar ao observado em embriões zigóticos de *Pinus radiata* (Minocha et al., 1999). Os resultados aqui apresentados acerca do conteúdo endógeno de Spm corrobora os descritos acima, visto que o período analisado corresponde a fase inicial do cultivo, no entanto, na linhagem B (Figura 15B) a suplementação com L-arginina promoveu aumento na síntese de Spd; associações entre a presença do aminoácido e a PA foram feitas após a regeneração de meristemas apicais em *Pinus radiata* (Prehn et al., 2003) na presença de L-arginina, sugerindo que no caso das CEs de *A. angustifolia* a linhagem B pode adquirir resistência às condições tardias de maturação.

Dentre os perfis bioquímicos utilizados para a predisposição das culturas frente a capacidade embriogênica, está a razão Put/Spd, tal relação vem sendo sugerida devido ao fato de que o menor valor para a razão está associado à alta capacidade embriogênica de CE de diversas espécies além de *A. angustifolia*, como *P. Radiata* e *Pinus taeda* (Shoeb et al., 2001; Silveira et al., 2006; Jo et al., 2014; de Oliveira et al., 2018). Neste trabalho, a linhagem R apresentou menores valores da razão Put/Spd em todos os tratamentos quando comparada à linhagem B. Além disso, o valor da razão aumentou de acordo com o aumento das concentrações de L-arginina (Figura 17), indicando que a presença do aminoácido promoveu perda da capacidade embriogênica, fato que pode ser observado na situação de maturação (Figura 20), onde apenas o tratamento de 5 mM de L-arginina apresentou um maior número na produção de embriões somáticos.

O comportamento da linhagem bloqueada sobre o incremento da

emissão de ON no 12º dia e o acúmulo da poliamina putrescina (Put) ao final do cultivo (Figura 14) corrobora com De Oliveira (et al., 2017) onde a suplementação com 5 mM L-Arg aumentou o conteúdo endógeno da poliamina, sugerindo que a produção de Put se deu via conversão da L-arginina em citrulina (Figura 5).

A respeito da incorporação da L-arginina endógena e suplementada à via de biossíntese das PAs, através da quantificação da atividade enzimática para as enzimas arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC), observou-se que a via preferencial para a biossíntese de PAs é a da ADC, corroborando com os resultados obtidos por de Oliveira et al. (2018). O comportamento enzimático aqui observado em ambas linhagens sugere que a presença da L-arginina em todas as concentrações promoveu diminuição na atividade da enzima por excesso de substrato, como relatado em *Hordeum vulgare* e *Avena sativa* (Bitonti et al., 1987). Buscando a completa elucidação acerca do mecanismo de síntese de PAs em *A. angustifolia*, técnicas como a manipulação genética, aplicação exógena de PAs ou aminoácidos, bem como a complementação com inibidores das enzimas podem auxiliar na elucidação da inter-relação envolvendo Arg x PAs x ADC em um nível bioquímico e molecular abordando aspectos de modificações pós-traducionais (Minocha et al., 1999; Bhatnagar et al., 2001).

Como sugerido por Jo et al. (2014), a incapacidade da linhagem bloqueada de conversão das MPE em embriões somáticos durante a etapa de maturação se dá devido à ausência de condições fisiológicas que promovam a diferenciação das estruturas embriogênicas de tais linhagens frente às condições de maturação. O maior valor da razão Put/Spd para a linhagem B indica que a cultura embriogênica está menos apta ao desenvolvimento quando comparado com a linhagem responsiva, tendo que vista que menores níveis de Put e maiores níveis de Spd estão associados aos estados tardios do desenvolvimento (Klimaszewska et al., 2016), como relatado por Santa-Catarina (et al., 2007), onde a aplicação de Spd promoveu total desenvolvimento embriogênico; e confirmada por Vieira (et al., 2012) em CEs de *A. angustifolia* suplementadas com Spd que apresentaram taxa de conversão de MPE II para MPE III maior do que o grupo controle, além da

inibição da síntese de ON, reinterando a participação dessa molécula nos processos iniciais de desenvolvimento do embrião.

5.4. Interação entre a suplementação da L-arginina e o perfil de aminoácidos

A função estrutural dos aminoácidos como constituintes de proteínas é extensamente elucidada, haja vista que proteínas possuem importantes funções em plantas estando envolvidas em diversos processos celulares (Kuo et al., 2003), como por exemplo, as enzimas, as quais fazem parte de um grupo de proteínas responsáveis por catalisar vários processos biológicos vitais para o metabolismo vegetal (Häusler et al., 2014). O metabolismo de aminoácidos (AAs) faz parte de uma intrincada via bioquímica envolvendo PAs (de Oliveira et al., 2018), etileno (Navarro et al., 2017) e óxido nítrico (Tun et al., 2006), tendo como papel central o metabolismo de nitrogênio dentro de um sistema biológico (Frunghillo et al., 2014).

A suplementação das CEs com L-arginina promoveu alterações no perfil dos aminoácidos em ambas linhagens, mais especificamente naqueles que participam como substrato na biossíntese de arginina e ornitina, como glutamato (Figura 18C) e glutamina (Figura 18B). A linhagem B apresentou maior acúmulo de AAs em relação à linhagem R, com exceção da citrulina, a qual foi observado um maior nível no grupo controle da linhagem R (Figura 18D).

No presente trabalho, a análise nas duas linhagens celulares (B e R) apresentou grande variação no perfil e na quantidade de aminoácidos detectados em cada linhagem, reiterando a hipótese de que os aminoácidos presentes nas linhagens de *A. angustifolia* com diferentes potenciais embriogênicos possuem funções distintas e específicas (Hackbarth et al., 2018).

A glutamina e o glutamato são considerados os principais precursores dos demais AAs (Coruzzi and Brears, 2000), tendo isso em vista, seu acúmulo pode estar associado à sua utilização como fonte de nitrogênio para outros AAs durante o desenvolvimento embrionário, assim como sugerido por Hackbarth

(et al. 2018) ao analisar o perfil de aminoácidos em diferentes tecidos de *A. angustifolia*.

Tendo o aspartato como precursor (Lam et al., 1995), a asparagina (Figura 18A) normalmente é associada com o transporte de nitrogênio e seus conteúdos podem ser regulados pela luz, além de contribuir para a manutenção da pressão osmótica, devido ao seu acúmulo em condições de estresse (Gaufichon et al., 2010).

A ornitina (Figura 18I) é sintetizada a partir da via do glutamato e é um aminoácido que não é incorporado às proteínas. Esse aminoácido é um metabólito intermediário na via de biossíntese da arginina, de onde são derivados outros compostos tais como prolina, citrulina e PAs (Meijer et al., 1990).

Em relação a arginina (Figura 18E) na linhagem B, observou-se acúmulo para todos os tratamentos, de maneira diferente, a linhagem R apresentou queda no conteúdo do AA nos grupos suplementados, enquanto que o grupo controle apresentou acúmulo. Tais observações sugerem que o metabolismo de arginina neste cenário de embriogênese somática está desbalanceado, ocorrendo simultaneamente a biossíntese e degradação do aminoácido. Variações no conteúdo de AAs fazem parte do comportamento vegetal frente a sazonalidade, tais conteúdos podem variar em diferentes órgãos de um mesmo organismo de acordo com a necessidade, como o uso de arginina como fonte de nitrogênio após cessar o alongamento do caule em *Picea glauca* (Durzan, 1968) e o conteúdo de AAs em *A. angustifolia* durante diferentes estágios do desenvolvimento embrionário e estações climáticas (Astarita et al., 2003c). A inter-conversão cíclica envolvendo arginina, glutamina e asparagina é parte central do metabolismo do nitrogênio em coníferas, sendo essencial para o ciclo de vida dessas espécies (Cánovas et al., 2007).

Os aminoácidos detectados em maior quantidade foram a treonina (Figura 18G) e a glicina (Figura 18H), no entanto, apenas o primeiro não apresentou diferenças significativas entre os grupos controle da linhagem B e R; o processo de embriogênese somática foi anteriormente associado com incremento nos níveis de treonina (Murch et al., 1999), sendo associado à manutenção do potencial osmótico nos tecidos (Thorpe, 1993).

As informações obtidas através da quantificação de aminoácidos nos permite inferir o papel da manutenção dos níveis de arginina frente aos demais aminoácidos, tendo em vista que o correto balanço bioquímico entre tais compostos é essencial para o desenvolvimento embrionário (Santa-Catarina et al., 2006). Ademais, os conhecimentos bioquímicos oriundos dessa análise permitem a aplicabilidade de concentrações ótimas de aminoácidos como suplementação a fim de aperfeiçoar os protocolos de embriogênese somática para coníferas.

5.5. Influência na manipulação do ambiente *redox* na maturação

Buscando a otimização da qualidade de embriões gerados pela técnica de embriogênese somática, as CEs foram submetidas a análises envolvendo a aplicação de glutathione durante o processo embriogênico. Mudanças no perfil de GSH em relação ao seu estado redox representam uma etapa importante na sinalização para o desenvolvimento do embrião (Stasolla, 2010). Frente a isso, duas CEs foram submetidas à um pré-tratamento na presença de arginina durante a fase de proliferação e à presença de GSH e BSO, respectivamente, na fase de maturação.

Para ambas as linhagens submetidas à influência de agente oxidantes e redutores, a formação de embriões foi baixa (Tabela 3). Tendo em vista que o grupo controle apresentou maior número de embriões, conclui-se que a presença dos compostos prejudicou o desenvolvimento embrionário, corroborando com os resultados obtidos em *P. Abies* (Belmonte et al., 2005) onde a aplicação de 1.0 mM de GSH inibiu a formação embrionária. Morfologicamente, os embriões apresentaram aparência disforme (Figura 22).

Para as linhagens submetidas à L-arginina (5 e 10 mM), transferidas para a maturação com GSH e posteriormente com BSO, observou-se a manutenção da proliferação celular e o baixo desenvolvimento de embriões, os quais apresentaram morfologia anormal, seguido de necrose. Resultados diferentes foram obtidos por Stasolla et al., (2008), onde a aplicação de 0.1 mM de BSO em culturas de *Brassica napus* aumentaram a expressão de genes associados ao desenvolvimento embrionário. Tais observações sugerem que a

aplicação de BSO 1 mM nas CEs de *A. angustifolia* promoveu efeito tóxico para a diferenciação das MPEs em embriões somáticos

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A aplicação de agentes redutores/oxidativos busca minimizar os problemas derivados da recalcitrância da *Araucaria angustifolia*, i.e. sensíveis a dessecação. Visto que a *A. angustifolia* é uma espécie nativa ameaçada de extinção e a maioria dos relatos abordando o processo de embriogênese somática utilizam espécies ortodoxas (resistentes à dessecação), o aperfeiçoamento dos métodos de cultivo *in vitro* são fundamentais no que diz respeito às aplicabilidades biotecnológicas da técnica, sendo possível seu uso na propagação massal de genótipos de elite.

A análise dos perfis bioquímicos voltados para a biossíntese de óxido nítrico, poliaminas e aminoácidos permite observar o metabolismo celular através de um ângulo diferente acerca das diferenças presentes em cada linhagem, e como alterações metabólicas interferem no comportamento celular durante o processo de embriogênese somática desde a etapa de indução, passando pela etapa de proliferação e culminando na maturação dos embriões.

Dentre as linhagens analisadas, apesar da geração de embriões, a presença da L-arginina permitiu a manutenção da multiplicação celular nas concentrações utilizadas. No que tange as observações aqui relatadas, a concentração ótima para a suplementação com o aminoácido se encontra entre 0 e 5 mM. Os perfis bioquímicos indicam que o aminoácido teve influência nas rotas metabólicas dos principais compostos analisados, ilustrando a participação da L-arginina durante o processo de embriogênese.

A associação entre óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio poderá ser confirmada pela quantificação de peroxinitrito, produto da reação entre óxido nítrico e o ânion O_2^- , abrindo mais possibilidades para métodos de seleção das linhagens capazes de gerar embriões.

O aprimoramento do processo de embriogênese somática em coníferas geralmente é baseado em conhecimentos empíricos, no entanto, se faz necessário agregar informações sobre as bases fisiológicas e bioquímicas do desenvolvimento embrionário zigótico visando a otimização do cultivo *in vitro* (Elbl et al., 2015; Navarro et al., 2017; de Oliveira et al., 2018).

Correlacionando as informações a respeito de Arg | ON | PAs | AAs | ADC no cultivo celular, sugere-se que a manutenção da capacidade de proliferação

das culturas deve-se ao acúmulo de Put nas linhagens, conferindo resistência à dessecação e às condições impostas durante a maturação.

Futuros estudos abordando à nível molecular as respostas ao stress oxidativo devem ser realizado a fim de complementar os dados aqui apresentados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcázar R, Tiburcio AF** (2018) Determination of Arginine and Ornithine Decarboxylase Activities in Plants. *In* R Alcázar, AF Tiburcio, eds, Polyamines: Methods and Protocols. Springer New York, New York, NY, pp 117–122
- Altamura MM, Torrigiani P, Capitani F, Scaramagli S, Bagni N** (1991) De Novo Root Formation in Tobacco Thin Layers is Affected by Inhibition of Polyamine Biosynthesis. *J Exp Bot* **42**: 1575–1582
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L** (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **69**: 233–249
- Astarita LV, Floh EI, Handro W** (2003a) Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidase associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). *Plant growth regulation* **39**: 113–118
- Astarita LV, Floh EIS, Handro W** (2003b) Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum* **47**: 53–59
- Astarita LV, Guerra MP** (1998) Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*—induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. *Braz J Plant Physiol* **10**: 113–118
- Astarita LV, Handro W, Floh EIS** (2003c) http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-84042003000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=es. *Brazilian Journal of Botany* **26**: 163–168
- Astier J, Besson-Bard A, Wawer I, Parent C, Rasul S, Jeandroz S, Dat J, Wendehenne D** (2018) Nitric Oxide Signalling in Plants: Cross-Talk with Ca²⁺, Protein Kinases and Reactive Oxygen Species. *Annual Plant Reviews online* 147–170
- Auler NMF, Reis MS dos, Guerra MP, Nodari RO** (2002) The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **25**: 329–338
- Bailly C** (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**: 93–107
- Balbuena TS, Silveira V, Junqueira M, Dias LL, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh EI** (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *Journal of proteomics* **72**: 337–352

- Baron K, Stasolla C** (2008) The role of polyamines during in vivo and in vitro development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **44**: 384–395
- Baudouin E** (2011) The language of nitric oxide signalling. *Plant Biology* **13**: 233–242
- Becwar MR, Noland TL, Wyckoff JL** (1989) Maturation, germination, and conversion of norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **25**: 575–580
- Becwar MR, Pullman GS** (1995) Somatic Embryogenesis in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). *In* SM Jain, PK Gupta, RJ Newton, eds, *Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Volume 3 — Gymnosperms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 287–301
- Beligni MV, Lamattina L** (1999) Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* **208**: 337–344
- Belmonte MF, Macey J, Yeung EC, Stasolla C** (2005) The effect of osmoticum on ascorbate and glutathione metabolism during white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 337–346
- Ben Sutton** (2002) Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. *Ann For Sci* **59**: 657–661
- Bewley JD, Black M** (1994) Seeds. *In* JD Bewley, M Black, eds, *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Springer US, Boston, MA, pp 1–33
- Bhatnagar P, Glasheen BM, Bains SK, Long SL, Minocha R, Walter C, Minocha SC** (2001) Transgenic Manipulation of the Metabolism of Polyamines in Poplar Cells. *Plant Physiology* **125**: 2139–2153
- Bitonti AJ, Casara PJ, McCann PP, Bey P** (1987) Catalytic irreversible inhibition of bacterial and plant arginine decarboxylase activities by novel substrate and product analogues. *Biochem J* **242**: 69–74
- Bonga J** (2016) Conifer clonal propagation in tree improvement programs. pp 3–31
- Bozhkov PV, Filonova LH, von Arnold S** (2002) 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. *Biotechnology and Bioengineering* **77**: 658–667
- Cánovas FM, Avila C, Canton FR, Canas RA, de la Torre F** (2007) Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2307–2318

- Chernobrovkina NP, Robonen EV, Unzhakov AR, Tyutyunnik NN** (2016) Arginine in the life of coniferous plants. *Contemp Probl Ecol* **9**: 600–607
- Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ** (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant Journal*, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-313x.2000.00911.x>
- Correia S, Cunha AE, Salgueiro L, Canhoto JM** (2012) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **109**: 143–152
- Coruzzi GM, Brears T** (2000) Transgenic plants that exhibit enhanced nitrogen assimilation.
- Domingos IF, Falcão DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF, Santos MN, Albuquerque DM, Fertrin KY, Costa FF, Azevedo RC, Machado CG, et al** (2014) Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Annals of Hematology* **93**: 1123–1129
- Dos Santos ALW, El Gueddari NE, Trombotta S, Moerschbacher BM** (2008) Partially acetylated chitosan oligo- and polymers induce an oxidative burst in suspension cultured cells of the gymnosperm *Araucaria angustifolia*. *Biomacromolecules* **9**: 3411–3415
- Dos Santos ALW, Wiethölter N, El Gueddari NE, Moerschbacher BM** (2006) Protein expression during seed development in *Araucaria angustifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. *Physiologia Plantarum* **127**: 138–148
- Douëtts-Peres JC, Aragão VPM, Cruz MAL, Reis RS, Elbl P, dos Santos ALW, Floh EIS, Silveira V, Santa-Catarina C** (2019) AaMps1 protein inhibition regulates the protein profile, nitric oxide, carbohydrate and polyamine contents in embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 1–14
- Durzan DJ** (1996) Asexual reproductive adaptation to simulated cretaceous climatic variables by Norway spruce cells in vitro. *Chemosphere* **33**: 1655–1673
- Durzan DJ** (2008) Monozygotic cleavage polyembryogenesis and conifer tree improvement. *Cytology and Genetics* **42**: 159
- Durzan DJ** (1968) Nitrogen metabolism of *Picea glauca*. III. Diurnal changes of amino acids, amides, protein, and chlorophyll in leaves of expanding buds. *Can J Bot* **46**: 929–937
- Durzan DJ, Gupta PK** (1988) Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in conifers. *Advances in biotechnological processes (USA)*

- Durzan DJ, Pedroso MC** (2002) Nitric oxide and reactive nitrogen oxide species in plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **19**: 293–338
- Dutra NT, Silveira V, de Azevedo IG, Gomes-Neto LR, Façanha AR, Steiner N, Guerra MP, Floh EIS, Santa-Catarina C** (2013) Polyamines affect the cellular growth and structure of pro-embryogenic masses in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures through the modulation of proton pump activities and endogenous levels of polyamines. *Physiologia plantarum* **148**: 121–132
- Elbl P, Lira BS, Andrade SCS, Jo L, dos Santos ALW, Coutinho LL, Floh EIS, Rossi M** (2015) Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **120**: 903–915
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D** (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **74**: 201–228
- Filippou P, Antoniou C, Fotopoulos V** (2013) The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Radical Biology and Medicine* **56**: 172–183
- Floh EIS** (2015) EMBRIOGÊNESE VEGETAL: ABORDAGENS BÁSICAS E BIOTECNOLÓGICAS. EMBRIOGÊNESE VEGETAL: ABORDAGENS BÁSICAS E BIOTECNOLÓGICAS 25
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Caló G, Salerno G, Lamattina L** (2010) Characterization of a Nitric Oxide Synthase from the Plant Kingdom: NO Generation from the Green Alga *Ostreococcus tauri* Is Light Irradiance and Growth Phase Dependent. *The Plant Cell* **22**: 3816–3830
- Fortes AM, Costa J, Santos F, Seguí-Simarro JM, Palme K, Altabella T, Tiburcio AF, Pais MS** (2011) Arginine Decarboxylase expression, polyamines biosynthesis and reactive oxygen species during organogenic nodule formation in hop. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 258–269
- Frungillo L, Skelly MJ, Loake GJ, Spoel SH, Salgado I** (2014) S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications* **5**: 5401
- Galston AW, Sawhney RK** (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology* **94**: 406–410
- Gao C, Hu J, Zhang S, Zheng Y, Knapp A** (2008) Association of polyamines in governing the chilling sensitivity of maize genotypes. *Plant Growth Regulation* **57**: 31

- Garcia-Mendiguren O, Montalbán IA, Stewart D, Moncaleán P, Klimaszewska K, Rutledge RG** (2015) Gene Expression Profiling of Shoot-Derived Calli from Adult Radiata Pine and Zygotic Embryo-Derived Embryonal Masses. *PLOS ONE* **10**: e0128679
- Gaufichon L, Reisdorf-Cren M, Rothstein SJ, Chardon F, Suzuki A** (2010) Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science* **179**: 141–153
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J** (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* **23**: 441–450
- Greenwell ZL, Ruter JM, Greenwell ZL, Ruter JM** (2018) Effect of glutamine and arginine on growth of *Hibiscus moscheutos* “in vitro.” *Ornamental Horticulture* **24**: 393–399
- Groppa MD, Rosales EP, Iannone MF, Benavides MP** (2008) Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* **69**: 2609–2615
- Guan Y, Li S-G, Fan X-F, Su Z-H** (2016) Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2016.00938
- Guerra MP, Dal Vesco LL, Ducroquet JPHJ, Nodari RO, Reis MSD** (2001) Embriogênese somática em goiabeira serrana: efeito do genótipo, choque auxínico e sementes sintéticas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **13**: 117–128
- Guerra MP, Dal Vesco LL, Pescador R, Schuelter AR, Nodari RO** (1999) Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **34**: 1557–1563
- Guerra MP, Kemper E** (1992) Tecnologias futuras: aplicação da poliembriogênese somática para a propagação massal de plantas elite de *Araucaria angustifolia* (Bert) O Ktze. *Anais do Congresso Nacional Sobre Essências Florestais*. pp 1233–1236
- Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ, eds** (2016) Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses. doi: 10.1007/978-3-319-44081-1
- Gupta KJ, Igamberdiev AU, Manjunatha G, Segu S, Moran JF, Neelawarne B, Bauwe H, Kaiser WM** (2011) The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. *Plant Science* **181**: 520–526
- Gupta PK, Durzan DJ** (1987) Biotechnology of Somatic Polyembryogenesis and Plantlet Regeneration in Loblolly Pine. *Bio/Technology* **5**: 147–151

- Gupta PK, Pullman GS** (1991) Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation.
- Haccius B** (1978) Question of unicellular origin or non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology*
- Hackbarth C, Soffiatti P, Zanette F, Floh EIS, Macedo AF, Laureano HA** (2018) Free amino acid content in trunk, branches and branchlets of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Journal of Forestry Research* **29**: 1489–1496
- Haines RJ, Prakash N** (1980) Proembryo Development and Suspensor Elongation in *Araucaria* Juss. *Aust J Bot* **28**: 511–522
- Hakman I, Arnold SV** (1985) Plantlet Regeneration through Somatic Embryogenesis in *Picea abies* (Norway Spruce). *Journal of Plant Physiology* **121**: 149–158
- Hakman I, Oliviusson P** (2002) High expression of putative aquaporin genes in celles with transporting and nutritive function during seed development in Norway spruce (*Picea abies*). doi: 10.1093/jexbot/53.369.639
- Handro W** (1986) Forest and nut trees. 3. *Araucaria* (*Araucaria* spp.). *Biotechnology in agriculture and forestry*
- Hardeland R, Coto-Montes A, Burkhardt S, Zsizsik BK** (2000) Circadian Rhythms and Oxidative Stress in Non-vertebrate Organisms. *In* TV Driessche, J-L Guisset, GM Petiau-de Vries, eds, *The Redox State and Circadian Rhythms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 121–140
- Hauser F, Waadt R, Schroeder JI** (2011) Evolution of Abscisic Acid Synthesis and Signaling Mechanisms. *Current Biology* **21**: R346–R355
- Hausladen A, Alscher RG, Alscher RG** (2017) Glutathione. Antioxidants in Higher Plants. doi: 10.1201/9781315149899-1
- Häusler RE, Ludewig F, Krueger S** (2014) Amino acids – A life between metabolism and signaling. *Plant Science* **229**: 225–237
- Haworth M, Fitzgerald A, McElwain JC** (2011) Cycads show no stomatal-density and index response to elevated carbon dioxide and subambient oxygen. *Aust J Bot* **59**: 630–639
- Högberg K-A, Bozhkov P, von Arnold S** (2003) Early selection improves clonal performance and reduces intracolonial variation of Norway spruce plants propagated by somatic embryogenesis. *Tree physiology* **23**: 211–6
- Imai A, Matsuyama T, Hanzawa Y, Akiyama T, Tamaoki M, Saji H, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, et al** (2004) Spermidine Synthase

Genes Are Essential for Survival of Arabidopsis. *Plant Physiology* **135**: 1565–1573

Iqbal Z, Sattar MN, Shafiq M (2016) CRISPR/Cas9: a tool to circumscribe cotton leaf curl disease. *Frontiers in plant science* **7**: 475

Jo L, Dos Santos AL, Bueno CA, Barbosa HR, Floh EI (2013) Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. *Tree physiology* **34**: 94–104

Jo L, Dos Santos ALW, Bueno CA, Barbosa HR, Floh EIS (2014) Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. *Tree Physiology* **34**: 94–104

Jurzitza (1987) *Anatomie der Samenpflanzen*.

Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter M-A, Trontin J-F (2016) Advances in Conifer Somatic Embryogenesis Since Year 2000. In *Vitro Embryogenesis in Higher Plants*. Humana Press, New York, NY, pp 131–166

Klimaszewska K, Overton C, Stewart D, Rutledge RG (2011) Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta* **233**: 635–647

Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298**: 249–258

Kong L, Attree SM, Evans DE, Binarova P, Yeung EC, Fowke LC (1999) Somatic Embryogenesis in White Spruce: Studies of Embryo Development and Cell Biology. In SM Jain, PK Gupta, RJ Newton, eds, *Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Volume 4*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 1–28

Kuo Y-H, Ikegami F, Lambein F (2003) Neuroactive and other free amino acids in seed and young plants of *Panax ginseng*. *Phytochemistry* **62**: 1087–1091

Lam HM, Coschigano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira I, Ngai N, Hsieh MH, Coruzzi G (1995) Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 887–898

Lamotte O, Bertoldo JB, Besson-Bard A, Rosnoblet C, Aimé S, Hichami S, Terenzi H, Wendehenne D (2015) Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants. *Front Chem*. doi: 10.3389/fchem.2014.00114

Lasanajak Y, Minocha R, Minocha SC, Goyal R, Fatima T, Handa AK, Mattoo AK (2014) Enhanced flux of substrates into polyamine

biosynthesis but not ethylene in tomato fruit engineered with yeast S-adenosylmethionine decarboxylase gene. *Amino Acids* **46**: 729–742

Laux T, Jurgens G (1997) Embryogenesis: A New Start in Life. *Plant Cell* **9**: 989–1000

Li S-B, Xie Z-Z, Hu C-G, Zhang J-Z (2016) A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2016.00047

Li Z, Burritt DJ (2003) Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. *Plant Growth Regulation* **40**: 65–74

Liu N, Zhu Y, Wei Z, Chen J, Wang Q, Jian S, Zhou D, Shi J, Yang Y, Zhong Y (2009) Phylogenetic relationships and divergence times of the family Araucariaceae based on the DNA sequences of eight genes. *Chinese Science Bulletin* **54**: 2648–2655

Llebrés M-T, Pascual M-B, Debille S, Trontin J-F, Harvengt L, Avila C, Cánovas FM (2018) The role of arginine metabolic pathway during embryogenesis and germination in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Tree Physiol* **38**: 471–484

Mahalingam R, Fedoroff N (2003) Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum* **119**: 56–68

Majumdar R, Barchi B, Turlapati SA, Gagne M, Minocha R, Long S, Minocha SC (2016) Glutamate, Ornithine, Arginine, Proline, and Polyamine Metabolic Interactions: The Pathway Is Regulated at the Post-Transcriptional Level. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2016.00078

Martínez-Ruiz A, Cadenas S, Lamas S (2011) Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med* **51**: 17–29

Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RA (1990) Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiological Reviews* **70**: 701–748

Minocha R, Shortle WC, Long SL, Minocha SC (1994) A rapid and reliable procedure for extraction of cellular polyamines and inorganic ions from plant tissues. *Journal of Plant Growth Regulation* **13**: 187

Minocha R, Smith DR, Reeves C, Steele KD, Minocha SC (1999) Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum* **105**: 155–164

Monteiro M, Kevers C, Dommes J, Gaspar T (2002) A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **68**: 225–232

- Morcillo F, Aberlenc-Bertossi F, Noirot M, Hamon S, Duval Y** (1999) Differential effects of glutamine and arginine on 7S globulin accumulation during the maturation of oil palm somatic embryos. *Plant Cell Reports* **18**: 868–872
- Murch SJ, Victor JMR, Krishnaraj S, Saxena PK** (1999) The role of proline in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut. *In Vitro CellDevBiol-Plant* **35**: 102–105
- Navarro BV, Elbl P, Souza APD, Jardim V, Oliveira LF de, Macedo AF, Santos ALW dos, Buckeridge MS, Floh EIS** (2017) Carbohydrate-mediated responses during zygotic and early somatic embryogenesis in the endangered conifer, *Araucaria angustifolia*. *PLOS ONE* **12**: e0180051
- Nejadalimoradi H, Nasibi F, Kalantari KM, Zanganeh R** (2014) Effect of seed priming with L-arginine and sodium nitroprusside on some physiological parameters and antioxidant enzymes of sunflower plants exposed to salt stress. *Agric Commun* **2**: 23–30
- Noctor G, Arisi A-CM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH** (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot* **49**: 623–647
- NOCTOR G, MHAMDI A, CHAOUCH S, HAN Y, NEUKERMANS J, MARQUEZ-GARCIA B, QUEVAL G, FOYER CH** (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment* **35**: 454–484
- Norstog K** (1965) DEVELOPMENT OF CULTURED BARLEY EMBRYOS I. GROWTH OF 0.1–0.4-mm EMBRYOS. *American Journal of Botany* **52**: 538–546
- de Oliveira JR, Adenesky Filho E, de Quadros KE** (2017) Avaliação do crescimento do lenho de *Araucaria angustifolia* no planalto norte de Santa Catarina. *Floresta* **47**: 155–164
- de Oliveira LF, Navarro BV, Cerruti G, Elbl P, Minocha R, Minocha SC, dos Santos ALW, Floh EIS** (2018) Polyamines and Amino Acid Related Metabolism: the Roles of Arginine and Ornithine are Associated with the Embryogenic Potential. *Plant and Cell Physiology* pcy049–pcy049
- Osti RZ de, Andrade JB da R, Souza JP de, Silveira V, Balbuena TS, Guerra MP, Franco DW, Floh EIS, Santa-Catarina C** (2010) Nitrosyl ethylenediaminetetraacetate ruthenium(II) complex promotes cellular growth and could be used as nitric oxide donor in plants. *Plant Science* **178**: 448–453
- Pastori GM, Foyer CH** (2002) Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of “Redox” and Abscisic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiology* **129**: 460–468

- Pieruzzi FP, Dias LLC, Balbuena TS, Santa-Catarina C, Santos ALW dos, Floh EIS** (2011) Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Ann Bot* **108**: 337–345
- Prehn D, Serrano C, Mercado A, Stange C, Barrales L, Arce-Johnson P** (2003) Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **73**: 91–94
- Procházková D, Haisel D, Pavlíková D** (2014) Nitric oxide biosynthesis in plants – the short overview. *Plant, Soil and Environment* **60**: 129–134
- Pullman GS, Bucalo K** (2014) Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development. *New Forests* **45**: 353–377
- Pullman GS, Zeng X, Copeland-Kamp B, Crockett J, Lucrezi J, May SW, Bucalo K** (2015) Conifer somatic embryogenesis: improvements by supplementation of medium with oxidation–reduction agents. *Tree Physiol* **35**: 209–224
- Quint M, Drost H-G, Gabel A, Ullrich KK, Bönn M, Grosse I** (2012) A transcriptomic hourglass in plant embryogenesis. *Nature* **490**: 98
- Reape TJ, McCabe PF** (2010) Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis* **15**: 249–256
- Reed BM, Sarasan V, Kane M, Bunn E, Pence VC** (2011) Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **47**: 1–4
- dos Reis MS, Fantini AC, Nodari RO, Reis A, Guerra MP, Mantovani A** (2000) Management and Conservation of Natural Populations in Atlantic Rain Forest: The Case Study of Palm Heart (*Euterpe edulis* Martius). *Biotropica* **32**: 894–902
- Remakanthan A, Menon TG, Soniya EV** (2014) Somatic embryogenesis in banana (*Musa acuminata* AAA cv. Grand Naine): effect of explant and culture conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **50**: 127–136
- Roesch LFW, Vieira FCB, Pereira VA, Schünemann AL, Teixeira IF, Senna AJT, Stefenon VM** (2009) The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. *Diversity* **1**: 182–198
- Rőszer T** (2014) Biosynthesis of Nitric Oxide in Plants. *In* MN Khan, M Mobin, F Mohammad, FJ Corpas, eds, *Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology*. Springer International Publishing, Cham, pp 17–32
- Sagor GHM, Berberich T, Kojima S, Niitsu M, Kusano T** (2016) Spermine modulates the expression of two probable polyamine transporter genes

and determines growth responses to cadaverine in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* **35**: 1247–1257

Saha P, Blumwald E (2016) Spike-dip transformation of *Setaria viridis*. *The Plant Journal* **86**: 89–101

Sánchez-Fernández R, Fricker M, Corben LB, White NS, Sheard N, Leaver CJ, Montagu MV, Inzé D, May MJ (1997) Cell proliferation and hair tip growth in the Arabidopsis root are under mechanistically different forms of redox control. *PNAS* **94**: 2745–2750

Santa-Catarina C, Silveira V, Balbuena TS, Viana AM, Estelita MEM, Handro W, Floh EIS (2006) IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regulation* **49**: 237–247

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

Santolini J, André F, Jeandroz S, Wendehenne D (2017) Nitric oxide synthase in plants: Where do we stand? *Nitric Oxide* **63**: 30–38

dos Santos ALW, Elbl P, Navarro BV, de Oliveira LF, Salvato F, Balbuena TS, Floh EIS (2016) Quantitative proteomic analysis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze cell lines with contrasting embryogenic potential. *Journal of Proteomics* **130**: 180–189

Schenk ST, Hernández-Reyes C, Samans B, Stein E, Neumann C, Schikora M, Reichelt M, Mithöfer A, Becker A, Kogel K-H, et al (2014) N-Acyl-Homoserine Lactone Primes Plants for Cell Wall Reinforcement and Induces Resistance to Bacterial Pathogens via the Salicylic Acid/Oxylipin Pathway. *The Plant Cell* **26**: 2708–2723

Schlögl PS, dos Santos ALW, do Nascimento Vieira L, Floh EIS, Guerra MP (2012) Gene expression during early somatic embryogenesis in Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **108**: 173–180

Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351–1365

Sequera-Mutiozabal M, Tiburcio AF, Alcázar R (2016) Drought Stress Tolerance in Relation to Polyamine Metabolism in Plants. *In* MA Hossain, SH Wani, S Bhattacharjee, DJ Burritt, L-SP Tran, eds, *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1: Physiology and Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp 267–286

- Sharma KK, Thorpe TA** (1995) Asexual Embryogenesis in Vascular Plants in Nature. *In* TA Thorpe, ed, *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 17–72
- Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV** (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Science* **160**: 1229–1235
- da Silva FC, Diaz-Ambrona CGH, Buckeridge MS, Souza A, Barbieri V, Dourado Neto D** (2008) SUGARCANE AND CLIMATE CHANGE: EFFECTS OF CO₂ ON POTENTIAL GROWTH AND DEVELOPMENT. *Acta Horti* 331–336
- Silveira V, Santa-Catarina C, Balbuena TS, Moraes FMS, Ricart CAO, Sousa MV, Guerra MP, Handro W, Floh EIS** (2008) Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum* **52**: 101–104
- Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Guerra MP, Floh EIS** (2006) Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant Science* **171**: 91–98
- Silveira V, Steiner N, dos Santos ALW, Nodari RO, Guerra MP** (2002) Biotechnology tools in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. *Crop Breeding And Applied Biotechnology* **2**:
- Silveira V, de Vita AM, Macedo AF, Dias MFR, Floh EIS, Santa-Catarina C** (2013) Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **114**: 351–364
- Singh H** (1978) Embryology of Gymnosperms. https://www.schweizerbart.de/publications/detail/isbn/9783443140113/H_Pflanzenanat_10_2_Singh_Embryol_of
- Stasolla C** (2010) Glutathione redox regulation of in vitro embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 319–327
- Stasolla C, Belmonte MF, Tahir M, Elhiti M, Khamiss K, Joosen R, Maliepaard C, Sharpe A, Gjetvaj B, Boutilier K** (2008) Buthionine sulfoximine (BSO)-mediated improvement in cultured embryo quality in vitro entails changes in ascorbate metabolism, meristem development and embryo maturation. *Planta* **228**: 255
- Stasolla C, Kong L, Yeung EC, Thorpe TA** (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: Morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **38**: 93–105

- Stasolla C, Loukanina N, Ashihara H, Yeung EC, Thorpe TA** (2001) Changes in pyrimidine nucleotide biosynthesis during germination of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **37**: 285–292
- Stasolla C, Yeung E** (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: Improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **74**: 15–35
- Stasolla C, Yeung EC** (2001) Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination. *Physiologia Plantarum* **111**: 196–205
- Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra MP, Cutri L, Dornelas MC, Floh EIS** (2012) A gymnosperm homolog of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (SERK1) is expressed during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **109**: 41–50
- Steiner N, Santa-Catarina C, Silveira V, Floh EI, Guerra MP** (2007) Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **89**: 55–62
- Steiner N, Vieira F do N, Maldonado S, Guerra MP** (2005) Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **48**: 895–903
- Steward FC, Mapes MO, Mears K** (1958) GROWTH AND ORGANIZED DEVELOPMENT OF CULTURED CELLS. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cell. *American Journal of Botany* **45**: 705–708
- Tang W, Newton RJ** (2003) Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. *Plant Cell Reports* **22**: 1–15
- TANOU G, ZIOGAS V, BELGHAZI M, CHRISTOU A, FILIPPOU P, JOB D, FOTOPOULOS V, MOLASSIOTIS A** (2014) Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant, Cell & Environment* **37**: 864–885
- Tautorus TE, Fowke LC, Dunstan DI** (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Can J Bot* **69**: 1873–1899
- Teyssier C, Grondin C, Bonhomme L, Lomenech A-M, Vallance M, Morabito D, Label P, Lelu-Walter M-A** (2011) Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiologia Plantarum* **141**: 152–165
- Thorpe TA** (1993) *In vitro* Organogenesis and Somatic Embryogenesis: Physiological and Biochemical Aspects. *In* KA Roubelakis-Angelakis, KT

Van Thanh, eds, Morphogenesis in Plants: Molecular Approaches. Springer US, Boston, MA, pp 19–38

- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GFE** (2006) Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant and Cell Physiology* **47**: 346–354
- Vieira L do N, Santa-Catarina C, de Freitas Fraga HP, dos Santos ALW, Steinmacher DA, Schlogl PS, Silveira V, Steiner N, Floh EIS, Guerra MP** (2012) Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. *Plant Science* **195**: 80–87
- Vondráková Z, Eliášová K, Vágner M, Martincová O, Cvikrová M** (2015) Exogenous putrescine affects endogenous polyamine levels and the development of *Picea abies* somatic embryos. *Plant Growth Regulation* **75**: 405–414
- Vuosku J, Jokela A, Läärä E, Sääskilähti M, Muilu R, Sutela S, Altabella T, Sarjala T, Häggman H** (2006) Consistency of Polyamine Profiles and Expression of Arginine Decarboxylase in Mitosis during Zygotic Embryogenesis of Scots Pine. *Plant Physiology* **142**: 1027–1038
- Vuosku J, Sutela S, Tillman-Sutela E, Kauppi A, Jokela A, Sarjala T, Häggman H** (2009) Pine embryogenesis. *Plant Signal Behav* **4**: 928–932
- Walters MB, Reich PB** (2000) SEED SIZE, NITROGEN SUPPLY, AND GROWTH RATE AFFECT TREE SEEDLING SURVIVAL IN DEEP SHADE. *Ecology* **81**: 1887–1901
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J** (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science* **6**: 177–183
- Wendt dos Santos AL, Steiner N, Guerra MP, Zoglauer K, Moerschbacher BM** (2008) Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum* **52**: 195–199
- West M, Harada J** (1993) Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *Plant Cell* **5**: 1361–1369
- Winter G, Todd CD, Trovato M, Forlani G, Funck D** (2015) Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2015.00534
- Zhou Q, Wang M, Yuan Y, Wang X, Fu R, Wan H, Xie M, Liu M, Guo X, Zheng Y, et al** (2016) Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells In Vitro. *Cell Stem Cell* **18**: 330–340
- van Zonneveld M, Scheldeman X, Escribano P, Viruel MA, Van Damme P, Garcia W, Tapia C, Romero J, Siguéñas M, Hormaza JI** (2012)

Mapping Genetic Diversity of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.):
Application of Spatial Analysis for Conservation and Use of Plant Genetic
Resources. PLOS ONE 7: e29845