

NEUSA STEINER

**Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze,
Pinus sylvestris (Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten:
ontogênese, padrão de expressão proteica e do gene SERK**

Florianópolis

Estado de Santa Catarina- Brasil

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

**Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze,
Pinus sylvestris (Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten:
ontogênese, padrão de expressão proteica e do gene SERK**

**Discente: Neusa Steiner
Orientador: Prof. Miguel Pedro Guerra**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial à obtenção do título
de Doutor em Ciências. Área de
Concentração: Recursos Genéticos
Vegetais.**

Florianópolis, junho de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Steiner, Neusa

Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.)

Kuntze, *Pinus sylvestris*(Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus)

Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK

– 2009.

163f. : il., tabs.

Orientador: Miguel Pedro Guerra

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias.

1. *Araucaria angustifolia*. 2. biologia do desenvolvimento 3. coníferas 4. Proteomica 5. expressão genica.

I. Título.

*Dedico este trabalho a vida...
e aos meus pais que me ensinaram sobre a simplicidade e perseverança*

AGRADECIMENTOS

Uma parte de mim nestes últimos anos está refletida neste trabalho e é uma grande alegria e responsabilidade agradecer a inúmeras pessoas que contribuíram durante esta rica etapa de minha vida. Tantos já se foram e muitos ainda estão entre nós...

Meu muito obrigado a todos.

A minha família (Pai (*in memoriam*), Mãe, Marcelo, Tiago e Felipe) por me ajudar a superar, a acreditar e que apesar da distância sempre estiveram presentes

Ao meu marido José Sidinei pelo amor e apoio incondicional

Aos amigos que compartilharam minhas conquistas
e me fortaleceram em momentos difíceis

Ao meu orientador Prof. Miguel Pedro Guerra pelo tempo dedicado, por acreditar no meu trabalho e pelas oportunidades construídas

Aos demais professores os quais me deram oportunidade para discutir sobre este tema e realizar meu trabalho, em especial Profa. Dra. Sara Maldonado (UBA), Profa. Dra. Sara von Arnold (SLU), Profa. Dra. Eny I.S. Floh (USP), Profa. Dra. Marguerita Barraco (UFSC), Profa. Dra. Claudete Santa Catarina (UENF), Prof. Dr. Vanildo Silveira (UENF), Profa. Dra. Zenilda L. Bouzon (UFSC), Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (UFSC), Dr. André Luis Wendt dos Santos (USP), Profa. Dra. Alexandra Mastroberti (UFGRS), Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath (UFRGS), Prof. Dr. Emmanuel Maltempo (UFPR) e Prof. Dr. Luciano Huergo (UFPR)

Aos professores que aceitaram gentilmente fazer parte
da banca deste trabalho

Aos professores do curso de Pós Graduação Recursos Genéticos Vegetais
pelas discussões e por todos os ensinamentos repassados

Aos meus colegas de laboratórios, viagens, bancadas, discussões científicas e
“filosóficas”, chás e cafés

A todos os alunos de Iniciação científica, em especial a Daniela Schmitz, que
compartilharam comigo o trabalho, as dúvidas, as discussões
e as descobertas

A todos que admiram e que contribuem para o estudo
da biologia do desenvolvimento

Aos funcionários desta universidade
A oportunidade de ter ensino público
Ao CNPq pelo apoio financeiro

Agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para minha
formação e para que este trabalho se concretizasse.

Muito Obrigado, Gracias, Thank you, Tack så mycket!

INDICE

AGRADECIMENTOS	v
INDICE	1
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES	16
1.1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.2.1. <i>Araucaria angustifolia</i>	19
1.2.2. <i>Pinus sylvestris</i>	21
1.2.3. <i>Picea abies</i>	22
1.2.4. Embriogênese zigótica em coníferas	23
1.2.5. Embriogênese somática em coníferas	27
1.2.6. Análise proteômica em plantas	34
1.2.7. Expressão de genes marcadores	36
1.3. OBJETIVOS	38
1.3.1. Objetivo geral	38
1.3.2. Objetivos específicos	38
CAPÍTULO I	40
<i>Embriogênese somática em Araucaria angustifolia, Pinus sylvestris e Picea abies: análises morfológicas, histoquímicas e subcelulares</i>	40
2.1. INTRODUÇÃO	41
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.2.1. Cultivo <i>in vitro</i>	44
2.2.2. Indução e proliferação das culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i>	44
2.2.3. Maturação das culturas embriogênicas de <i>A. angustifolia</i>	45
2.2.4. Proliferação das culturas embriogênicas de <i>P. abies</i>	46
2.2.5. Pré-maturação das culturas embriogênicas de <i>P. abies</i>	46
2.2.6. Maturação dos embriões somáticos de <i>P. abies</i>	46
2.2.7. Proliferação das culturas embriogênicas de <i>P. sylvestris</i>	47
2.2.8. Pré-maturação das culturas embriogênicas de <i>P. sylvestris</i>	47
2.2.9. Maturação dos embriões somáticos de <i>P. sylvestris</i>	48
2.2.10. Avaliação morfológica	48

2.2.11. Detecção de fragmentação DNA <i>in situ</i> (TUNEL teste)	48
2.2.12. Microscopia ótica (MO)	49
2.2.13. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	50
2.2.14. Processamento do material para Imunofluorescência	51
2.2.15. Incubação das seções para Imunofluorescência	51
2.2.16. Análise estatística	52
2.2.17. Colaborações estabelecidas	52
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
2.3.1. O modelo de desenvolvimento de embriões somáticos de <i>A. angustifolia</i>	53
2.3.2. A morte celular programada (MCP) ocorre no início da embriogênese final e não nos estádios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos de <i>A. angustifolia</i>	63
2.3.3. Proteínas arabionogalactanas (AGPs) como marcadores espaciais e temporais da morte celular em embriões somáticos de <i>A. angustifolia</i>	71
2.3.4. Efeito do ABA na morfologia e MCP durante os estádios iniciais de desenvolvimento de embriões somáticos em Norway spruce (<i>Picea abies</i>)	74
2.3.4.1. Desenvolvimento normal de embriões somáticos em <i>Picea abies</i>	74
2.3.4.2. Tratamento com ABA durante o estádios iniciais da embriogênese induzem morfologias anormais do embrião	75
2.3.4.3. Morfologias anormais evidenciam aumento da frequência de células TUNEL positivas embrionárias e de suspensor	81
2.3.5. Efeito de Fluoridone no desenvolvimento inicial de embriões somáticos de <i>P. sylvestris</i>	83
2.3.5.1. Desenvolvimento de embriões somáticos de <i>P. sylvestris</i>	83
2.3.5.2. Fluoridone promove a diferenciação dos estádios iniciais do desenvolvimento dos embriões somáticos em <i>P. sylvestris</i>	84
2.3.5.3. Os estádios tardios de desenvolvimento do embrião somático de <i>P. sylvestris</i> mantêm a capacidade autoreplicativa	88
2.3.6. Conclusões	90
CAPÍTULO II	92
<i>Análise proteômica durante a embriogênese somática de A. angustifolia</i>	92
3.1. INTRODUÇÃO	93
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	95
3.2.1. Material vegetal	95
3.2.2. Extração e quantificação de proteínas	96
3.2.3. Eletroforese bidimensional (2-DE)	97
3.2.4. Análise do gel	98
3.2.5. Digestão dos spots	98
3.2.6. Análise em espectrômetro de massa e interpretação dos dados	99
3.2.7. Análise estatística	100
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
3.3.1. Estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos	100

3.3.2. Conteúdo de proteínas e perfil protéico em géis bidimensionais		101
3.3.3. Identificação e perfil de expressão de proteínas		107
3.3.4. Conclusões		115
CAPITULO III		117
<i>Expressão do homólogo do gene SERK em culturas embriogênicas de Araucaria angustifolia</i>		117
4.1. INTRODUÇÃO		118
4.2. MATERIAL	E	MÉTODOS
		120
4.2.1. Material vegetal		120
4.2.2. Extração de RNA		120
4.2.3. Quantificação de RNA total		121
4.2.4. RT-PCR para clonagem de homólogos de SERK		122
4.2.5. Caracterização dos possíveis homólogos de SERK por análise de seqüências		124
4.2.6. Caracterização do padrão de expressão dos possíveis homólogos de SERK por hibridização <i>in situ</i>		124
4.3. RESULTADOS	E	DISCUSSÃO
		125
4.3.1. Quantificação de RNA		125
4.3.2. Obtenção de homólogos de SERK		126
4.3.3. Clonagem e caracterização dos possíveis homólogos de SERK		127
4.3.4. Caracterização do padrão de expressão dos possíveis homólogos de SERK por hibridização <i>in situ</i>		132
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS		137
6. REFERÊNCIAS		142

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES

Figura 1. a) Ocorrência natural de florestas com A. angustifolia; b) Área de ocorrência atual de A. angustifolia (Guerra et al., 2002). _____ 21

Figura 2. Ciclo de vida de A. angustifolia. É uma espécie dióica com estrutura reprodutiva masculina (microestróbilo) constituída por escamas coriáceas arranjadas em forma de espiral e se abrem deixando o pólen livre para ser transportado pelo vento. A estrutura reprodutiva feminina (megaestróbilo) localiza-se no ápice do ramo, e é constituída por inúmeras brácteas coriáceas que contém o óvulo (escama ovulífera). O pólen é depositado em qualquer lugar da escama do cone feminino e inicia a germinação in situ. O período de polinização ocorre nos meses de agosto e setembro. O momento exato da fecundação não foi ainda determinado. Nos estádios iniciais da embriogênese, as divisões nucleares formam de 32 a 64 núcleos livres antes da formação das paredes celulares. Após, a elongação celular inicia simultaneamente em ambos os grupos de células superiores e inferiores imediatamente após a completa formação da parede celular. O grupo de células inferiores forma as células de capa (Cc). O grupo de células superior forma as células do suspensor (Cs). O grupo central de células constitui um grupo de células embriogênicas (Ce). Estes três grupos de células constituem o pró-embrião. Após a polinização, transcorrem 14 meses até a identificação dos poliembriões, caracterizando a poliembrionia, ou seja, a formação de mais de um embrião nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente. Contudo apenas um embrião permanece na semente madura, e a regressão dos embriões subordinados ocorre entre os meses de novembro e dezembro. O desenvolvimento do embrião dominante de A. angustifolia ocorre entre os meses de dezembro a junho, passando pelos estádios de desenvolvimento globular, pré-cotiledonar e cotiledonar maduro. Após a germinação, a planta leva em torno de 15 anos para entrar em idade reprodutiva (Guerra et al., 2008). _____ 25

Figura 3. Fases do desenvolvimento do embrião zigótico em gimnospermas (Piceaceae). A ilustração não está em escala. Adaptado de von Arnold et al.(2002). _____ 27

Figura 4. Modelo de desenvolvimento dos embriões somáticos de Picea abies (Adaptado de von Arnold et al., 2005) _____ 31

Figura 5. Ciclos para a indução e maturação de embriões somáticos de A. angustifolia. A) Ciclos repetitivos de divisão celular em meio de cultura BM suplementado ou não com 2,4- D (5 µM), BAP e Kin (2 µM cada); B) Maturação dos embriões somáticos em meio de cultura BM suplementado com PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150µM) (Steiner, 2005). _____ 33

CAPÍTULO I

Figura 1. Caracterização morfológica por meio da dupla coloração com Azul de Evans e Carmim acético das culturas embriogênicas de A. angustifolia durante a indução (a), proliferação (b,c,d,e,f) e início da maturação (g,h,i,j,k,l). a) extrusão do grupo celular a

partir do ápice do embrionário zigótico; b,c,e) distintos estádios de massas pró-embriônicas (MPEs) I, II e III, respectivamente; d) fragmentação de PEMs; f) pró-embrião com início de polarização; g) embriões iniciais gêmeos; h) embriões iniciais com ápice largo conectado a um supranumerário sistema de células do suspensor; i) embriões iniciais com ápice pouco definido e enrugado; j,k) embriões iniciais com ápice cilíndrico e sistema de suspensor alinhado; l) embriões iniciais com regressão para os estádios de PEMs perdendo completamente a polaridade. Notar em f,g,h,i,j,k,l a presença de células embriogênicas na região do suspensor em todas as diferentes morfologias observadas. _____ 59

Figura 2. Análise histológica das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* durante a etapa de proliferação. Seções de historesina foram coradas com Azul de Toluidina (1%) e analisadas em microscopia ótica (MO). a) pró-embrião somático formado por um grupo de células embriogênicas (Ce) circundado por células do suspensor (Cs); b) células embriogênicas em distintos estádios da mitose; c) células embriogênicas com presença de grânulos de amido (s) circundando o núcleo; d) células do suspensor anucleada com grânulos de amido; e, f) células em processo de morte celular programada que ao final são reduzidas a um protoplasma (Pt) com restos citoplasmáticos incluindo o núcleo e a parede celular (Barras=1mm). _____ 60

Figura 3. Análise histológica das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* durante o início da maturação. Seções de historesina foram coradas com Azul de Toluidina (1%) e analisadas em microscopia ótica (MO) a) grupo de células embriogênicas com a formação de embriões somáticos em estádios iniciais na superfície da cultura e embrião somático inicial alongado; b) grupo de células embriogênicas com a formação de embriões somáticos anormais; c) embrião no início da maturação, células embriogênicas periféricas no ápice embrionário reiniciando novamente a formação de células do suspensor; d) detalhe de (a) embrião somático inicial originado a partir do grupo de células embriogênicas; e) detalhe de (a) embrião somático inicial alongado (Barras=1mm). _____ 61

Figura 4. Modelo de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*. 1) embrião zigótico imaturo; 2) indução do primeiro grupo celular a partir do ápice embrionário zigótico; 3,4,5) Massas pró-embriônicas (MPEs) as quais passam pelos três estádios de acordo com o tamanho e número de células; 6) início do estabelecimento de polaridade e individualização do pró-embrião; 7,8,10) anormalidades morfológicas (ápice largo (7), gêmeos (8), células embriogênicas na região do suspensor (10)) observadas em próembriões individualizados após 30 dias em meio de cultura BM suplementado com ABA; 9) pró-embrião com morfologia normal, porém, com células embriogênicas na região do suspensor; 11-14) estádios observados durante o final da embriogênese após 80 dias em ABA; 15) germinação do embrião somático; PCI ponto crítico do protocolo o qual sugere-se uma etapa adicional de pré-maturação a qual deve trabalhar aspectos do balanço hormonal endógeno, transporte de auxina, morte celular programada (MCP); PC2 Ponto crítico do protocolo pela baixa frequência de embriões somáticos maduros; ce (células embriogênicas); cs (células do suspensor). _____ 62

Figura 5. Morfologia em embriões somáticos de *A. angustifolia* durante a fase inicial do desenvolvimento submetido ao teste de TUNEL. Imagens de em microscopia de luz clara das diferentes morfologias dos embriões em estágio inicial do desenvolvimento (a,d) com células meristemáticas na região do suspensor (g) gêmeos e (j) ápice embrionário

largo com supranumerário sistema de células do suspensor. Os mesmos embriões foram observados com coloração para DAPI (b, e, h, k) e TUNEL (c, f, i, l). _____ 65

Figura 6. Análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de culturas embriogênicas de A. angustifolia. a) células embriogênicas com grânulos de amido (S) e pequenos vacúolos (V) dispersos pelo citoplasma (Barra=0,19 µm); b) célula embriogênica com citoplasma denso, núcleo (N), nucléolo (Nu) e envoltório nuclear (Ne) definido (Barra=0,02 µm); c) célula embriogênica em intensa atividade citoplasmática apresentando mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (RER) e dictiossomos (D); no detalhe da parede celular a lamela média (LM) (Barra=0,19 µm); d) célula do suspensor com presença de grânulos de amido (S) e núcleo (N) (Barra=0,26 µm). _____ 69

Figura 7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Análise ultraestrutural da morte celular programada (MCP) durante a embriogênese somática de A. angustifolia. a) célula embriogênica com pequenos vacúolos (V) e presença de grânulo de amido (S) circundando o núcleo (N) (Barra=0,26µm); b) parede celular evidenciando a presença de plasmodesmas (Pd) entre as células em processo de morte celular programada (MCP), MP (membrana plasmática) (Barra=0,01µm); c) células embriogênicas com presença de vacúolos(V) englobando vesículas (Barra=0,26µm); d) detalhe do englobamento de vesículas e do tonoplasto (T) circundando o vacúolo (V) (Barra=0,06µm); e) Núcleo de célula embriogênica com a cromatina desfragmentada (Barra=0,02µm); f) estágio final da MCP em que a célula é reduzida a um protoplasma em que o tonoplasto engloba os restos citoplasmático e é circundado pela parede celular (CW) (Barra=0,26µm). _____ 70

Tabela 1. Reconhecimento dos epítomos em diferentes estádios de desenvolvimento do embrião durante a embriogênese somática de A. angustifolia _____ 71

Figura 8. Padrão de expressão espacial e temporal de AGPs durante a embriogênese somática de A. angustifolia por meio da imunolocalização do epítipo JIM 13. a) visão geral do processo de formação do embrião somático: a direita - grupo de células embriogênicas e células de suspensor com início de degradação com reação positiva ao epítipo JIM13; a esquerda embrião somático globular inicial sem detecção; b) controle; grupo de células embriogênicas em processo de degeneração com reação positiva ao epítipo JIM 13; c,d) grupos de células do suspensor em processo de degeneração com reação positiva ao epítipo JIM 13 (Barras=1mm). _____ 73

Figura 9. Frequência de embriões somáticos iniciais de P. abies após uma semana em meio de cultura de proliferação suplementado com ABA (0, 10, 20, 30 e 60 µM). A frequência (%) foi calculada considerando 300 massas pró-embriônicas (PEMs). Barras verticais sobre colunas representam o desvio padrão da média. _____ 76

Figura 10. Caracterização das morfologias observadas nos estádios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos de P. abies, provenientes do meio de pré-maturação suplementado com ABA e após uma semana de exposição ao meio de cultura de maturação. a) embrião somático inicial normal; b,c) embrião somático com presença de células embriogênicas na região do suspensor; d,e) embrião somático com ápice alargado e um supranumerário grupo de células do suspensor; f) embriões gêmeos; g,h) embrião solar com total ausência de polaridade formado por um grupo de células embriogênicas circundado por células dos suspensor; i) embrião em estágio de desenvolvimento tardio com a região embriogênica deformada. (Barras 100 µm) _____ 77

Tabela 2. Frequência das diferentes morfologias observadas em embriões somáticos de *P. abies* após uma semana em meio de cultura suplementado com ABA (30 μ M). As culturas eram provenientes do meio de pré-maturação suplementado com ABA (0, 10, 20, 30 e 60 μ M). _____ 79

Figura 11. Desenvolvimento de embriões somáticos de *P. abies*, provenientes do meio de pré-maturação suplementado com ABA, após exposição ao meio de cultura de maturação suplementado com ABA (30 μ M). a) embriões somáticos iniciais após uma semana; b) embriões somáticos iniciais após duas semanas; c,d) desenvolvimento dessincronizado dos embriões somáticos após três e quatro semanas respectivamente; e) embrião somático cotiledonar normal, embrião somático globular anormal após cinco semanas; f) embrião somático anormal com hipocótilo super alongado após seis semanas em meio de maturação. (Barras 200 μ m). _____ 80

Figura 12. Teste de TUNEL em estádios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos de *P. abies*, provenientes do meio de pré-maturação suplementado com ABA e após uma semana de exposição ao meio de cultura de maturação. Frequência de células positivas ao TUNEL foi baseada no número total de núcleos corados com DAPI dentro de cada embrião. Barras verticais sobre colunas representam o desvio padrão da média _____ 82

Figura 13. ABA induz morfologia anormal em embriões somáticos de *P. abies* durante a fase inicial do desenvolvimento e aumenta o número de células TUNEL positivas. Imagens de em microscopia de luz clara das diferentes morfologias do embrião normal (a), gêmeos (d), ápice largo (g) e solar (j). Os mesmos embriões foram observados com coloração para DAPI (b, e, h, k) e TUNEL(c, f, i, l). _____ 82

Figura 14. Efeito de Fluoridone no desenvolvimento de embriões iniciais e tardios de *P. silvestrys*. (a,a1) frequência de embriões somáticos individualizados após duas semana em meio de cultura de pré-maturação suplementado com Fluoridone (0, 10, 15, 30 e 60 μ M); (b,b1) frequência de embriões somáticos iniciais uma semana após transferência em meio de cultura de maturação com ABA (60 μ M); (c,c1) frequência de embriões somáticos tardios 4 semanas após transferência em meio de cultura de maturação com ABA (60 μ M). A frequência (%) foi calculada considerando 300 massas pró-embriônicas (PEMs). Barras verticais sobre colunas representam o desvio padrão da média _____ 85

Figura 15. Modificações morfológicas avaliadas por meio da dupla coloração com carmim acético e azul de Evans durante o desenvolvimento de embriões somáticos de *P. silvestrys*. (a) MPEs durante a proliferação; (b) individualização do embrião pelo alongamento das células do suspensor após uma semana em meio de pré-maturação com Fluoridone (15 μ M); (c,d,e) embriões somáticos iniciais e gêmeos após uma semana em meio de maturação com ABA (60 μ M); (f,gh) embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento após quatro semanas em meio de maturação com ABA (60 μ M). _____ 87

Figura 16. Desenvolvimento de embriões somáticos de *P. silvestrys* provenientes do meio de pré-maturação suplementado Fluoridone (0, 10, 15, 30 e 60 μ M) e após transferência para o meio de cultura de maturação suplementado com ABA (60 μ M). a) embriões somáticos iniciais após uma semana; b) embriões somáticos iniciais após duas semanas; c,d) desenvolvimento dessincronizado dos embriões somáticos após quatro semanas; e,f) desenvolvimento de embriões somáticos iniciais sobre os embriões somáticos tardios pré-

cotiledonares após seis semanas; g,h) embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento após oito semanas em meio de maturação. _____ 89

CAPÍTULO II

Figura 1. (a) Padrão de desenvolvimento de embriões somáticos de A. angustifolia correspondentes aos estádios de desenvolvimento utilizados neste estudo. (b) Tratamentos e períodos de coleta das amostras correspondente as diferentes fases do desenvolvimento do embrião somático (a). Amostra 1 (0 dias) - cultura embriogênicas provenientes da etapa de proliferação em meio de cultura BM (Gupta & Pullmann, 1991) suplementado com 2,4-D (2 μ M), BAP e Kin (0,5 μ M cada) contendo predominantemente pró-embriões somáticos. Amostra 2 (30 dias) - culturas embriogênicas coletadas após 30 dias de subcultivo em meio de cultura BM (Gupta & Pullmann, 1991) suplementado com ABA (150 μ M), Maltose (9% p/v) e PEG (7%p/v) isento de fitorreguladores contendo embriões somáticos em estádios iniciais do desenvolvimento. Amostra 3 (60 dias) - culturas coletadas após 60 dias de cultivo nas mesmas condições da amostra 2 contendo embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento. _____ 101

Figura 2. Conteúdo de proteínas da fase pró-embrionária, embriogênese inicial e embriogênese final durante a o desenvolvimento do embrião somático de A. Angustifolia. Barras verticais sobre colunas representam \pm desvio padrão da média. 102

Figura 3. Distribuição do número médio de “spots” de acordo com o parâmetro peso molecular (Kda) e ponto isoelétrico (pI) no gel 2-DE dos estádio de pró-embrionário, embriogênese inicial e embriogênese taradia durante o desenvolvimento do embrião somático de A. Angustifolia. Valores foram obtidos dos spots presentes nas três repetições de cada estádio. Barras verticais sobre colunas representam \pm desvio padrão da média. _____ 103

Figura 4. Perfil 2-DE da fase pró-embrionária (A), embriogênese inicial (B) e embriogênese final (C) durante o desenvolvimento do embrião somático de A. angustifolia. As imagens representam o perfil de proteínas expressas a partir das amostras coletadas durante a proliferação (0 dias), maturação (30 e 60 dias). O gradiente de pH e a posição dos marcadores de peso molecular estão indicados no topo e lado esquerdo das imagens, respectivamente. Os números indicados nos géis se referem as proteínas identificadas durante as diferentes fases de desenvolvimento do embrião, as quais estão especificadas na Tabela 1. Os mesmos números em diferentes géis representam a mesma proteína. Números únicos representam proteínas específicas. 105

Figura 5. Expressão diferencial de proteínas, em número de “spots”, entre a fase pró-embrionária, embriogênese inicial e embriogênese final durante o desenvolvimento do embrião somático de A. angustifolia. Valores entre parêntesis representam o número total de spots em cada fase. Valores foram obtidos a partir do gel sintético contendo somente os spots presentes nas três repetições de cada estádio. _____ 106

Tabela 1. Lista de proteínas identificadas durante a embriogênese somática de A. angustifolia _____ 112

Figura 6. Dinâmica de expressão, com o critério percentagem de volume, das 35 proteínas identificadas durante a fase pró-embrionária, embriogênese inicial e

embriogênese final do desenvolvimento do embrião somático de A. angustifolia. Valores obtidos a partir dos géis contendo somente spots presentes em todas as três repetições de cada estágio. _____ 114

Figura 7. Classificação funcional das proteínas identificadas durante o desenvolvimento do embrião somático de A. angustifolia. A classificação funcional de acordo a base de dados do gene ontology (<http://www.expasy.org>) _____ 115

CAPÍTULO I

Tabela 1. Rendimento e qualidade do RNA total por espectrofotômetro em amostras de A. angustifolia. _____ 126

Figura 1. RNA em gel de agarose (1%) obtidos em 4 amostras de A. angustifolia. BM00 = Meio de cultura BM sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2µM) BAP e Kin (0,5µM) (fase proliferação); BM0 35d - culturas provenientes do meio BM00 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 µM) (fase maturação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 µM) (fase maturação). _____ 126

Figura 2. RT-PCR a partir de RNAs extraídos de culturas celulares de A. angustifolia, com utilização de primers degenerados para o gene SERK. Os códigos em cada canaleta representam os diferentes meios de cultura onde foram cultivados os materiais utilizados para extração de RNA: BM00 = Meio de cultura BM sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2µM) BAP e Kin (0,5µM) (fase proliferação); BM0 35d - culturas provenientes do meio BM00 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 µM) (fase maturação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 µM) (fase maturação). Mkb: Marcador molecular. _____ 127

Figura 3. Comparação da seqüência protéica de AbSERK1 de A. angustifolia com outros homólogos de SERK: As seqüências deduzidas de aminoácidos de proteínas SERK de milho (ZmSERK1 e ZmSERK2), Arabidopsis (AtSERK1-5), Medicago (MtSERK1) e cenoura (DcSERK1) foram alinhados e os domínios relevantes indicados por retângulos abaixo do alinhamento. Os aminoácidos totalmente conservados são indicados por "" e os parcialmente conservados, indicados por ":". "Gaps" incluídos para otimização do alinhamento são indicados por "-". ZIP: zíper de leucina putativo; LRR1-5: domínios contendo os padrões repetitivos de leucina (Leucine Rich Repeats); SPP: região rica em prolina; TM: domínio transmembrana; I-XI: domínios característicos de proteínas-kinase I a XI; C-terminal: domínio carboxi-terminal.* _____ 130

Figura 4. Relações filogenéticas entre homólogos de SERK. As seqüências protéicas correspondentes aos domínios kinase I-XI de diferentes homólogos de SERK foram alinhados e uma matriz de distância (Saitou & Nei, 1987) gerada. Esta matriz foi utilizada para a construção do cladograma por neighbour-joining. A barra indica 10% de substituições não-sinônimas. Os números indicam valores de bootstrap, em porcentagem (1000 repetições). Apenas os valores acima de 75% são mostrados. _____ 131

Figura 5. Estereomicroscopia e microscopia eletrônica de varredura de culturas embriogênicas de A. angustifolia em fase de proliferação (cultivados em BM0) (a,c) e

durante a embriogênese inicial na: fase de maturação (em meio BM2 35d (Meio de) (b,d). Nas culturas em BM0 não há formação aparente de embriões somáticos iniciais, apenas pro-embriões. Em culturas cultivadas em meio BM2 35d, observa-se a formação de embriões somáticos em fases iniciais do desenvolvimento sobre a superfície da cultura. BM0 - Meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2 μ M) BAP e Kin (0,5 μ M) (fase proliferação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 μ M) (fase maturação). Barras: 500 μ m. _____ 133

Figura 6. Hibridização *in situ* com a utilização de sondas sense (E-F) e antisense (B-D) de AaSERK em *A. angustifolia*. O sinal de hibridização é observado pela presença da coloração rosa-arroxado. A: Cultura em meio de proliferação (BM0); B: Cultura em meio BM2 35d. A seta indica um grupo de células em intensa divisão celular apresentando sinais de hibridização. C: cultura em meio de maturação (BM2 35d) apresentando estruturas semelhantes a embriões iniciais. A seta indica o ápice embrionário, com sinal intenso de hibridização e a ponta de seta indica a células do suspensor as quais estão em processo de degeneração, com sinal menos intenso de hibridização. D: Embriões somáticos apresentando sinal de hibridização apenas nas regiões periféricas do ápice embrionário (ep). Culturas em meio BM0 (E) e em meio BM2 35 dias (F) não apresentaram sinais de hibridização acima do ruído de fundo, quando hibridizados com a sonda sense. ep: ápice embrionário; su: suspensor. BM0 - Meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2 μ M) BAP e Kin (0,5 μ M) (fase proliferação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 μ M) (fase maturação). Barras: 500 μ m. Barras: A, C e E: 250 μ m. B, D e F: 100 μ m. ____ 134

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenóxiacético

2-DE: eletroforese bidimensional

ABA: ácido abscísico

ADN: ácido desoxirribonucleico; **DNA:** *deoxyribonucleic acid*

AGPs: proteínas arabinogalactanas

AIA: ácido indol -3- acético

Ala: alanina

ANOVA: análise de variância

ARN: ácido ribonucleico; **RNA:** *ribonucleic acid*

Asp: ácido aspártico

BAP: 6-benzilaminopurina

BM: meio de cultura proposto por Gupta e Pullman, 1991

BSA: albumina do Soro Bovino

CBB: azul brilhante de Coomassie

Cc: célula de capa

cDNA: DNA complementar

Ce: célula embriogênica

Cev: célula embriogênica vizinha

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

Cs: célula de suspensor

DAPI: *4'-6-Diamidino-2-phenylindole*

DEPC: dimetil pirocarbonato

DTT: ditioneitol

Glu: ácido glutâmico

HCL: ácido clorídrico

HSPs: *heat shock proteins*

IEF: focalização isoelétrica

JIM: *john Innes Monoclonal*

JIM13: anticorpo monoclonal de arabinogalactana (*beta*)GlcA1->3(*alpha*)GalA1->2Rha

kDa: kilodaltons

Kin: cinetina

LEA: *late embryogenesis abundant*

MALDI Tof/Tof: *matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*

MCP: morte celular programada

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MF: matéria fresca

MO: microscopia ótica

MPES: massas pró-embrionárias

MS: matéria seca

MW: massa molecular

N: nitrogênio

NAOH: hidróxido de sódio

NPA: ácido naftiltálmico (*naphthylphthalamic acid*)

°C: graus Celsius

PAs: poliaminas

PCIB: *parachlorophenoxy isobutyric acid*

PEG: polietilenoglicol

pI: ponto isoelétrico

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

Put: putrescina

Rpm: rotações por minutos

RT PCR: transcriptase reversa – reação da polymerase em cadeia (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

SDS: dodecil sulfato de sódio

SERK: *somatic embryogenesis receptor kinase*

Spd: espermidina

Spm: espermina

TCA: ácido tricloro acético

TUNEL: *terminal deoxinucleotidil transferase dUTP(Uracil) Nick End Labeling*

v/v: volume/volume

w/v: peso/volume

Zn: zinco

RESUMO

O estudo dos mecanismos do desenvolvimento embrionário em plantas pode ser facilitado pelo estabelecimento de sistemas modelos associados a embriogênese *in vitro*. Avanços no conhecimento básico e aplicações biotecnológicas são decorrentes dos estudos destes sistemas biológicos. Com a finalidade de regular eficientemente a regeneração de plantas por meio da embriogênese somática é importante entender como os embriões somáticos são formados e como este desenvolvimento é influenciado por sinalização endógena ou exógena. O objetivo do presente trabalho foi estudar o padrão de organização morfológica e a histogênese durante o desenvolvimento inicial do embrião somático em *Araucaria angustifolia*, *Pinus sylvestris* e *Picea abies* assim como o perfil de proteínas e o padrão de expressão do gene SERK durante a embriogênese somática em *A. angustifolia*. O modelo de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia* se caracteriza pela formação de culturas embriogênicas a partir de embriões zigóticos imaturos que proliferam na forma de massas pró-embriônicas (MPEs). Embriões somáticos desenvolvem-se a partir das PEMs por meio da retirada de fitorreguladores e pela suplementação de ABA, PEG e Maltose. A transição das MPEs para embriões somáticos é um dos pontos críticos observados e diversas anormalidades morfológicas são observadas. A morte celular programada (MCP) ocorre nos primeiros estádios finais da embriogênese não nos estádios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*. Células embriogênicas e células do suspensor são eliminadas durante o início da embriogênese final por meio da MCP caracterizada pela autofagia. As proteínas arabionogalactanas (AGPs) são marcadores espaciais e temporais da morte celular em embriões somáticos de *A. angustifolia*. O epítipo JIM 13 foi detectado principalmente em células do suspensor em processo de degradação. Foi utilizado, como modelo comparativo, o sistema de embriogênese somática em *P. abies* para estudar o efeito do ABA na morfologia e MCP durante os estádios iniciais de desenvolvimento de embriões somáticos em *P. abies* visando melhor entender as anormalidades morfológicas observadas em *A. angustifolia*. O tratamento com ABA durante os estádios iniciais da embriogênese induz morfologias anormais do embrião e um aumento da frequência de células TUNEL positivas embrionárias e de suspensor. O Fluoridone promove a diferenciação dos estádios iniciais do desenvolvimento dos embriões somáticos em *P. sylvestris*. No entanto os estádios tardios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *P. sylvestris* mantêm a capacidade autoreplicativa. Foi caracterizado o perfil de expressão de proteínas durante a fase pró-embriônica, embriogênese inicial e final do embrião somático de *A. angustifolia* por meio da análise em eletroforese bidimensional (2-DE). Foram identificadas proteínas que apresentaram expressão diferencial durante os distintos estádios. Proteína de reserva vicilina foi observada em embriões somáticos no início da embriogênese final de forma similar ao observado na embriogênese zigótica. A expressão do gene SERK foi avaliada durante a fase de pró-embriônica e embriogênese inicial e sua expressão foi detectada, por meio de hibridação *in situ*, em células do ápice embrionário em meio de cultura suplementado com ABA, PEG e maltose. Os resultados aqui obtidos ampliam a base científica para aprofundar a compreensão dos fatores associados a biologia do desenvolvimento embrionário em coníferas e a embriogênese somática em *A. angustifolia*. O estabelecimento de um protocolo completo de embriogênese somática em *A. angustifolia* se configura em uma ferramenta para o estabelecimento de programas de conservação e melhoramento de germoplasma desta conífera nativa.

ABSTRACT

The study of the mechanisms involved during embryonic development in plants can be facilitated by the establishment of *in vitro* systems of plants embryogenesis models. Biotechnological advances in the basic knowledge and applications are decurrent of the studies of these biological systems. In order to efficiently regulate the formation of plants via somatic embryogenesis it is important to understand how somatic embryos develop and how the development is influenced by endogenous and exogenous signals. The aim of the present work was to study the morphological organization and histogenesis during the early development of somatic embryo in *A. angustifolia*, *Pinus sylvestris* and *Picea abies* as well as to study the protein profile and expression of gene SERK during somatic embryogenesis in *A. angustifolia*. The pathways of somatic embryos development in *A. angustifolia* was characterized by the extrusion of embryogenic cultures from immature zygotic embryos that proliferate like pro-embryonic masses (PEMs). Somatic embryos develop from PEMs by the withdrawal of plant growth regulators and plus of ABA, PEG and Maltose. The transition of the PEMs for somatic embryos is one of the critical points observed and diverse morphological abnormalities in somatic embryos were observed. The programmed cell death (PCD) occurs at the beginning of late embryogenesis and not in the early embryogenesis of somatic embryos in *A. angustifolia*. Embryogenic and suspensor cells are eliminated during the beginning of late embryogenesis through autophagic PCD. Arabionogalactanas proteins (AGPs) are time and space markers of cell death in somatic embryos of *A. angustifolia*. Epítopo JIM 13 was detected mainly in suspensor cells which started the degradation process. It was used, as comparative model, the somatic embryo development in *P. abies* to study the effect of ABA in the morphology and MCP during early somatic embryo development aimed to understand the morphologic abnormalities observed in *A. angustifolia*. The ABA treatment during the early embryogenesis induces abnormal morphologies of the somatic embryo and increases the frequency of TUNNEL positive cells. The Fluoridone promotes the embryo differentiation during early embryogenesis in *P. sylvestris*. However late somatic embryos keeping autoreplicative capacity. The profile of protein expression was characterized during the pro-embryonic, early and late phase of somatic embryo development in *A. angustifolia* by the bidimensional eletroforese analysis. Proteins had been identified and diferente level of expression was observed during distinct steps. Vicilin storage protein was observed in somatic embryos at the beginning of late embryogenesis similar with what was observed in zygotic embryogenesis. The expression of gene SERK was evaluated during proembryonic phases and early embryogenesis and its expression was detected, by *in situ* hibridization, in cells of the embryonic apex when the culture medium was supplemented with ABA, PEG and maltose. These results extend the scientific basic and help to understanding the biology of embryonic development in conifers and somatic embryogenesis in *A. angustifolia*. The establishment of somatic embryogenesis protocol to the *A. angustifolia* is an auxilliary tool for the germoplasm conservation and breeding programs for this native conifer.

INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES

1.1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A embriogênese é um processo biológico complexo, altamente organizado e desempenha um papel central no ciclo de vida de um organismo. Ao longo deste processo, uma célula ou zigoto usa todo o seu potencial genético em divisões celulares consecutivas que resultam em um organismo pluricelular (Souter & Lindsey, 2000). O crescimento, divisão e diferenciação celular durante a embriogênese são controlados por mecanismos evolutivamente conservados, tanto em plantas como em animais (Alberts, 2006). Em plantas, camadas múltiplas histogênicas dificultam a observação direta dos eventos morfogenéticos durante a embriogênese. Assim, o estudo dos mecanismos de desenvolvimento embrionário em plantas pode ser complementado por meio de sistemas modelos para a embriogênese *in vitro*. Em angiospermas, a embriogênese somática em cenoura (*Daucus carota*) é conhecida como o sistema modelo mais avançado em termos de estudos do desenvolvimento do embrião (Mordhorst *et al.*, 1997). Em gimnospermas, um sistema modelo de estudos similar vem sendo desenvolvido para *Picea abies* (Linnaeus) Kartern (Filonova *et al.*, 2000b; von Arnold *et al.*, 2002; Bozhkov *et al.*, 2002; Smertenko *et al.*, 2003; Suarez & Bozhkov, 2008).

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze é uma conífera nativa do sul do Brasil e seu gênero é considerado o mais primitivo dentre as coníferas, apresentando padrões embriogênicos diferentes daqueles conhecidos para *Pinus spp* e *Picea spp* (Jonhansem, 1950; Astarita & Guerra, 2000). Muito embora tenham ocorrido avanços notáveis na área de biologia celular e molecular de plantas, no Brasil são ainda escassos os estudos em coníferas e, mais especificamente, no desenvolvimento de técnicas de embriogênese somática e micropropagação. Em *A. angustifolia* os estudos realizados concentram-se principalmente em eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem durante a maturação dos embriões zigóticos e posterior desenvolvimento da semente. Em especial, estudos

relacionados aos parâmetros bioquímicos durante a embriogênese zigótica nesta espécie revelaram um decréscimo no conteúdo endógeno de ácido indol acético (AIA) (Astarita, 2000) e um aumento no conteúdo endógeno de ácido abscísico (ABA) (Silveira, 2004). Astarita *et al.* (2003b,c) observaram a predominância dos aminoácidos Alanina (Ala), ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu) em relação aos demais. Já o conteúdo de poliaminas variou durante a embriogênese zigótica e nas fases iniciais da maturação foram registrados altos teores de putrescina (Put) e spermidina (Spd). Nos estádios tardios da maturação a espermina (Spm) foi a poliamina mais abundante (Astarita, 2000). Fernandes (2001) estudou a síntese e o acúmulo de proteínas de reserva durante o desenvolvimento da semente. Outro estudo reportou a identificação de proteínas que desempenham um importante papel em um estágio específico de desenvolvimento da embriogênese, conhecidas como proteínas LEA (late embryogenesis-abundant) (Silveira, 2004). Ainda, alguns estudos reportaram os fatores associados à embriogênese somática nesta espécie, especialmente para as fases de indução e multiplicação de culturas embriogênicas (Astarita & Guerra, 1998, Guerra *et al.*, 2000, Steiner *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008). Foram também estabelecidas as condições necessárias para o desenvolvimento de embriões somáticos pré-cotiledonares (Santos *et al.*, 2002, Silveira *et al.*, 2002) e mais recentemente embriões somáticos cotiledonares nesta espécie (Steiner, 2005; Steiner *et al.*, 2008).

Em contraste, pouco se conhece sobre os eventos que regulam o desenvolvimento inicial dos embriões somáticos em *A. angustifolia*. Além disso, o desenvolvimento de um protocolo completo para a propagação massal e a conservação desta espécie *in vitro* ainda não foi totalmente estabelecido. Neste sentido, quanto a esta espécie, o presente trabalho pretende aprofundar o estudo dos fatores associados à embriogênese, especialmente no que tange aos parâmetros morfológicos que regulam a embriogênese somática em *A. angustifolia*. Este trabalho visa elucidar o modelo de organização celular durante a

embriogênese para esta espécie relacionando estes eventos com o proteoma e a expressão gênica. Com a finalidade de regular eficientemente a regeneração de plantas por meio da embriogênese somática é importante entender como os embriões somáticos são formados e como este desenvolvimento é influenciado por sinalização endógena ou exógena. Estes estudos poderão servir como base científica permitindo a elucidação de aspectos relacionados à biologia do desenvolvimento gerando processos biotecnológicos aplicados à cultura de tecidos vegetais.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Araucaria angustifolia

A família Araucariaceae está distribuída principalmente no hemisfério sul, ocorrendo na Nova Caledônia, Nova Guiné, Austrália, Nova Zelândia e América do Sul (Setoguchi *et al.*, 1998). Na América do Sul as principais espécies são *A. araucana* e *A. angustifolia*, esta última também conhecida como pinheiro-do-Paraná, pinheiro brasileiro, araucária ou simplesmente pinheiro (Shimizu & Oliveira, 1981). As árvores são monóicas, com 10 - 35 metros de altura e 50 - 120 cm de diâmetro e os troncos são retos e quase cilíndricos (Carvalho, 1994). A casca é grossa e resinosa e a ramificação é racemosa apresentando verticilos quase horizontais. Os verticilos se ramificam em abundantes ramos secundários constituindo as grimpas que vão se adensar no ápice do caule, formando uma copa típica em forma de candelabro, umbela ou corimbo nas árvores adultas (Reitz *et al.*, 1978).

A. angustifolia ocorre naturalmente no Brasil e em pequenas manchas na Argentina (extremo nordeste, na província de Misiones) e no Paraguai (leste, no Departamento de Alto Paraná), ficando localizada entre as latitudes 19°15'S e 31°30'S e entre as longitudes 41°30'W e 54°30'W. No Brasil, a área original, de formato irregular, foi de cerca de

200.000 km². Esta espécie era encontrada principalmente nos Estados do Paraná (40% da superfície), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%). Manchas esparsas eram observadas no Sul de São Paulo (3%), internando-se até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro, em áreas de altitude elevadas (1%) (Carvalho, 1994).

A madeira serrada e laminada da *A. angustifolia* foi, por um longo período, um dos produtos mais importantes na exportação brasileira. Além do uso como madeira, utiliza-se também a resina exsudada principalmente da casca e finalmente, o pinhão é muito apreciado na alimentação humana, de animais domésticos e da fauna silvestre que também são responsáveis pela sua dispersão (Mattos, 1994).

A exploração da *A. angustifolia* se intensificou a partir de 1934, tendo seu auge nas décadas de 50 a 70 com produção estável em torno de 2,8 milhões de metros cúbicos de madeira (Mattos, 1994). No Estado de São Paulo, as reservas foram exauridas entre 1930 e 1940 (Shimizu & Oliveira, 1981) e no Estado do Paraná, em 1977.

A exploração intensa de *A. angustifolia* ao longo do século passado, associada à ausência de programas de melhoramento e conservação fez com que restassem apenas alguns remanescentes, estimados em 2% da área original (Guerra *et al.*, 2002) (Figura 1). Esta espécie foi classificada Pela IUCN “International Union for Conservation of Nature and Natural Resources” como Criticamente em perigo, na lista oficial das plantas brasileiras ameaçadas de extinção (www.iucnredlist.org). Também está incluída na lista das espécies brasileiras ameaçadas de extinção elaborada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) (Instrução Normativa, setembro de 2008).

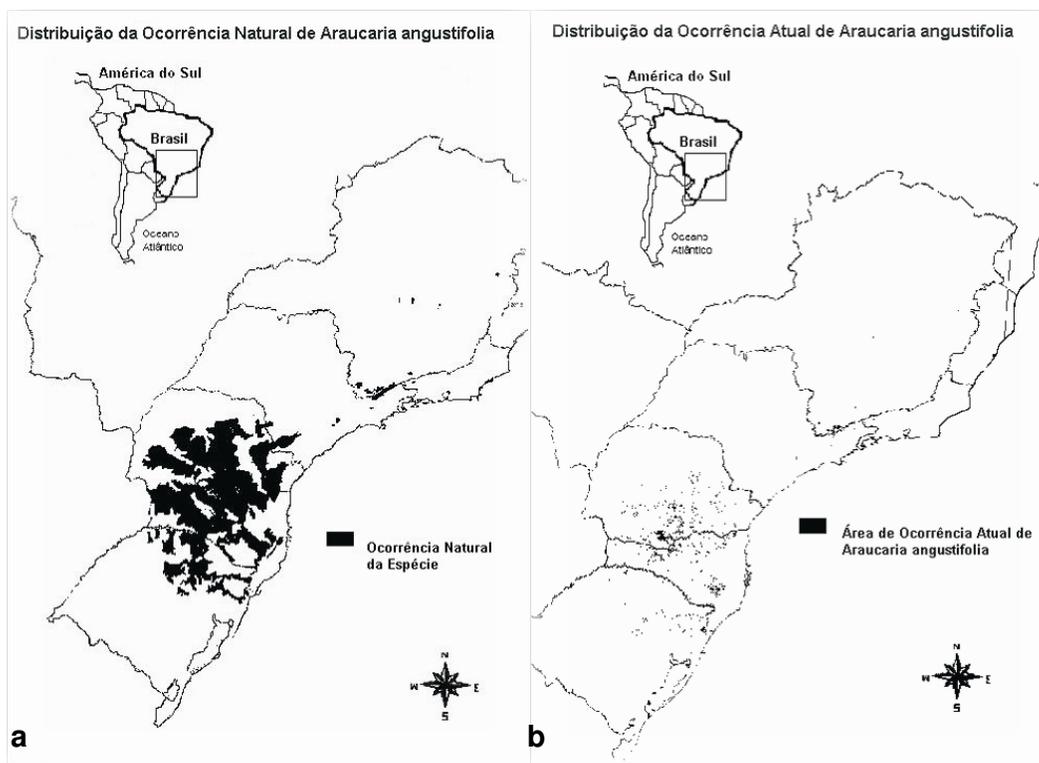


Figura 1. a) Ocorrência natural de florestas com *A. angustifolia*; b) Área de ocorrência atual de *A. angustifolia* (Guerra *et al.*, 2002).

1.2.2. *Pinus sylvestris*

Scot pine (*Pinus sylvestris* Linneaus.) é uma conífera originária do Velho Mundo, mais precisamente da região da Eurásia pertence a família das Pináceas. É amplamente cultivada no norte da Europa e América. O *Pinus spp* pinheiro é a espécie comercialmente mais importante para a produção de madeira nas regiões temperadas e tropicais do planeta. No Brasil, as principais espécies cultivadas são *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*. Muitos deles são utilizados como matéria-prima para a produção da celulose, que é empregada na produção de papel. O pinheiro é uma madeira leve, que possui um rápido crescimento. Além disso, ele também pode ser plantado com uma grande densidade populacional e a queda de suas folhas (acículas) produz um efeito alelopático em plantas de outras espécies, ou seja, as folhas inibem o crescimento de outras plantas (denominadas de plantas

daninhas nas florestas plantadas), o que provoca uma redução na competição por água, luz e nutrientes nas florestas de pinheiros (Edwards & Mason, 2006).

1.2.3. *Picea abies*

A *Picea abies* (Linneaus) Karsten é uma conífera pertencente a família Pinaceas oriunda de regiões frias e montanhosas da Europa do Norte e Central. Esta espécie ocorre em altitudes superiores a 800 m e a forma cônica e coloração verde-escura destacam-se nas florestas de coníferas onde aparece muitas vezes associado ao Pinheiro silvestre (*Pinus sylvestris*). Em muitos países nórdicos é considerada a árvore típica de Natal. É amplamente cultivada na América do Norte e Europa. É também utilizada como planta ornamental em parques e jardins e devido a sua madeira macia e de cor clara, fácil de trabalhar é também muito empregada em construção e na fabricação de móveis e de instrumentos musicais além do uso para produção de celulose. Pode atingir até 70 metros de altura e a sua longevidade encontra-se entre os 300 e os 400 anos. O seu crescimento é rápido quando jovem, diminuindo com a idade. As acículas são em forma de agulha, duras e pontiagudas e têm cerca de 1 - 2 cm de comprimento e não são caducas, mantendo-se por 3 ou 4 anos. As plantas são monóicas e da mesma forma que as demais coníferas apresentam estruturas reprodutivas femininas e masculinas cônicas, denominadas pinhas e estróbilos respectivamente. Quando maduros, são estreitos, longos e acastanhados. As sementes são aladas o que facilita sua dispersão pelo vento. O gênero *Picea* caracteriza-se pelos cones (pinhas) pendentes e folhas com cicatriz alongada quando arrancada (Högberg, 2003).

1.2.4. Embriogênese zigótica em coníferas

Em *A. angustifolia* não foi ainda determinado com exatidão o momento da fertilização. Sabe-se que após a polinização transcorrem 14 meses até a identificação dos poliembrões totalmente formados, imediatamente antes do início da regressão dos embriões subordinados (Mantovani *et al.*, 2004; Steiner, 2005; Anselmi & Zaneti, 2008). Uma característica da embriogênese inicial em Araucariaceae após a fertilização é a ocorrência de divisões nucleares, sendo que o número de núcleos livres varia de 32 a 64 antes do início da formação das paredes celulares. A alongação começa simultaneamente em ambos os grupos de células superiores e inferiores imediatamente após a completa formação da parede celular. O grupo de células inferiores está destinado a formar as células de capa (Cc). O grupo de células superior produz as células do suspensor (Cs), estas células dividem-se longitudinalmente para incrementar em torno de 20 vezes o número de células iniciais. O grupo central de células constitui um grupo de células embriogênicas (Ce) que permanecem inativas até o completo desenvolvimento das células de suspensor (Figura 2) (Burlingame, 1915; Johansen, 1950).

A embriogênese em *A. angustifolia* é caracterizada pela presença de poliembrões (Figura 2), ou seja, ocorre o desenvolvimento de três a quatro proembriões a partir de um óvulo. A poliembrionia é um fenômeno comum nas coníferas, sendo definida pela presença de mais de um embrião nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente, porém apenas um embrião permanece na semente madura. Existem dois tipos de poliembrionia: polizigótica e por clivagem. Em muitos gêneros de *Pinus* ocorrem os dois tipos de poliembrionia, onde primeiramente, por poliembrionia polizigótica, dois ou mais óvulos são fecundados em um mesmo megagametófito, produzindo separadamente pró-embriões, ou seja, cada arquegônio produz um único pró-embrião. Posteriormente, cada pró-embrião formado sofre a poliembrionia por clivagem, gerando até oito pró-embriões.

Em espécies do gênero *Araucaria* foi observada apenas a poliembrião polizigótica (Gifford & Foster, 1989) (Figura 3). Segundo Johansen (1950) a presença de células de capa em *Araucariaceae* pode ter entre outras funções a de prevenção da poliembrião por clivagem.

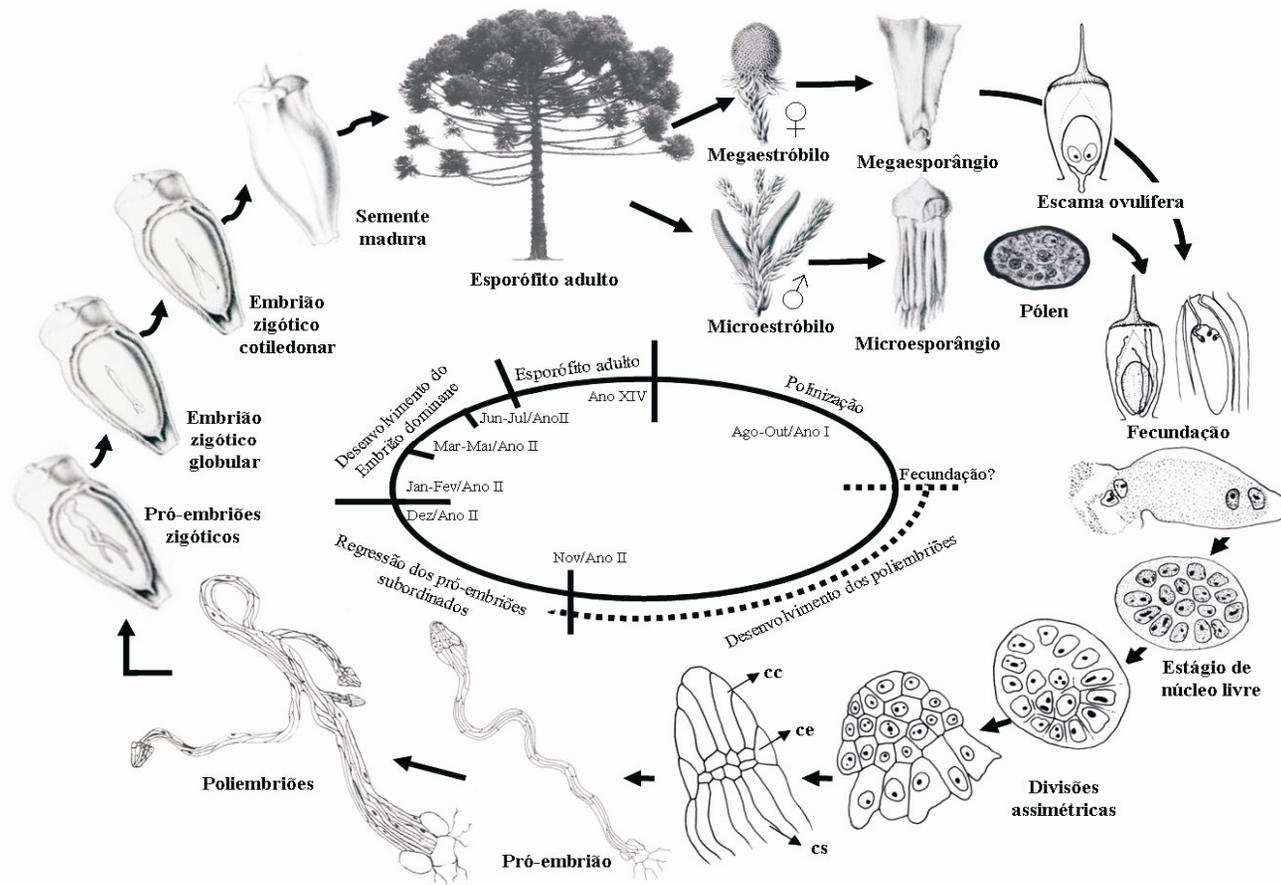


Figura 2. Ciclo de vida de *A. angustifolia*. É uma espécie dióica com estrutura reprodutiva masculina (microestróbilo) constituída por escamas coriáceas arranjadas em forma de espiral e se abrem deixando o pólen livre para ser transportado pelo vento. A estrutura reprodutiva feminina (megaestróbilo) localiza-se no ápice do ramo, e é constituída por inúmeras brácteas coriáceas que contém o óvulo (escama ovulífera). O pólen é depositado em qualquer lugar da escama do cone feminino e inicia a germinação in situ. O período de polinização ocorre nos meses de agosto e setembro. O momento exato da fecundação não foi ainda determinado. Nos estádios iniciais da embriogênese, as divisões nucleares formam de 32 a 64 núcleos livres antes da formação das paredes celulares. Após, a alongação celular inicia simultaneamente em ambos os grupos de células superiores e inferiores imediatamente após a completa formação da parede celular. O grupo de células inferiores forma as células de capa (Cc). O grupo de células superior forma as células do suspensor (Cs). O grupo central de células constitui um grupo de células embriogênicas (Ce). Estes três grupos de células constituem o pró-embrião. Após a polinização, transcorrem 14 meses até a identificação dos poliembríes, caracterizando a poliembrionia, ou seja, a formação de mais de um embrião nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente. Contudo apenas um embrião permanece na semente madura, e a regressão dos embriões subordinados ocorre entre os meses de novembro e dezembro. O desenvolvimento do embrião dominante de *A. angustifolia* ocorre entre os meses de dezembro a junho, passando pelos estádios de desenvolvimento globular, pré-cotiledonar e cotiledonar maduro. Após a germinação, a planta leva em torno de 15 anos para entrar em idade reprodutiva (Guerra *et al.*, 2008).

Em coníferas o desenvolvimento do embrião zigótico ocorre de acordo com o desenvolvimento clássico estabelecido para Conyferophyta por Singh (1978). Três fases podem ser reconhecidas: a) pró-embriônica (estádios antes do alongamento do suspensor) que vai desde a fertilização até o rompimento da arquegônia pelo proembrião; b) embriônica inicial; que compreende os estádios após o alongamento do suspensor e antes do estabelecimento dos meristemas; e c) embriônica final, na qual protoderme e procâmbio são diferenciados e os meristemas apical e radicular são estabelecidos (Johansen, 1950, Haines & Prakash, 1980, von Arnold *et al.*, 2002) (Figura 3). Estudos morfológicos da fase pró-embriônica do desenvolvimento embriônico em *Araucaria spp* sugerem que este gênero é um dos mais primitivos (Haines & Prakash, 1980). Estes autores assinalam (i) a fase de núcleo livre prolongada em que 32-64 núcleos podem estar presentes antes das paredes celulares serem formadas, (ii) o desenvolvimento do suspensor e a presença das células da capa e (iii) a ausência de clivagem do proembrião como as principais diferenças encontradas no desenvolvimento do pró-embrião em *Araucaria spp*, se comparado com outras coníferas consideradas evolutivamente superiores, tais como Cupressaceae, Pinaceae e Taxodiaceae (Haines & Prakash, 1980).

No sul do Brasil o desenvolvimento do embrião dominante de *A. angustifolia* ocorre entre os meses de dezembro a junho, passando pelos estádios de desenvolvimento globular, pré-cotiledonar e cotiledonar maduro (Figura 2) (Steiner, 2005; Guerra *et al.*, 2008). Contudo a partir do mês de março já são encontradas sementes maduras. A diferença nos estádios de maturação dos cones femininos pode ser explicada porque a *A. angustifolia* é uma espécie nativa e não domesticada, possivelmente, com duas ou mais variedades botânicas coabitando uma mesma região (Reitz & Klein, 1966; Mattos, 1994). Nestas variedades, os eventos reprodutivos resultam em diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões. Após a germinação, a planta leva em torno de 15 anos para entrar novamente em idade reprodutiva (Carvalho, 2003).

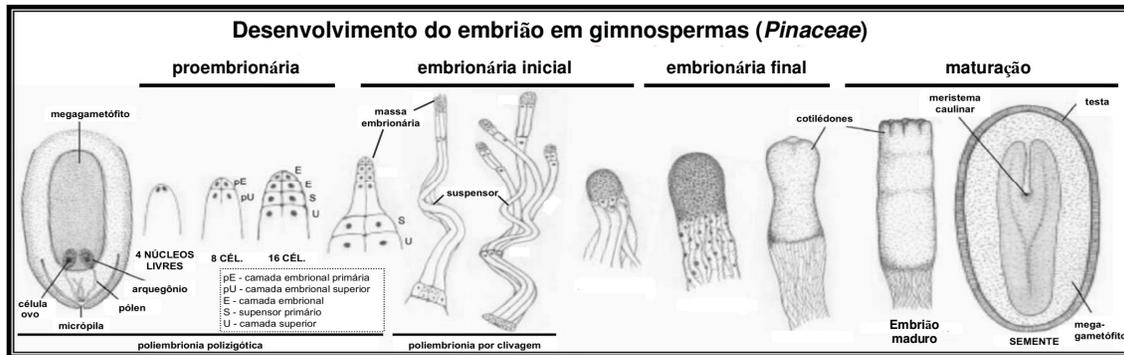


Figura 3. Fases do desenvolvimento do embrião zigótico em gimnospermas (*Piceaceae*). A ilustração não está em escala. Adaptado de von Arnold *et al.* (2002).

1.2.5. Embriogênese somática em coníferas

A embriogênese somática é um processo análogo a embriogênese zigótica, onde uma célula isolada ou um pequeno grupo de células somáticas são os precursores dos embriões (Taurus *et al.*, 1991) e é considerado como exemplo mais robusto da totipotencialidade da célula vegetal. No ano de 2005, quando a revista *Science* completou 125 anos, proeminentes cientistas do mundo inteiro foram convidados a formular as 125 questões mais relevantes da ciência moderna e cujos estudos e avanços se configuram em oportunidades a serem exploradas (*What we don't know: in praise of hard questions, Science, 1 July 2005; Vol. 309. no. 573*). Destas 125 questões foram selecionadas 25 baseadas nos critérios de quão fundamentais e abrangentes elas eram e como suas soluções poderiam impactar outras disciplinas correlatas. Uma destas perguntas foi a seguinte: como uma célula somática pode se transformar em uma planta completa? (Vogel, 2005). Assim, os aspectos relacionados com a totipotencialidade da célula vegetal e sua manifestação morfogênética mais notável, a embriogênese somática assumem ordem de grandeza prioritária para a ciência mundial contemporânea.

O emprego da embriogênese somática pode ter uma série de objetivos que vão desde a obtenção de um modelo referência para estudos básicos em fisiologia e bioquímica

até o uso de biotecnologias vegetais visando a propagação vegetativa em larga escala e a transformação genética (von Arnold *et al.*, 2002). Adicionalmente, a embriogênese somática associada a criopreservação pode ser integrada a programas de melhoramento genético por meio do estabelecimento *in vitro* de bancos de germoplasma e da propagação clonal massal de genótipos de alto valor comercial. Esta técnica também pode se utilizada para a conservação de germoplasma de espécies de interesse ou ameaçadas de extinção (Zoglauer, 2002; Guerra *et al.*, 2008).

Comparativamente às demais técnicas de micropropagação, a embriogênese somática apresenta uma série de vantagens tais como: a) obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); b) o uso de alto grau de automatização, reduzindo assim os custos por unidade produzida; c) sincronização na produção de embriões somáticos com alto grau de uniformização e pureza genética; d) utilização como ferramenta integrada a programas de melhoramento florestal (Guerra *et al.*, 1999; Cyr & Klimaszewska, 2002).

Os embriões somáticos podem se desenvolver diretamente sobre o explante ou, mais freqüentemente, de forma indireta (Williams & Maheswaran, 1986). De acordo com von Arnold *et al.* (2002), a embriogênese somática é composta de cinco etapas: 1) indução de culturas embriogênicas em meios contendo reguladores de crescimento vegetal (auxinas e citocininas); 2) multiplicação das culturas embriogênicas em meios de cultura líquidos ou semi-sólidos, similares aos utilizados na indução; 3) pré-maturação de embriões em meios de cultura sem a presença de fitorreguladores, 4) maturação dos embriões em meios de culturas suplementados com ABA e/ou agentes osmóticos; 5) conversão em plantas em meios de cultura isentos de fitorreguladores.

A indução pode ser alcançada ao se submeter um tecido gamético ou somático à condições específicas de cultura (Guerra *et al.*, 2000). A freqüência de indução de culturas

embriogênicas em coníferas é afetada por vários fatores e, entre eles, destaca-se a influência do genótipo, o efeito do estágio de desenvolvimento do explante e o potencial indutivo do meio de cultura, assim como a fonte de carboidratos (sacarose, maltose e lactose), a composição e teores de nitrogênio, os elementos minerais, os agentes geleificantes, o pH e a concentração e tipo dos fitorreguladores no meio de cultura (Li *et al.*, 1998; Guerra *et al.*, 2000). Culturas poliembriogênicas de coníferas são normalmente mantidas em meios de cultura similares àqueles utilizados na fase de indução, porém com redução nas concentrações de fitorreguladores (von Arnold *et al.*, 2002).

Durante a etapa de maturação os embriões somáticos sofrem várias mudanças morfológicas e bioquímicas (von Arnold *et al.*, 2002). Quando os embriões são submetidos a etapa de maturação, a proliferação celular diminui, iniciando-se o processo de diferenciação e acúmulo de materiais de reserva como açúcares, proteínas e lipídios (von Arnold *et al.*, 1995). Durante a maturação dos embriões somáticos de coníferas, quatro estádios de desenvolvimento podem ser distinguidos (Tautorus *et al.*, 1991). 1) o embrião somático apresenta as células de suspensor translúcidas; 2) o embrião somático é caracterizado pelos longos suspensores acoplados a um ápice embrionário denso e proeminente; 3) o embrião somático possui pequenos cotilédones emergentes; 4) plântula verde com cotilédones alongados com hipocótilo e radícula desenvolvidos.

Durante a última década foram observados muitos avanços no conhecimento da embriogênese somática em coníferas (Jain *et al.*, 1995, von Arnold *et al.*, 2002). Entretanto, a maturação de embriões somáticos e a subsequente regeneração de plantas ainda são etapas de difícil elucidação para muitas espécies, como é o caso da *A. angustifolia*. Diversos estudos têm apresentados protocolos otimizados da maturação de embriões somáticos em coníferas, por meio da utilização do ABA, agentes osmóticos e carvão ativado (Jiménez *et al.*, 2005, García Martín *et al.*, 2005, Langhansová *et al.*,

2004). Estes componentes influenciaram o conteúdo endógeno hormonal dos embriões somáticos refletindo na qualidade morfológica e fisiológica dos embriões somáticos formados.

Embriogênese somática em coníferas foi primeiramente estabelecida em *Picea abies* Hakman & von Arnold (1985) and Chalupa, (1985). Desde então aspectos básicos e aplicados do protocolo de embriogênese somática em *P.abies* tem sido estudados, incluindo MCP (Bozhkov *et al.*, 2002, 2004, 2005; Helmersson *et al.*, 2008), organização do ciotesqueleto (Smertenko *et al.*, 2003), balanço hormonal e transporte de auxinas (Larsson *et al.*, 2008ab, Hakman *et al.*, 2009) e aspectos aplicados do protocolo (Durzan, 2008). Atualmente o modelo de desenvolvimento dos embriões somáticos de *P. abies* é aceito para estudos de embriogênese em coníferas. O estabelecimento deste modelo é resultado da avaliação das rotas de desenvolvimento do embrião somático realizado por meio de monitoramento microscópico (tracking) (Filonova *et al.*, 2000a). Em *P. abies*, a indução das culturas embriogênicas ocorre a partir de embriões zigóticos em meio de cultura suplementado com fitorreguladores (auxinas e citoconinas). As culturas embriogênicas proliferam-se na forma de MPEs na presença de fitorreguladores (Figura 4A), e nesta fase podem ser criopreservadas. Os embriões iniciam o desenvolvimento tornando-se individualizados após a retirada dos fitorreguladores do meio de cultura, caracterizando a fase de pré-maturação (Figura 4B). A embriogênese final e maturação dos embriões somáticos ocorre em meio de cultura suplementado com ABA (von Arnold *et al.*, 2002, 2005) (Figura 4C). Após, os embriões somáticos são dessecados e posteriormente germinados em meio de cultura isento de fitorreguladores. Quando o sistema radicular estiver bem desenvolvido com presença de raízes laterais as plantas provenientes de embriões somáticos podem ser aclimatizadas *ex vitro* (Högberg, 2003).

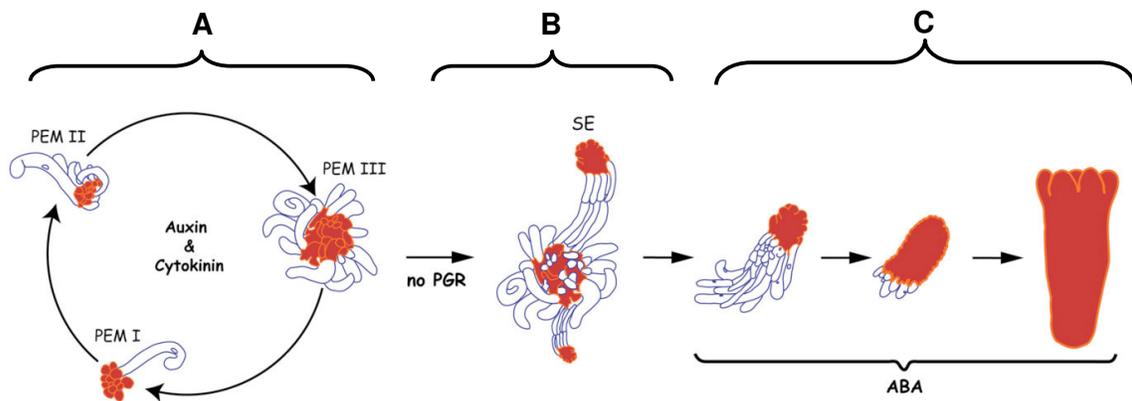


Figura 4. Modelo de desenvolvimento dos embriões somáticos de *Picea abies*. A) fase pré-embriônica, B) embriogênese inicial, C) embriogênese final (Adaptado de von Arnold *et al.*, 2005)

Os primeiros artigos de embriogênese somática com *Pinus spp* foram originados a partir de embriões zigóticos maduros em *P. lambertiana* (Gupta & Durzan, 1986) e *P. taeda* (Gupta & Durzan, 1987). O primeiro protocolo completo de embriogênese somática em *P. sylvestris* foi descrito por Keinonen-Mettälä *et al.*, (1996). As etapas estabelecidas para esta espécie foram similares aquelas descritas para *P. abies* incluindo indução, proliferação, pré-maturação, maturação seguido de germinação e desenvolvimento da planta. A indução das culturas embriogênicas é estabelecida a partir de embriões zigóticos imaturos (Park *et al.*, 2006) na presença de fitorreguladores. Também foi observada a indução de culturas embriogênicas de *P. sylvestris* na ausência de fitorreguladores no meio de cultura (Lelu *et al.*, 1999). Em *P. abies* após a etapa de indução, quando as culturas embriogênicas se proliferam como MPEs na presença de fitorreguladores, a retirada destes do meio de cultura durante a etapa de pré-maturação é suficiente para iniciar o desenvolvimento do embrião somático. Ao contrário, em *P. sylvestris*, os embriões continuam a proliferar-se mesmos após serem submetidos durante longos períodos ao

meio de cultura isento de fitorreguladores. A contínua proliferação dos embriões iniciais em *P. sylvestris* é uma limitação para o estabelecimento do protocolo completo de embriogênese somática nesta espécie. Os estádios finais da embriogênese requerem a suplementação de ABA e agentes osmóticos no meio de cultura. A qualidade dos embriões somáticos maduros é baixa indicada pela baixa frequência de germinação observada (von Arnold, comunicação pessoal).

Em *A. angustifolia* foram estabelecidas às condições básicas para a indução de culturas embriogênicas a partir de embriões zigóticos imaturos (Astarita & Guerra, 1998; Astarita & Guerra, 2000; Guerra *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002) (Figura 4). A proliferação das culturas ocorre em meio suplementado com fitorreguladores ou isento deles (Steiner *et al.*, 2005, 2007) (Figura 5, ciclo A). Foi observado que durante a etapa de proliferação a organização morfológica das culturas foi influenciada pela fonte de carbono adicionada ao meio de cultura (Steiner *et al.*, 2005). Quando as culturas são diretamente submetidas ao ABA e agentes osmóticos, embriões somáticos cotiledonares de *A. angustifolia* também foram obtidos (Steiner, 2005; Steiner *et al.*, 2008) (Figura 5, ciclo B), porém o processo de maturação e regeneração em plantas ainda necessita ser otimizado.

Diversos autores reportam que a otimização do meio de cultura durante as fases iniciais da embriogênese pode aumentar o número e a qualidade dos embriões somáticos formados (Stasolla *et al.*, 2002, Stasolla & Yeung, 2003). Adicionalmente, culturas embriogênicas que contêm um alto grau de organização normalmente necessitam menor tempo de exposição ao ABA e agentes osmóticos o que permite um incremento na taxa de conversão dos embriões (Bozhkov *et al.*, 2002).

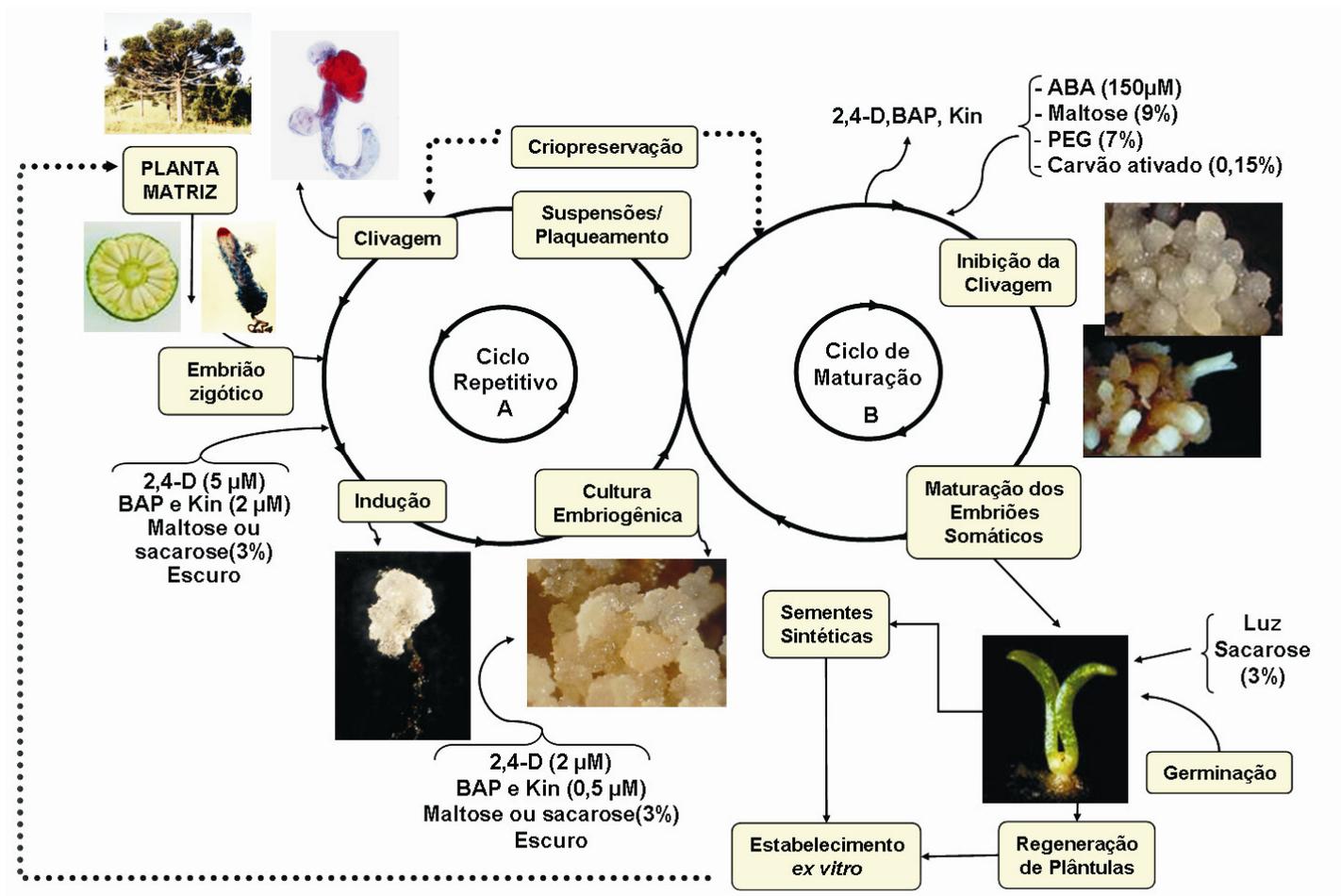


Figura 5. Ciclos para a indução e maturação de embriões somáticos de *A. angustifolia*. A) Ciclos repetitivos de divisão celular em meio de cultura BM suplementado ou não com 2,4- D (5 µM), BAP e Kin (2 µM cada); B) Maturação dos embriões somáticos em meio de cultura BM suplementado com PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150µM) (Steiner, 2005).

1.2.6. Análise proteômica em plantas

Proteoma refere-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo num dado momento ou condição (Baginski, 2009). Já a proteômica é a ciência que estuda sistematicamente um proteoma (Park, 2004), permitindo avaliações quantitativas e qualitativas de proteínas que atuam no desenvolvimento de um organismo (Chen & Harmon, 2006). Conseqüentemente, a identificação de proteínas expressas diferencialmente permite a associação destes polipeptídeos com diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, tecidos e órgãos (Korkumat *et al.*, 2006). A análise proteômica, que é uma das formas de análise de proteínas em plantas, consiste principalmente na separação das proteínas através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, identificação e isolamento do gel, digestão e posterior identificação da proteína por espectrometria de massa e cruzamento com os bancos de dados disponíveis (Park, 2004; Cánovas *et al.*, 2004).

Dentre as dificuldades encontradas está a etapa de extração e preparação da amostra (Nogueira, 2007) uma vez que em plantas estão presentes uma série de compostos que dificultam a análise protéica como: proteases, compostos fenólicos e metabólitos secundários que têm efeito deletério durante o processo de extração de proteínas (Newton *et al.*, 2004). Outra dificuldade encontrada na análise proteômica em plantas é disponibilidade limitada da informação do genoma; assim técnicas que incluam o acesso a seqüência de aminoácidos das proteínas são requeridas para incrementar a cobertura em experimentos de proteômica (Baginski *et al.*, 2009). Apesar disso, nos últimos anos a análise proteômica tem sido amplamente empregada no estudo de vários processos do desenvolvimento vegetal, incluindo aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos embriogênese assim como o completo desenvolvimento da semente até a germinação

(Nogueira, 2007). Foram estudados a germinação e dormência das sementes em *Arabidopsis thaliana* (Gallardo *et al.*, 2001; Chibani *et al.*, 2006), *Medicago truncatula* (Gallardo *et al.*, 2003, 2007), desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos em *Picea glauca* (Lippert *et al.*, 2005), *Ocotea catharinensis* (Moraes, 2006), *Medicago truncatula* (Imim *et al.*, 2005, 2008), *Manihot esculenta* (Baba *et al.*, 2008) e arroz (Tian *et al.*, 2009). Estes estudos caracterizaram proteínas associadas com os diversos estádios da embriogênese permitindo assim que a identificação de proteínas específicas das fases do desenvolvimento da embriogênese zigótica, além de contribuir para o entendimento do desenvolvimento da semente, possa ser usada como marcador bioquímico para acompanhamento e desenvolvimento da embriogênese somática.

O uso de proteínas como marcadores das etapas da embriogênese somática tem sido descrito para várias espécies (Hakman, 1993; Misra, 1995, Lippert *et al.*, 2005) com o objetivo de relacionar os estádios embriogênicos com alterações nos perfis protéicos. Estes estudos têm sido realizados principalmente em sementes de angiospermas, tanto em mono como em dicotiledôneas (Gifford, 1988). Segundo Bewley & Black (1994), as proteínas de reserva são sintetizadas em altos níveis em tecidos específicos e em certos estádios de desenvolvimento da semente. Em algumas coníferas, como *P. abies*, foi demonstrado que o padrão de acúmulo de proteínas de reserva entre embriões zigóticos e somáticos é similar, podendo então, as proteínas de reserva serem utilizadas como marcadores moleculares do padrão de desenvolvimento para aquela espécie (Hakman, 1993).

Durante o desenvolvimento da semente ocorrem diversas mudanças que consistem no acúmulo de substâncias de reserva que, provavelmente, servem para proteger os tecidos da desidratação, tais como oligossacarídeos, açúcares, proteínas de reserva e proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Bewley & Black, 1994). Como resposta à ação do ABA e do estresse osmótico que ocorrem no embrião maduro, foram identificadas as

proteínas tipo deidrininas e tipo LEAs (Campalans *et al.*, 2000), e que têm sido utilizadas como marcadores das diferentes fases desses processos. Em diversas coníferas, os padrões protéicos vêm sendo utilizados como marcadores da competência das culturas embriogênicas, ocorrendo várias diferenças nos perfis protéicos entre tecidos embriogênicos e não embriogênicos (Attree & Fowke, 1993; Kormuták & Vooková, 1997; Garello *et al.*, 2000). Em *A. angustifolia* estudos na área de análise proteômica foram realizados para os diferentes estádios da embriogênese em que foram identificadas três proteínas expressas diferencialmente durante a embriogênese zigótica, correspondendo a uma AtSAC4, uma proteína LEA e uma proteína de reserva (Silveira *et al.*, 2008). Recentemente Balbuena *et al.* (2009) realizou um estudo de seis diferentes estádios de desenvolvimento do embrião zigótico e identificou 66 proteínas únicas relacionadas aos distintos estádios incluindo proteínas relacionadas ao metabolismo assim como proteínas de reserva.

1.2.7. Expressão de genes marcadores

Os processos moleculares que governam a competência para a embriogênese em células vegetais ainda não estão totalmente esclarecidos (Mordhost *et al.*, 1997). A transição das células somáticas para o estado embrionário envolve um processo complexo que inclui a dediferenciação, reativação celular, divisão e reprogramação do metabolismo e desenvolvimento (Fehér *et al.*, 2003). Um dos primeiros genes descritos como envolvidos na expressão da competência celular foi o “Somatic Embryogenesis Receptor Kinase” (*DcSERK*) (Schmidt *et al.*, 1997), em cultura de tecidos de *Daucus carota*, e que codifica uma proteína transmembrana do tipo receptor, com um domínio extracelular rico em leucina (LRR) e um outro intracelular, com função de proteína-quinase (LRR-RLK). Este gene pertence a uma grande família de receptores aparentemente conservados

evolutivamente em vegetais (Becraft, 1998). A existência de cDNAs homólogos entre gimnospermas e angiospermas sugere que mecanismos conservados e similares regulam a embriogênese vegetal (Cairney *et al.*, 2006). Genes homólogos aos de angiospermas foram observados quando foi estudado o efeito do polietilenoglicol (PEG) na expressão gênica durante a maturação de embriões somáticos de *Picea glauca* (Stasolla *et al.*, 2003).

Células competentes de *D. carota* para o desenvolvimento de embriões somáticos expressaram, o gene repórter da luciferase sob controle dos elementos regulatórios do *DcSERK* sugerindo assim, que este gene seja um marcador para células competentes individuais (Schmidt *et al.*, 1997). Assim como o *DcSERK* em *D. carota*, a expressão dos homólogos do *SERK* em *Arabidopsis* (*AtSERK1*) (Hecht *et al.*, 2001), *Dactylis glomerata* (*DgSERK*) (Somleva *et al.*, 2000) e *Medicago trunculata* (*MtSERK1*) (Nolan *et al.*, 2003), foi observada em células de calos que adquiriram competência. A expressão destes homólogos pode estar também envolvida no processo que confere a competência embriogênica, podendo ser um componente da via de sinalização da embriogênese. Assim, células competentes podem conter um receptor inativo, que é ativado na presença algum fator que aciona o programa genético da embriogênese (Fehér *et al.*, 2003; Nolan *et al.*, 2003). Em *Arabidopsis thaliana* foi observada que a expressão do *AtSERK* precede e coincide com os estádios iniciais da embriogênese somática. Estes autores observaram a expressão deste gene não somente em células pequenas e/ou grupos de células competentes, mas também em tecidos pró-cambiais do embrião em desenvolvimento (Salaj *et al.*, 2008). Em agregados celulares de *O. catharinensis* cultivados em diferentes meios de cultura, foram associados a expressão do gene *SERK* com a competência à embriogênese (Santa-Catarina *et al.*, 2004a). Neste trabalho ficou demonstrada a indução da expressão do gene *SERK* por auxinas bem como a possibilidade da utilização da

expressão do gene SERK como um marcador para o reconhecimento de de células competentes.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo geral

Estudar comparativamente o padrão de organização morfológica e a histodiferenciação durante o desenvolvimento inicial do embrião somático em *A. angustifolia*, *Pinus sylvestris* e *Picea abies* assim como o perfil de proteínas e o padrão de expressão do gene SERK durante a embriogênese somática em *A. angustifolia*.

1.3.2. Objetivos específicos

- a) Identificar a origem e os padrões de organização morfológica e a histogênese durante o desenvolvimento inicial dos embriões somáticos de *A. angustifolia*; através de análises morfológicas e histoquímicas;
- b) Caracterizar o processo de morte celular programada visando estabelecer a sua relação com a formação dos embriões somáticos em *A. angustifolia*;
- c) Avaliar o padrão de acúmulo de proteínas arabinogalactanas durante o desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. angustifolia* por meio de imunocitoquímica;
- d) Analisar o efeito do ABA e de seu inibidor fluoridone na morfologia do embrião somático durante os estádios iniciais e na morte celular programada de *Pinus sylvestris* e *Picea abies* buscando avaliar comparativamente a embriogênese em *A. angustifolia*;
- e) Caracterizar o perfil de expressão de proteínas durante os diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*.

- f) Monitorar a expressão dos homólogos do gene SERK em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas a diferentes tratamentos durante a etapa de proliferação e maturação.

Os resultados referentes aos objetivos específicos estão dispostos na forma de três capítulos os quais têm uma breve introdução específica adicional, seguida de material e métodos, resultados e discussão, conclusões e bibliografia. O capítulo I contempla os objetivos específicos (a-d), o capítulo II contempla o objetivo específico (e) e o capítulo III contempla o objetivo específico (f).

CAPÍTULO I

**Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia*, *Pinus sylvestris* e *Picea abies*:
análises morfológicas, histoquímicas e subcelulares**

2.1. INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é um processo análogo a embriogênese zigótica, onde uma célula isolada ou um pequeno grupo de células somáticas são os precursores dos embriões (Tautorus *et al.*, 1991). Este processo é considerado como exemplo mais robusto da totipotencialidade da célula vegetal (Vogel, 2005). Usualmente o protocolo de embriogênese somática é composto de cinco principais etapas: 1) indução de culturas embriogênicas em meios contendo fitorreguladores (auxinas e citocininas); 2) proliferação culturas embriogênicas em meios de cultura líquidos ou semi-sólidos, similares aos utilizados na indução; 3) pré-maturação em meios de cultura sem suplementação para fitorreguladores, 4) maturação dos embriões em meios de culturas suplementados com ABA e ou agentes osmóticos; 5) conversão em plantas em meios de cultura isentos de fitorreguladores (von Arnold *et al.*, 2002; Durzan, 2008).

Em *A. angustifolia* foram estabelecidas às condições básicas para a indução e proliferação das culturas embriogênicas a partir de embriões zigóticos imaturos (Astarita & Guerra, 1998; Astarita & Guerra, 2000; Guerra *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002). Entretanto, a etapa de pré-maturação não foi adequadamente estabelecida até o momento para esta espécie, contudo observou-se que o grau de organização morfológica das culturas foi influenciado pela fonte de carbono adicionada ao meio de cultura durante a proliferação (Steiner *et al.*, 2005). Após oitenta dias, em meio de cultura de maturação suplementado com ABA, foram observados os estádios tardios de desenvolvimento dos embriões similares aqueles observados em embriões zigóticos. Contudo estes embriões foram observados em baixa frequência e de forma dessincronizada (Steiner, 2005). Diversos aspectos bioquímicos foram estudados em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* incluindo a suplementação de poliaminas ao meio de cultura, metabolismo de óxido nítrico e quantificação de proteínas durante a maturação visando explicar a baixa

frequência de embriões somáticos maduros e a ausência de germinação (Silveira *et al.*, 2006, Steiner *et al.*, 2007, Silveira *et al.*, 2008, Steiner *et al.*, 2008). Contudo, até o momento poucos estudos foram realizados para investigar os aspectos morfológicos do embrião somático de *A. angustifolia*, especialmente durante as fases iniciais do desenvolvimento.

Durante a embriogênese somática, a pré maturação é a etapa em que ocorre a transição das massas pró-embriônicas (MPEs) para embriões somáticos iniciais antes de estes serem expostos ao meio de cultura de maturação suplementado com ABA. Isto, em geral, é promovido pela retirada de fitorreguladores (auxinas e citocininas) do meio de cultura onde a diferenciação inicial dos embriões é acompanhada pela reorganização do citoesqueleto e uma massiva frequência de morte celular programada (MCP) (Bozhkov *et al.*, 2002, Smertenko *et al.*, 2003). A MCP foi estudada em plantas por Havel & Durzan, (1996ab), Lam *et al.* (2001) e Gunawardena *et al.* (2004) que reforçaram o importante papel deste processo na xilogênese, reprodução, senescência, defesa contra patógenos e a embriogênese. *Taxus brevifolia*, assim como outras coníferas apresentam MCP em diferentes estádios de desenvolvimento durante a partenogênese diplóide e embriogênese inicial (Bell, 1994; Havel & Durzan, 1996a; Havel & Durzan, 1996b; Durzan, 2008).

Recentes estudos demonstraram que a inibição do transporte polar de auxina durante os estádios iniciais da embriogênese em *P. abies* levou a um incremento endógeno de AIA, anormal morfologia dos embriões e decréscimo na frequência de MCP resultando no desenvolvimento embriões somáticos maduros anormais (Larsson *et al.*, 2008; Hakman *et al.*, 2009). Já havia sido previamente demonstrado que a MCP por autofagia regula a formação do corpo de embriões somáticos e zigóticos em coníferas e que a perturbação deste processo leva ao surgimento de aberrações embriogênicas (Filonova *et al.*, 2000a; Smertenko *et al.*, 2003). Este processo controla o balanço adequado entre células do

suspensor e embrionárias o qual é requerido durante a embriogênese vegetal (Helmerson *et al.*, 2008; Larson *et al.*, 2008ab). Em *Picea abies* a inibição da MCP levou a uma supressão da diferenciação de embriões e a eliminação de células do suspensor causando a inibição na maturação (Helmerson *et al.*, 2008). Assim, foram feitas correlações positivas entre a frequência de formação de embriões somáticos e a fragmentação de DNA, sugerindo que a MCP em culturas embriogênicas e a formação de embriões somáticos são processos interligados (Filonova *et al.*, 2000a). Em *A. angustifolia* não foi ainda estudado como a frequência de MCP durante as diferentes etapas da embriogênese regula a morfologia dos embriões e a transição para as etapas finais do desenvolvimento.

Considerando que embriogênese somática é um processo contínuo e interligado e que o sucesso da cada etapa é dependente da eficiência dos eventos ocorridos da etapa anterior, pode-se sugerir a hipótese que a baixa frequência de embriões somáticos maduros em *A. angustifolia* pode ser atribuída às deficiências nos controles relacionados com a etapa de pré-maturação. Assim o presente trabalho procurou avaliar e descrever detalhadamente as etapas da embriogênese somática nesta espécie, incluindo as anormalidades morfológicas observadas durante os estádios iniciais do desenvolvimento do embrião. Examinou-se a distribuição espacial e temporal de proteínas arabinogalactanas (AGPs) e da MCP descrevendo aspectos ultraestruturais desta última durante o desenvolvimento do embrião. Adicionalmente foi utilizado, como modelo comparativo, o sistema de embriogênese somática em *P. abies* para estudar o efeito do ABA na morfologia de embriões em estádios iniciais do desenvolvimento e na MCP visando melhor entender as anormalidades observadas em *A. angustifolia*. Demonstrou-se ainda que o Fluoridone, um inibidor endógeno de ABA aumenta o número de embriões somáticos em estádios iniciais do desenvolvimento em *P. sylvestris*. No presente capítulo sugere-se que a principal limitação do protocolo de embriogênese somática em *A.*

angustifolia não reside na etapa de maturação e sim na transição das MPEs para embriões em estágio iniciais do desenvolvimento, sendo indicados procedimentos que podem ser essenciais para o estabelecimento da etapa de pré-maturação nesta espécie.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Cultivo *in vitro*

Todos os experimentos com *A. angustifolia* foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os experimentos com *P. abies* e *P. sylvestris* bem como o teste de TUNEL foram realizados no Departamento de Plant Biology and Forest Genetics da Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences na Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) em colaboração com Profa. Dra. Sara von Arnold.

2.2.2. Indução e proliferação das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*

As culturas embriogênicas utilizadas nos experimentos foram induzidas a partir de embriões zigóticos imaturos de *A. angustifolia* provenientes de uma população natural do município de Bom Retiro – SC de acordo com a metodologia descrita por Steiner *et al.* (2005). Foi utilizado o meio de cultura BM (Gupta e Pulman, 1991) suplementado com L-glutamina (1 g.L⁻¹), mio-inositol (1 g.L⁻¹) e caseína hidrolisada (0,5 g.L⁻¹), sacarose (3% p/v). Foram induzidas culturas em meio suplementados com 2,4-D (5µM), BAP e Kin (2µM cada) ou ainda isento deles. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH (0,5N) e HCl (0,5N) antes da adição do Phytigel[®] (2,5 g.L⁻¹). Os compostos orgânicos foram filtro-esterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem a 121 °C por 15 min. Os explantes foram inoculados em placas de petri (90 x 10 mm)

contendo 25 mL de meio de cultura. Depois de inoculadas as placas foram incubadas no escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ até o final do experimento.

Culturas induzidas foram proliferadas por meio de subcultivos em intervalos de 20 dias para o mesmo meio de meio de cultura utilizado na etapa de indução com exceção dos fitorreguladores os quais foram reduzidos para $\frac{1}{2}$ da concentração utilizada inicialmente. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0,5N) e HCl (0,5N) antes da adição do phytigel (2,5 g/L-1). As culturas foram mantidas no escuro a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ até o final do experimento. Esta etapa foi realizada visando a obtenção de culturas embriogênicas para o estabelecimento das etapas posteriores de maturação. Durante esta etapa também foi caracterizado o processo de indução nesta espécie por meio de análise morfológica.

2.2.3. Maturação das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*

Durante a etapa de maturação as culturas embriogênicas foram inoculadas em meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) suplementado com PEG 4000 (7% p/v), maltose (9% p/v), carvão ativado $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e ABA (150 μM). A L-glutamina (1 g.L^{-1}), mio-inositol (1 g.L^{-1}), caseína hidrolisada ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) e o ABA foram filtro-esterilizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0,5N) e HCl (0,5N) antes da adição do phytigel ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$). As culturas foram inoculadas em placas de petri (90 x 10 mm) contendo 25 mL de meio de cultura e mantidas no escuro a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ até o final do experimento. Foram realizadas análises morfológicas, histoquímicas, subcelulares e o teste de TUNEL durante esta etapa.

2.2.4. Proliferação das culturas embriogênicas de *P. abies*

Culturas embriogênicas 28:05B de *P. abies* foram proliferadas em meio de cultura LP½ suplementado com 2,4-D (10µM), BAP (4,4 µM) de acordo com os procedimentos estabelecidos por Filonova *et al.* (2000a). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0,5N) e HCl (0,5N) antes da adição do phytigel (2,5 g/L⁻¹). As culturas foram subcultivadas em intervalos de 15 dias e mantidas no escuro a temperatura de 25 ± 2 °C. Esta etapa foi realizada visando a obtenção de culturas embriogênicas para o estabelecimento das etapas posteriores de cultivo desta espécie

2.2.5. Pré-maturação das culturas embriogênicas de *P. abies*

Normalmente para estimular a diferenciação de embriões para os estádios iniciais do desenvolvimento a partir das MPEs, as culturas são transferidas para o meio de cultura LP½ líquido isento de fitorreguladores por uma semana. Neste experimento o meio de cultura líquido nesta etapa foi suplementado com ABA (0, 10, 20, 30 e 60 µM) por uma semana visando avaliar o efeito deste regulador na morfologia durante a diferenciação inicial dos embriões somáticos e na MCP. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0,5N) e HCl (0,5N). As culturas foram mantidas em agitador horizontal (40 rpm) no escuro a temperatura de 25 ± 2 °C. Foi quantificado o número de embriões em estádios iniciais do desenvolvimento de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.10.

2.2.6. Maturação dos embriões somáticos de *P. abies*

Para o desenvolvimento dos embriões somáticos em estádios tardios e maturação as cultura foram transferidas para o meio de cultura sólido BMI-S1 suplementado com ABA (30 µM) de acordo com Larsson *et al.* (2008). Durante esta etapa as culturas foram subcultivadas a cada 2 semanas. As culturas foram mantidas em no escuro a temperatura

de 25 ± 2 °C durante 8 semanas. Foi avaliado o número e a morfologia dos embriões somáticos em estágio inicial do desenvolvimento de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.10.

2.2.7. Proliferação das culturas embriogênicas de *P. sylvestris*

Culturas embriogênicas 12:12 e 3:10 de *P. sylvestris* foram proliferadas em meio de cultura DCR suplementado com 2,4-D (10 μ M), BAP (4,4 μ M) de acordo com os procedimentos descritos por Burg *et al.* (2007). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH (0,5N) e HCl (0,5N) antes da adição do phytigel (2,5 g/L⁻¹). As culturas foram subcultivadas em intervalos de 15 dias e mantidas no escuro a temperatura de 25 ± 2 °C durante todo o período de cultivo. Esta etapa foi realizada visando a obtenção de culturas embriogênicas para o estabelecimento das etapas posteriores de cultivo desta espécie

2.2.8. Pré-maturação das culturas embriogênicas de *P. sylvestris*

Em *P. sylvestris* para estimular a diferenciação de embriões para os estádios iniciais do desenvolvimento a partir das MPEs, as culturas foram transferidas para o meio de cultura DCR semi sólido isento de fitorreguladores por duas semanas. Neste experimento o meio de cultura DCR foi suplementado com Fluoridone (0, 10, 15, 30 e 60 μ M) durante duas semanas visando avaliar o efeito deste fitorregulador no número e morfologia dos embriões somáticos em estádios iniciais do desenvolvimento. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH (0,5N) e HCl (0,5N). As culturas foram mantidas no escuro a temperatura de 25 ± 2 °C até o final do experimento.

2.2.9. Maturação dos embriões somáticos de *P. sylvestris*

Para o desenvolvimento dos embriões somáticos em estádios tardios e maturação as culturas foram transferidas para o meio de cultura sólido DCR suplementado com maltose (6% p/v), PEG (7% p/v) e ABA (60 μ M). Durante esta etapa as culturas foram subcultivadas a cada 2 semanas. As culturas foram mantidas em no escuro a temperatura de 25 ± 2 °C até o final do experimento. Foram quantificados número de embriões somáticos em estádios iniciais e finais do desenvolvimento.

2.2.10. Avaliação morfológica

A morfologia das culturas embriogênicas durante as diferentes etapas da embriogênese somática em *A. angustifolia*, *P. abies* e *P. sylvestris* foram monitoradas semanalmente sendo realizada a contagem dos embriões aplicando o monitoramento microscópico (tracking). Combinado a dupla coloração com azul de evans (0,1 % p/v) e carmim acético (2 % p/v) segundo descrito por Durzan (1988).

2.2.11. Detecção de fragmentação DNA *in situ* (TUNEL teste)

As amostras de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* e *P. abies* foram submetidas a detecção da fragmentação nuclear *in situ* (TUNEL (*Terminal deoxinucleotidil transferase dUTP(Uracil) Nick End Labeling*); *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red, Roche, Mannheim, Germany*) considerado um eficiente marcador dos estádios tardios da MCP em sistemas biológicos (Filonova *et al.*, 2000b, Smertenko *et al.*, 2003). As amostras foram processadas segundo a metodologia descrita por Larsson *et al.* (2008). Culturas embriogênicas foram fixadas em paraformaldeído (4% w/v) em tampão NaH_2PO_4 0,1M (pH 7.0) por 1 h e 20 min sendo em seguida lavadas em água destilada. Após, as amostras foram permeabilizadas com Proteinase K (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) em 0,1 M Tris-HCL por 15 min. As amostras foram incubadas com 100 μL na mistura de TUNEL por 1 h e 20 min. a 37

°C. Após, para a coloração do núcleo as amostras foram tratadas com DAPI de acordo com a metodologia descrita por (Filonova *et al.*, 2000ab). A frequência de células positivas ao TUNEL foi baseada no número total de núcleos corados com DAPI em cada embrião. No total foram analisados 2500 núcleos. Foi considerada células positivas ao TUNEL quando esta apresentou fragmentação nuclear.

2.2.12. Microscopia ótica (MO)

A histogênese e a organização celular foram monitoradas nas fases de indução, proliferação e maturação. Para a análise histológica as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,2M) pH 7,3, na proporção de 1:1, durante 24 h, à temperatura de 4 °C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, duas vezes, por quinze min (Bouzon, 1993) e desidratado em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). A pré-infiltração das amostras foi realizada, inicialmente, com uma mistura 1:1 de etanol 100% e historesina Leica®, durante 12 h; posteriormente o material foi infiltrado em historesina pura por 24 horas. A inclusão foi realizada com historesina, em cápsulas de gelatina com a adição de polimerizador, à temperatura ambiente, por 2 –3 h (Arnold *et al.*, 1975).

As amostras foram seccionadas em micrótomo (SLEE Cut 4055), com navalhas de aço. Os cortes com espessura de 5 µm foram distendidos em temperatura ambiente e colocados diretamente nas lâminas sobre gotas de água destilada sendo desidratados em placa aquecedora a 37 °C, por 30 min. As observações e o registro das características qualitativas foram realizados em microscópio Olympus BX 40, adaptado com sistema de fotomicrografia PM-20. Para observação da morfologia celular e estrutural das culturas

embriogênicas foi utilizado o corante de azul de toluidina (AT). As lâminas semipermanentes foram coradas em solução aquosa a 0,1% de AT (Bouzon, 1993).

2.2.13. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise ultraestrutural por meio de microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Laboratório de Anatomia y Embriología Vegetal do Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental da Universidad de Buenos Aires com a colaboração da Profa. Dra. Sara Maldonado.

Foram avaliadas mudanças ultraestruturais durante o processo de MCP por meio da microscopia eletrônica de transmissão segundo a metodologia descrita por Panza *et al.* (2002). Culturas embriogênicas foram fixadas em paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 (0,1M) por um período mínimo de 48 h. Após, foram lavados em tampão fosfato de sódio pH 7,2 (0,1M). Em seguida o material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 (0,2M) mantendo o material no escuro e agitando com frequência por 12 h aproximadamente. As amostras foram novamente lavadas em tampão fosfato de sódio pH 7,2 (0,1M). Posteriormente, o material foi desidratado em série de acetona ascendente 30, 50%, 70, 90% e 100% sendo duas trocas de 30 min em cada etapa. Para inclusão foi utilizada a resina epoxi de baixa viscosidade (Spurr). A pré-infiltração das amostras foi realizada, inicialmente, com uma mistura 1:1 de acetona e resina, durante 12 h; posteriormente o material foi colocado em solução de acetona e resina 1:3 e finalmente o material foi incluído em resina pura por dois a três dias. Foram utilizados moldes horizontais como suporte colocando na estufa a 70 °C, por um período de 8 h ou até polimerizar.

O material foi seccionado em Ultramicrótomo Leica Ultracut em navalha de vidro e navalha de diamante. As seções ultrafinas foram colocadas em suportes de cobre

("grids"). Para contrastação foi utilizada uma solução de acetato de uranila 2% aquoso e citrato de chumbo. A observação e análise do material foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão.

2.2.14. Processamento do material para Imunofluorescência

A análise em imunocitoquímica para a identificação de proteínas arabinogalactanas (AGPs) foi realizada segundo a metodologia descrita por Filonova *et al.* (2000a) com adaptações de Harris & Oparka (1993). Culturas embriogênicas provenientes da etapa de proliferação e maturação foram fixadas em solução de glutaraldeído 0,5%, paraformaldeído 2% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 (25mM) por um período máximo de 4 h e lavados em tampão fosfato de sódio pH 7,2 (0,1M). Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica de 30, 50%, 70, 90% e 100%, sendo duas trocas de 30 min em cada etapa. Para inclusão foi utilizada a resina LR White. A pré-infiltração das amostras foi realizada, inicialmente, com uma mistura 1:1 de etanol e resina LR White, durante 8 h. O material foi incluído por três trocas de resina pura de 8 horas cada. A polimerização foi realizada em estufa a 50 °C por 24 h. Para obtenção de seções semifinas o material foi seccionado em Ultramicrotomo Leica Ultracut em navalha de vidro. As seções foram aderidas em lâminas de vidro cobertas com Poly-L-Lisina. As seções foram marcadas pelo anticorpo monoclonal JIM13 (Proteínas arabinogalactanas (β -D-GlcpA-(1→3)- α -D-GalpA-(1→2)-L-Rha) (cedido gentilmente pelo Dr. Keith Roberts e Paul Knox, Jonh Innes Centre, UK) o qual reconhece epitopos de proteínas arabinogalactanas (Knox *et al.*, 1991)

2.2.15. Incubação das seções para Imunofluorescência

As seções foram hidratadas com PBS (tampão fosfato salino pH 7) por 10 min sendo em seguida bloqueadas com uma solução centrifugada de leite em pó desnatado 3%

em PBS por 45 min. Em seguida as seções foram incubadas com anticorpo primário na proporção de 1:250 em PBS por 2 h. Esta etapa não foi realizada para o controle. Após este período as seções foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS e incubadas com anticorpo secundário diluído 1:500 em PBS em câmara escura por 2 h. Como anticorpo secundário foi utilizado fluoresceína isotiocianato (FITC) anti rat (Sigma). Após, as seções foram novamente lavadas em PBS por 2x de 15 min cada e em seguida em água destilada por 5 min. Após a montagem das lâminas com lamínula as seções foram observadas em microscopia de fluorescência (filtro de excitação de 480-500nm) e registradas com sistemas de fotomicrografia PM-20.

2.2.16. Análise estatística

Todos os experimentos de cultura de tecidos foram realizados em triplicata. As análises histológicas e morfológicas foram realizadas a partir de diferentes culturas e são representativas do processo biológico as quais descrevem. O número de embriões e a contagem de núcleos para o teste de TUNEL estão representados pelas médias e desvio padrão (Steel & Torrie 1988).

2.2.17. Colaborações estabelecidas

As análises realizadas neste capítulo estabeleceram colaborações com Universidades Internacionais. Foi estabelecida a colaboração com a Profa. Dra. Sara Maldonado no Laboratório de Anatomia y Embriología Vegetal do Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental da Universidad de Buenos Aires. Além disso, foi obtida uma bolsa doutorado sanduíche por um período de quatro meses, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em colaboração com Profa. Dra. Sara von Arnold do Departamento de Plant Biology and

Forest Genetics da Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences na Swedish University of Agricultural Sciences (SLU). O estágio sanduíche permitiu a realização de um estudo comparativo do modelo de embriogênese somática de *A. angustifolia* com outras espécies de coníferas como *P. sylvestris* e *P. abies*. Nestas espécies o protocolo de embriogênese somática vem sendo estabelecido não somente visando a conservação de germoplasma, mas especialmente para a propagação massal de genótipos superiores utilizados em reflorestamentos.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. O modelo de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*

O presente trabalho identificou que a indução à embriogênese somática em *A. angustifolia* ocorreu pela extrusão de um grupo de células friáveis e translúcidas originadas a partir do ápice meristemático do embrião zigótico (Figura 4A (1,2)). Este grupo de células friáveis originou-se a partir de inúmeras divisões celulares sendo em seguida individualizado do explante inicial (Figura 1a) o qual deu origem a cultura embriogênica. As culturas embriogênicas eram constituídas por massas pró-embriônicas (MPEs) as quais eram formadas por dois tipos celulares: células embriogênicas (Ce) e células do suspensor (Cs) (Figura 2a). As Ce se distinguem das Cs (Figura 2d) porque estas últimas apresentam-se alongadas, altamente vacuoladas e na maioria das vezes anucleadas. As Ce (Figura 2b) por sua vez eram pequenas, isodiamétricas, com alta relação núcleo citoplasma e intensa atividade mitótica.

Além das células embriogênicas, foram observados dois tipos de células do suspensor, nucleadas e anucleadas. As células embriogênicas são originadas a partir da divisão simétrica de células posicionadas internadamente no grupo celular. Já as células do suspensor nucleadas são originadas a partir da divisão assimétrica de células

embriogênicas periféricas. Posteriormente, estas células se tornam alongadas, vacuoladas, liberam o núcleo tornando-se anucleadas e finalmente sofrem degradação (Figura 2a e Figura 4 (A1)). Adicionalmente estas células são altamente permeáveis ao corante Azul de Evans e apresentam reduzida reação ao carmim acético, o qual é um indicativo de estádios iniciais da morte celular programada (Bozkov *et al.*, 2002; Durzan, 2008). Foi observada que células do suspensor isoladas no meio de cultura podem apresentar protuberâncias as quais dão origem a novas células do suspensor (dados não apresentados), mas desta vez diretamente anucleadas. No entanto, estas células isoladas foram incapazes de originar um novo agregado celular.

Estes resultados estão em consonância com aqueles observados por Astarita & Guerra (2000) no que diz respeito a origem das células do suspensor nucleadas. Estes autores também observaram que células do suspensor são originadas a partir de células embriogênicas e que perdem o núcleo durante a diferenciação. Células anucleadas originadas por protuberâncias não foram mencionadas no referido trabalho. No entanto, diferente do que foi descrito por estes autores, foi observado no presente trabalho que a proliferação dos grupos celulares não ocorre a partir de células embriogênicas isoladas no meio de cultura. As MPEs constituídas por uma mistura dos dois tipos celulares (Ce, Cs) aumentam de tamanho por meio da divisão celular e passam pelo estágio I, II e III (Figura 1b,1c,1e respectivamente) e, após, apresentam fragmentação retornando ao estágio I e II (Figura 1d) (Figura 4B-(3,4,5)). Foi observado que as MPEs (Figura 1b-e) inicialmente apresentam ausência de polaridade e proliferação celular contínua estabelecendo, assim, o ciclo de proliferação celular. Esta organização morfológica representa e caracteriza a fase pré-embriônica do desenvolvimento do embrião em gimnospermas, que inclui todos os estádios após a fusão gamética e antes do alongamento das células do suspensor (Dogra, 1978; Singh, 1978). Já em angiospermas, estes dois tipos celulares são originados na

primeira divisão assimétrica do embrião zigótico após a fertilização e, posteriormente, dão origem ao corpo da planta (Souter & Lindsey, 2000; von Arnold *et al.*, 2002).

Após a redução de fitorreguladores para metade da concentração utilizada na fase de indução, foi observado que as culturas em fase pró-embriónica seguiram em contínua proliferação. Simultaneamente, durante esta etapa algumas destas MPEs apresentaram alongamento de células de suspensor adquirindo bipolaridade e tornando-se mais globular à medida que inicia o processo de individualização a partir do grupo celular o qual lhe deu origem (Figura 1f; Figura 4C (6)). No entanto, foi observado a presença de células meristemáticas na região do suspensor durante a individualização inicial destes embriões (Figura 1f). Adicionalmente, foi observado que durante a fase pró-embriónica, as MPEs podem apresentar total ausência de polaridade aumentando apenas em tamanho e dando origem a pró-embriões solares constituídos de um grupo de células embriogénicas circundadas por inúmeras células de suspensor. Este tipo de morfologia já foi previamente caracterizado em *P. abies* e, nesta espécie, estas morfologias não progredem para os estádios posteriores do desenvolvimento (Mo *et al.*, 1996; Filonova *et al.*, 2000b).

Durante a etapa de maturação, quando o ABA (150µM) foi suplementado ao meio de cultura, observou-se a progressão dos pró-embriões somáticos de *A. angustifolia* caracterizando os estádios iniciais do desenvolvimento do embrião somático. Esta etapa inclui todos os estádios após o alongamento do suspensor e antes do estabelecimento do meristema radicular (Singh, 1978) e é denominada “embriogénese inicial” como tradução termo em inglês “*early embryogenesis*”. Após três semanas de cultivo de exposição ao ABA observaram-se embriões somáticos completamente individualizados das massas suspensor embriónicas (Figura 1i,j,k). Estes embriões apresentavam o ápice coberto por uma superfície lisa formado por células densas e coesas, as quais estavam conectadas ao um sistema de células do suspensor alongado e alinhado (Figura 1j). Apesar de estes

embriões apresentarem o ápice cilíndrico foi observada a presença de células meristemáticas na região do suspensor (Figura 1j,k). Anormalidades morfológicas foram observadas durante esta etapa como, por exemplo, embriões com a presença de células meristemáticas na região do suspensor (Figura 1g,h; Figura 4 (7,8,10)), embriões com ápice alargado conectados a um conjunto supranumerário de células de suspensor (Figura 1h) e embriões gêmeos (Figura 1g). Foi observado ainda que as células periféricas do ápice embrionário destes embriões com morfologias aberrantes apresentaram a formação de novas células do suspensor, mantendo a capacidade autorreplicadora e perdendo a polaridade inicialmente estabelecida (Figura 1h e 3c, setas; Figura 4 (7,8,10)). Isto sugere que estes pró-embriões não progridem para as etapas seguintes do desenvolvimento retornando ao processo de proliferação. Além disso, foi observada ainda nesta fase embriões com morfologia solar e com completa ausência de polaridade (Figura 1i), o que justifica a baixa frequência de embriões somáticos observados nas etapas seguintes do desenvolvimento.

A “embriogênese final” termo utilizado no presente trabalho para a tradução de “*late embryogenesis*” em gimnospermas que é caracterizada pelo estabelecimento dos meristemas antes da maturidade do embrião (Singh, 1978), seguido pela maturação onde ocorre o acúmulo de substâncias de reserva e finalmente a germinação (von Arnold, 2002). Em Araucária estas etapas foram estabelecidas previamente (Steiner *et al.*, 2008). A diferenciação dos embriões somáticos com morfologia semelhante ao embrião zigótico ocorreu em meio de cultura suplementado com ABA (150 μ M), Maltose (9%) e PEG (7,5%). Embriões somáticos globulares com uma proeminente região embriogênica levemente opaca na superfície da cultura juntamente com embriões torpedo e cotiledonares caracterizaram o desenvolvimento dessincronizado (Figura 4 (11-14)). A etapa de germinação foi caracterizada pelo alongamento e a mudança de pigmentação dos

cotilédones, contudo o eixo embrionário era reduzido a um pequeno nó sem que o hipocótilo e radícula se tornassem visíveis (Figura 4 (15)).

No presente trabalho as seções histológicas durante a etapa de maturação indicaram divisão celular irregular durante os estádios tardios do desenvolvimento (Figura 3a,b). Observou-se ausência de protodorme e a ocorrência de tecidos vasculares anormais (Figura 3d,e). Estas anormalidades se refletem na baixa frequência de embriões somáticos maduros e na ausência de germinação.

No entanto, foi observada uma baixa frequência de embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento, o que em parte pode ser explicada pelas anormalidades mencionadas durante a fase pró-embriônica. Adicionalmente ao que foi proposto por Steiner (2005) a baixa frequência de embriões não se deve somente atribuída às condições inadequadas de cultura durante a os estádios finais da embriogênese e maturação, mas especialmente ao inadequado estágio de desenvolvimento em que estas culturas foram submetidas ao tratamento com ABA. Em *Picea abies* foram caracterizados três estádios das massas pró-embriônicas (MPE I, MPE II e MPE III) durante a proliferação, mas somente MPE III eram capazes de responder ao tratamento com ABA (Filonova *et al.*, 2000a). Estes mesmos autores sugerem que MPEs em coníferas necessitam um determinado grau de organização morfológica antes de serem submetidos a tratamento com ABA durante a maturação. Baseado nisto, diversas linhagens celulares de Norway spruce foram caracterizadas como genótipos dependentes uma vez que não atingiam o adequado grau de organização morfológica apresentando baixo rendimento no número de embriões somáticos formados (Bozhkov *et al.*, 2004).

A transição da fase pró-embriônica para os estádios iniciais do desenvolvimento do embrião tem sido um dos principais limitações do protocolo de embriogênese somática em coníferas (von Arnold *et al.*, 2005), na qual a *Araucaria* está incluída. As MPEs de *A.*

angustifolia são dotadas de capacidade autoreplicativa e não estão comprometidas com o desenvolvimento do embrião mantendo capacidade ilimitada de autorenovação (Figura 1f). Assim quando submetidas ao tratamento com ABA elas apresentam anormalidades (Figura 1i) e baixa frequência de embriões somáticos formados. Resultados semelhantes foram observados em *Abies normandiana*, em que as MPEs apresentavam um inadequado balanço hormonal e não adquiriram determinação para o desenvolvimento de embriões somáticos. Estes autores promoveram a transição da fase de proliferação para a maturação por meio do uso de um inibidor de auxina endógeno (PCIB) o qual reduziu a alta proliferação celular e promoveu o desenvolvimento de embriões somáticos (Find *et al.*, 2002). No entanto, o PCIB não substituiu a suplementação de ABA e o efeito positivo foi somente observado quando o PCIB e ABA foram utilizados em combinação.

Em *P. abies* e *P. sylvestris* também foram observadas anormalidades durante os estádios iniciais do embrião somático. Estes resultados são coincidentes com aqueles descritos em *A. angustifolia* e apresentados neste capítulo. As mesmas anormalidades observadas em *A. angustifolia* foram observadas em *Picea abies* em decorrência do tratamento com ABA na fase pró-embriônica e em *P. sylvestris* pelo conteúdo endógeno de ABA nas culturas. Assim sugere-se que este gargalo da embriogênese em *A. angustifolia* poderia ser superado por meio do estabelecimento de tratamentos adequados de pré-maturação. Nesta etapa a utilização de inibidores endógenos de auxina e de ABA durante as fases iniciais do desenvolvimento do embrião somático acompanhadas do monitoramento morfológico poderiam indicar as condições para esta nova etapa do protocolo. Estas fontes exógenas poderiam modificar o balanço hormonal endógeno das MPEs conferindo o estabelecimento de polaridade e permitindo que o potencial de desenvolvimento destas células se direcione a uma rota específica que culmina com o desenvolvimento de embriões somáticos maduros.

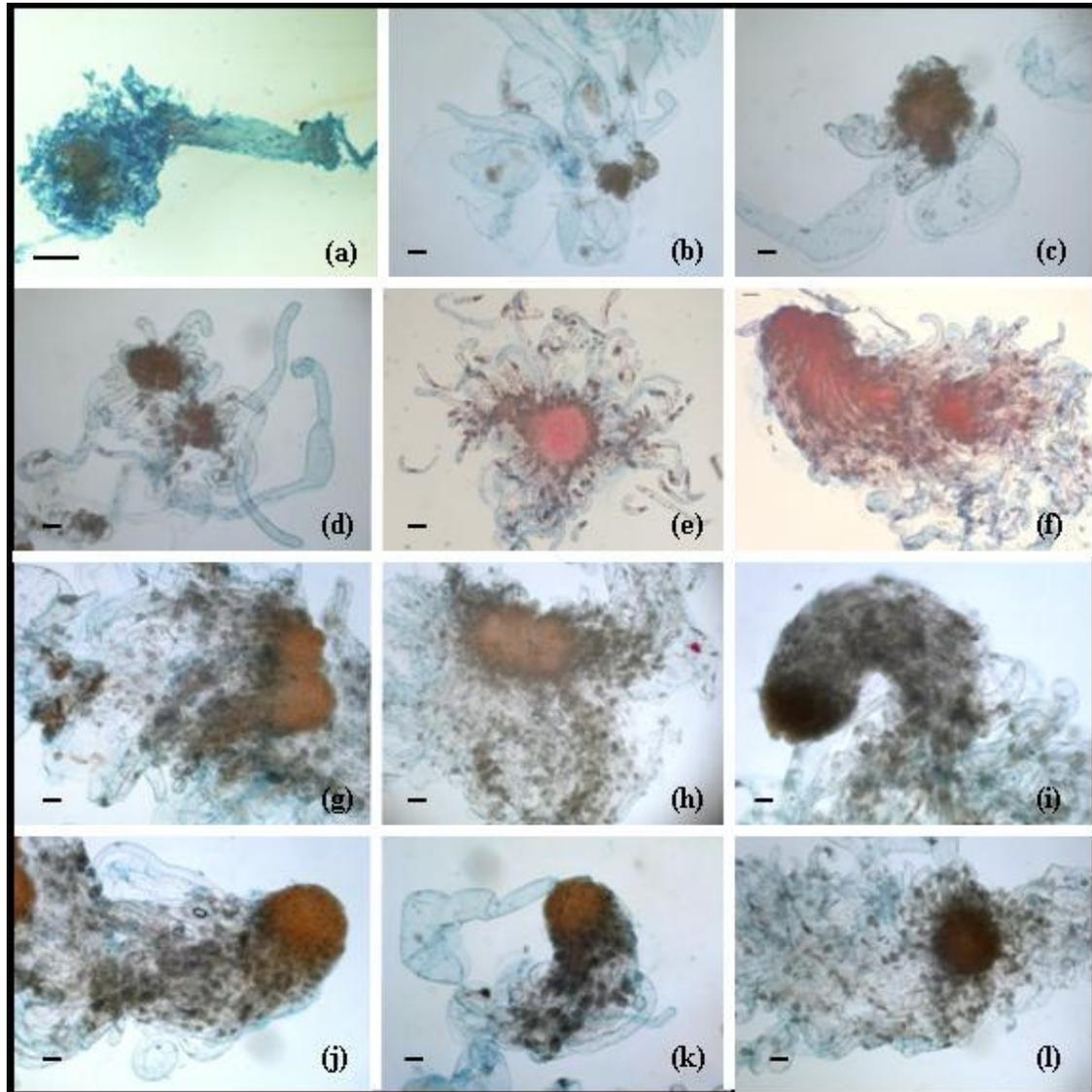


Figura 1. Caracterização morfológica por meio da dupla coloração com Azul de Evans e Carmim acético das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* durante a indução (a), proliferação (b,c,d,e,f) e início da maturação (g,h,i,j,k,l). a) extrusão do grupo celular a partir do ápice do embrionário zigótico; b,c,e) distintos estádios de massas pró-embriônicas (PEMs) I, II e III, respectivamente; d) fragmentação de PEMs; f) pró-embrião com início de polarização; g) embriões iniciais gêmeos; h) embriões iniciais com ápice largo conectado a um supranumerário sistema de células do suspensor; i) embriões iniciais com ápice pouco definido e enrugado; j,k) embriões iniciais com ápice cilíndrico e sistema de suspensor alinhado; l) embriões iniciais com regressão para os estádios de PEMs perdendo completamente a polaridade. Notar em f,g,h,i,j,k,l a presença de células embriogênicas na região do suspensor em todas as diferentes morfologias observadas.

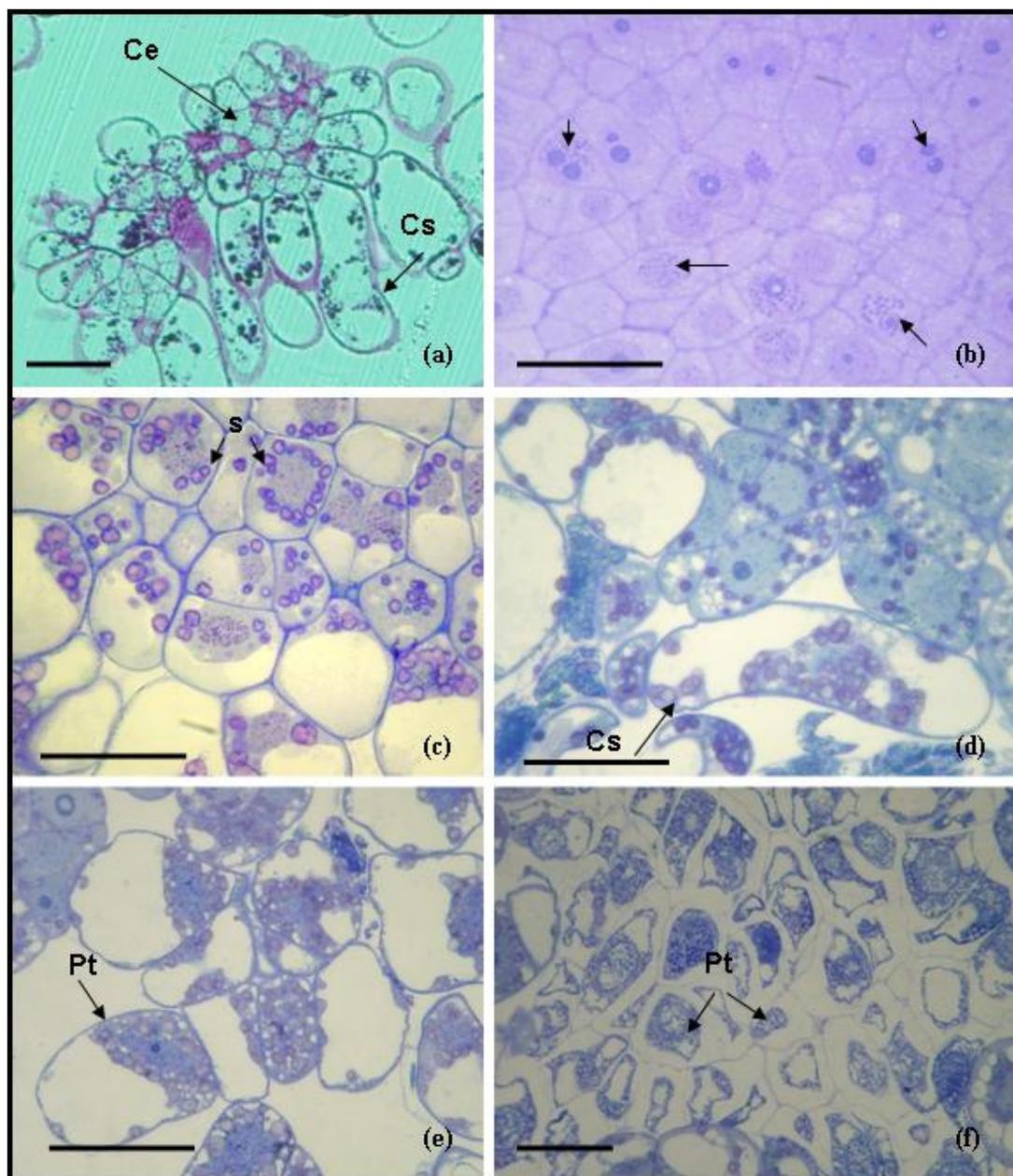


Figura 2. Análise histológica das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* durante a etapa de proliferação. Seções de historesina foram coradas com Azul de Toluidina (1%) e analisadas em microscopia ótica (MO). a) pró-embrião somático formado por um grupo de células embriogênicas (Ce) circundado por células do suspensor (Cs); b) células embriogênicas em distintos estádios da mitose; c) células embriogênicas com presença de grânulos de amido (s) circundando o núcleo; d) células do suspensor anucleada com grânulos de amido; e, f) células em processo de morte celular programada que ao final são reduzidas a um protoplasma (Pt) com restos citoplasmáticos incluindo o núcleo e a parede celular (Barras=1mm).

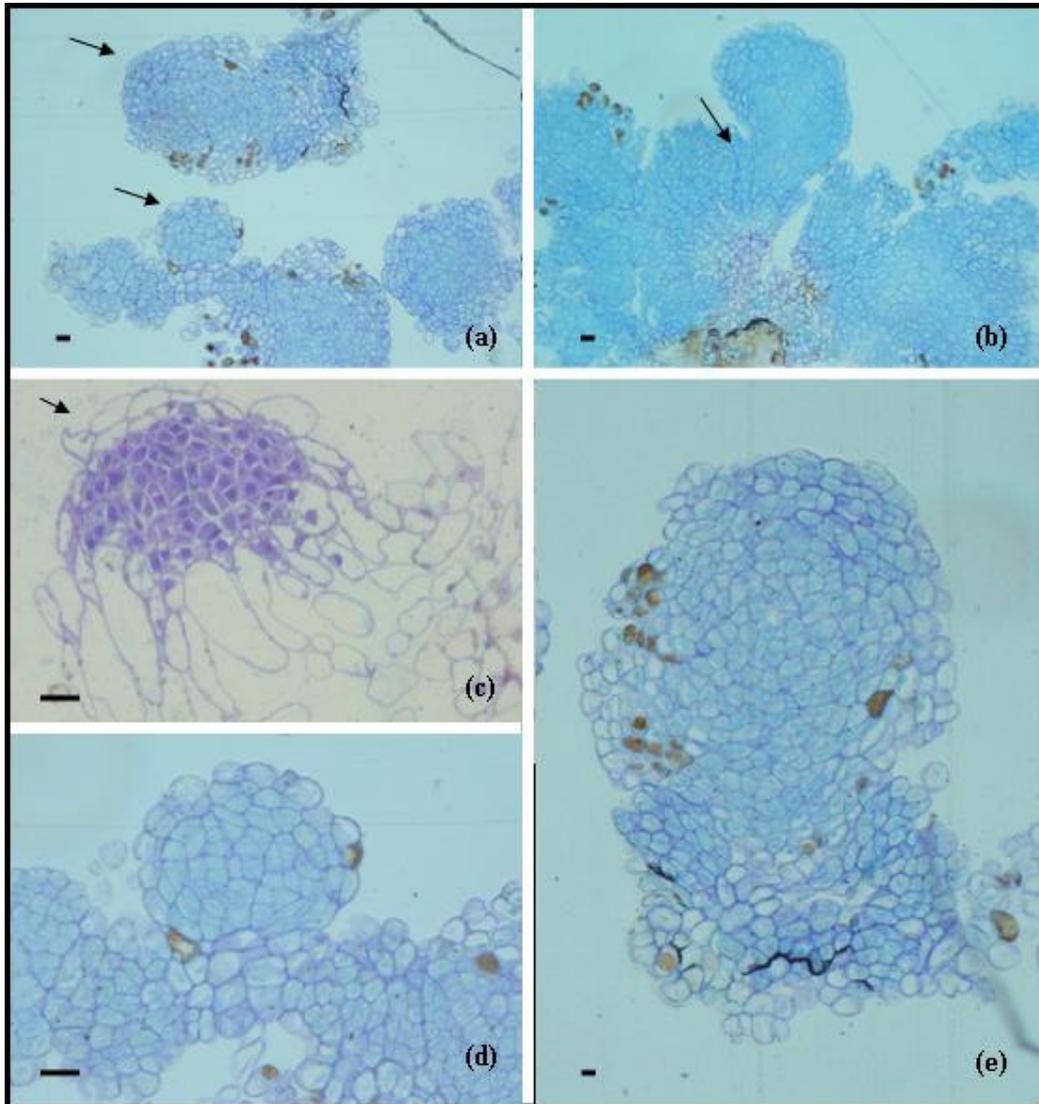


Figura 3. Análise histológica das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* durante o início da maturação. Seções de historesina foram coradas com Azul de Toluidina (1%) e analisadas em microscopia ótica (MO) a) grupo de células embriogênicas com a formação de embriões somáticos em estádios iniciais na superfície da cultura e embrião somático inicial alongado; b) grupo de células embriogênicas com a formação de embriões somáticos anormais; c) embrião no início da maturação, células embriogênicas periféricas no ápice embrionário reiniciando novamente a formação de células do suspensor; d) detalhe de (a) embrião somático inicial originado a partir do grupo de células embriogênicas; c) detalhe de (a) embrião somático inicial alongado (Barras=1mm).

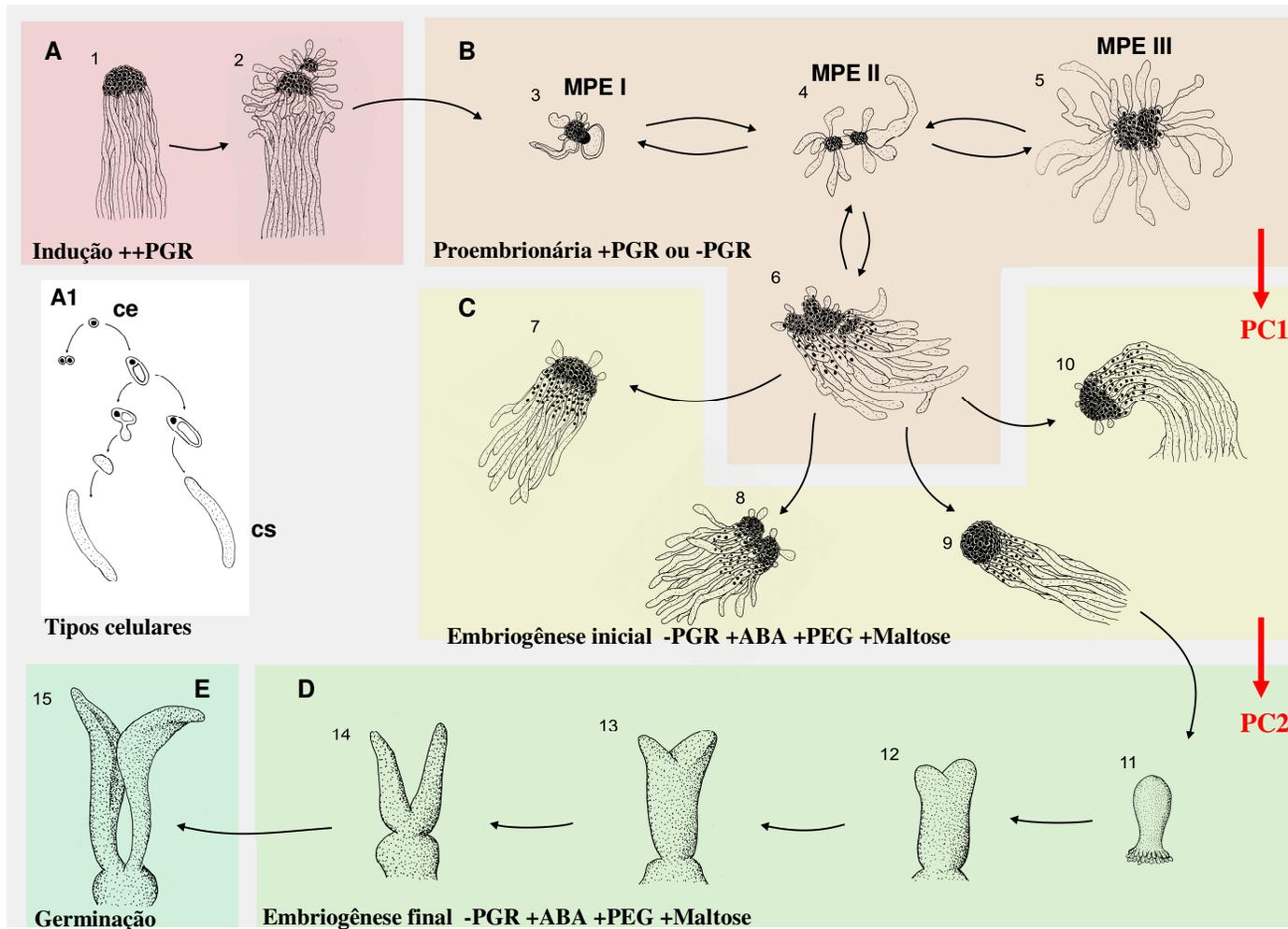


Figura 4. Modelo de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*. 1) embrião zigótico imaturo; 2) indução do primeiro grupo celular a partir do ápice embrionário zigótico; 3,4,5) Massas pró-embriônicas (MPEs) as quais passam pelos três estádios de acordo com o tamanho e número de células; 6) início do estabelecimento de polaridade e individualização do pró-embrião; 7,8,10) anomalias morfológicas (ápice largo (7), gêmeos (8), células embriogênicas na região do suspensor (10)) observadas em pró-embriões individualizados após 30 dias em meio de cultura BM suplementado com ABA; 9) pró-embrião com morfologia normal, porém, com células embriogênicas na região do suspensor; 11-14) estádios observados durante o final da embriogênese após 80 dias em ABA; 15) germinação do embrião somático; PC1 ponto crítico do protocolo o qual sugere-se uma etapa adicional de pré-maturação a qual deve trabalhar aspectos do balanço hormonal endógeno, transporte de auxina, morte celular programada (MCP); PC2 Ponto crítico do protocolo pela baixa frequência de embriões somáticos maduros; ce (células embriogênicas); cs (células do suspensor).

2.3.2. A morte celular programada (MCP) ocorre no início da embriogênese final e não nos estádios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*

Durante as fases iniciais do desenvolvimento do embrião somático em *A. angustifolia* foi realizado o teste TUNEL o qual identifica células com fragmentação nuclear, considerado o estágio mais avançado da morte celular programada em plantas (Bozhkov *et al.*, 2002; Filonova *et al.*, 2002). Não foram observadas células positivas ao teste TUNEL, independente da morfologia do embrião somático analisado (Figura 5).

Em gimnospermas, o desenvolvimento normal do embrião apresenta um intenso e coordenado programa de divisão celular e MCP, os quais definem adequadamente o corpo do embrião e permitem a progressão para os estádios tardios do desenvolvimento (Bozhkov *et al.*, 2004). No caso da *A. angustifolia* a ausência da MCP nos estádios iniciais do desenvolvimento (Figura 5) é, além da morfologia anormal, um indicativo adicional de que existem aberrações no programa de desenvolvimento dos embriões durante esta etapa. Isto porque, já foi previamente demonstrado em outras coníferas como *P. abies* que a organização da polaridade apical basal do embrião é dependente um gradiente de MCP a partir das células tubo embrionárias concomitante com a morte das células do suspensor (Smertenko *et al.*, 2003; Bozhkov *et al.*, 2005). Nesta mesma espécie, o efeito de um inibidor do transporte polar de auxina (NPA), essencial para o estabelecimento da polaridade do embrião, sobre a MCP, também foi analisado. Estes autores concluíram que o tratamento com NPA levou a um decréscimo na MCP, resultando em aberrações no desenvolvimento de células tubo embrionária e células do suspensor (Larsson *et al.*, 2008). Assim, o fato dos embriões somáticos de *A. angustifolia* não apresentarem MCP nesta fase sugere para tal duas principais razões: i) a presença de células meristemáticas na região do

suspensor indicando o desenvolvimento anormal destas células; ii) a manutenção da competência celular das células embriogênicas periféricas do ápice embrionário, o qual confere a ausência de polaridade e a capacidade autoreplicativa. Isto, possivelmente é uma consequência indireta provocada pelo inadequado balanço endógeno hormonal (auxinas/ABA) o qual reflete em falhas no programa genético de desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*.

Recentemente foi demonstrado que a decisão de sobrevivência ou MCP em células do embrião vegetal é mediada pelo conteúdo intracelular de Zinco (Zn) de forma semelhante ao que ocorre em animais (Helmersson *et al.*, 2008). Em *P. abies* foi observado que a suplementação crescente de Zn durante os estádios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos levaram a uma supressão da diferenciação e eliminação das células de suspensor por MCP, causando a inibição da maturação dos embriões somáticos (Helmersson *et al.*, 2008). Estes dados confirmam o requerimento de um coordenado balanço entre proliferação e MCP durante a embriogênese vegetal.

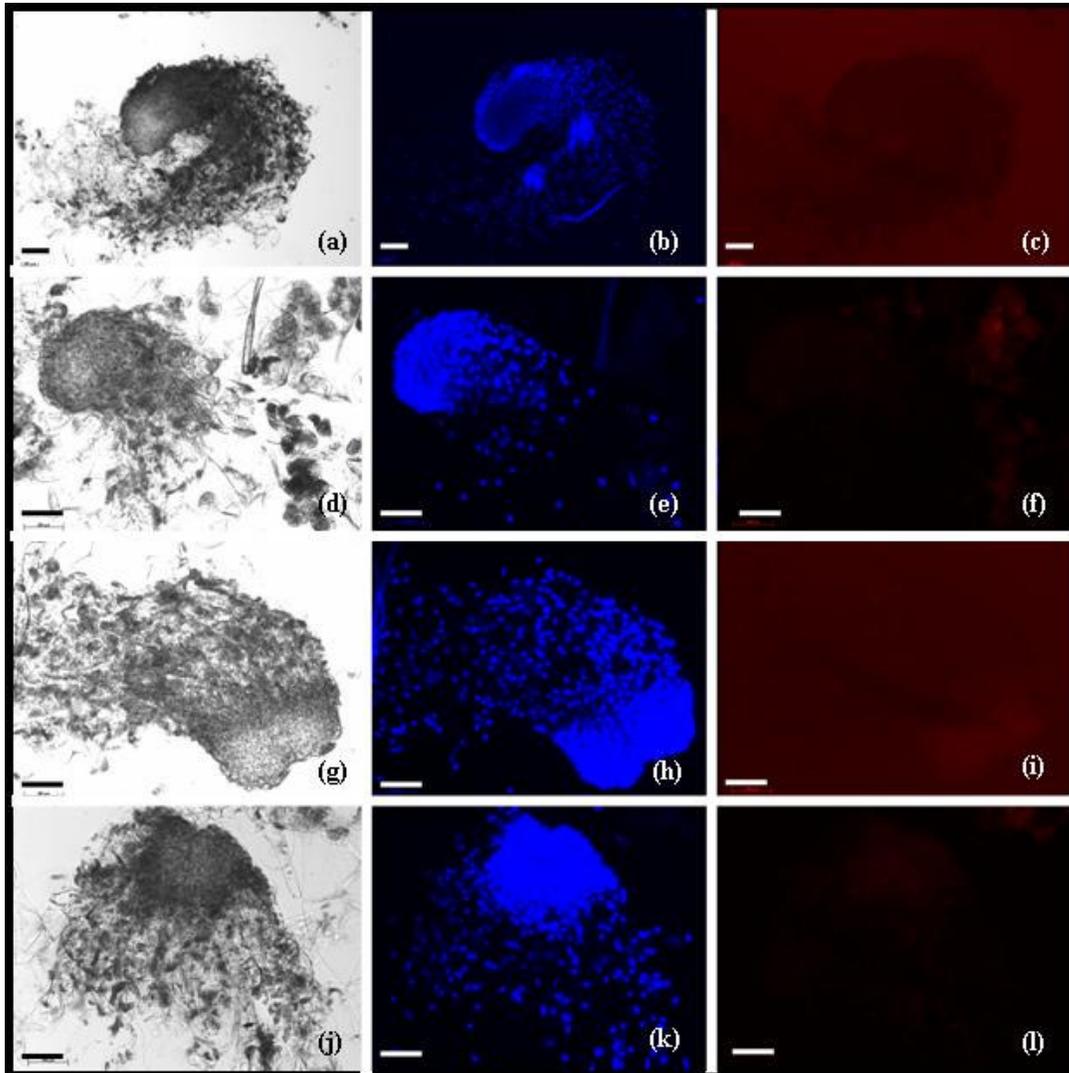


Figura 5. Morfologia em embriões somáticos de *A. angustifolia* durante a fase inicial do desenvolvimento submetido ao teste de TUNEL. Imagens de em microscopia de luz clara das diferentes morfologias dos embriões em estágio inicial do desenvolvimento (a,d) com células meristemáticas na região do suspensor (g) gêmeos e (j) ápice embrionário longo com supranumerário sistema de células do suspensor. Os mesmos embriões foram observados com coloração para DAPI (b, e, h, k) e TUNEL (c, f, i,l).

Apesar de não ter sido observada MCP durante os estádios iniciais do desenvolvimento do embrião somático em *A. angustifolia*, este processo foi observado durante os primeiros estádios da embriogênese final. A análise citoquímica de amostras submetidas durante 30 dias ao tratamento com ABA evidenciou a degradação de células do suspensor à medida que os embriões somáticos tornavam-se organizados. Estes

resultados indicam que apesar do baixo número de embriões formados durante a embriogênese final o processo de MCP foi observado em células embriogênicas periféricas assim como de suspensor. Células embriogênicas situadas no interior dos embriões somáticos apresentavam características diferenciadas daquelas células em processo de degradação. Para uma descrição mais precisa deste processo foi realizada a análise ultraestrutural o qual caracterizou morfológicamente a MCP. Contudo, esta análise não revelou diferenças entre as mudanças ultraestruturais observadas durante o processo de degradação em células embriogênicas e de suspensor. A informação abaixo descrita é consistente para ambos tipos celulares.

Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* apresentavam células com características meristemáticas (Figura 6a, b) em intensa atividade mitótica e citoplasmática. Foi observada a presença freqüente de mitocôndrias e de retículo endoplasmático rugoso principalmente próximo ao núcleo (Figura 6c). Também foi observada a presença de grandes grânulos de amido dispersos por todo o citoplasma (Figura 6a). O citoplasma de uma célula viável apresentou poucos vacúolos (Figura 6a). Foi observado ainda que a vacuolização pode ser definida como um marcador inicial do processo de morte celular em nosso sistema experimental (Figura 7a).

Inicialmente foi observado que as células em processo MCP começavam a se distinguir das demais células embriogênicas pelo aumento de volume e pelo núcleo que se constituía de cromatina mais contrastada ou densa. Foi observada nesta fase a formação de inúmeros vacúolos pequenos (Figura 7a). Posteriormente, os pequenos vacúolos englobavam vesículas (Figura 7 c,d) que, no estágio seguinte, pareciam se fundir aumentando de volume. A autofagia progressiva resultou na formação de um vacúolo largo e central. Nesta fase os grãos de amido diminuía de volume e concentravam-se ao redor do núcleo (Figura 7 a). O tonoplasto se retraiu continuamente para o interior celular,

simultaneamente à formação e fusão de vesículas, onde ocorreu um preenchimento entre citoplasma e vacúolo (Figura 7c,d,f). O sistema de membrana mostrou sinais de degeneração. Contudo, a comunicação celular foi mantida, o que foi comprovado pela presença dos plasmodesmas (Figura 7b), sugerindo que a manutenção da comunicação celular durante a MCP pode implicar em sinais celulares associados à embriogênese. O núcleo apresentou cromatina rarefeita concentrando-se próximo à membrana (Figura 7e). O núcleo apresentou zonas em que as membranas dilatavam-se, indicando sua degeneração. A ruptura do tonoplasto foi retardada até a degradação completa do citoplasma e das organelas, incluindo o núcleo. Na fase final as células eram reduzidas a restos citoplasmáticos e de parede celular (Figura 7f).

Baseado em indicações morfológicas, em animais, a morte celular foi classificada em três principais tipos: tipo I (apoptose), tipo II (morte celular autofágica) e tipo III (necrose) (Clarke *et al.*, 1990). Sendo a tipo I e II MCP e a tipo III morte celular acidental por necrose. O tipo de MCP observado em *A. angustifolia* é caracterizado como sendo um processo que sobrepõe as MCPs dos tipos I (por apoptose) e II (autofágico ou morte celular vacuolar). As células apresentam condensação da cromatina, como observado no processo apoptótico, mas não a formação de corpos apoptóticos individualizados. Por outro lado, foi observado o engolfamento de organelas pelo vacúolo incluindo o núcleo caracterizando um processo autofágico. Em outras coníferas como *P. abies* e *P. sylvestris* também foram observadas características morfológicas, as quais, assim como em *A. angustifolia* sobrepõem o tipo apoptótico e autofágico de MCP durante a embriogênese somática.

Em resumo, durante a embriogênese somática de *A. angustifolia* estão envolvidas duas rotas de morte celular que são responsáveis pela eliminação de células embriogênicas e de suspensor. Este evento foi observado somente durante o início da embriogênese final

em *A. angustifolia*. Isto, possivelmente, permite a progressão dos embriões somáticos para estádios tardios, ainda que em baixa frequência. Contudo, são necessárias avaliações que permitam a quantificação da MCP durante a embriogênese final. Isto permitirá mostrar como a frequência de MCP é modificada no curso dos tratamentos sequenciais que regulam a transição de PEMs para embriões somáticos nesta espécie, incluindo a etapa de pré-maturação.

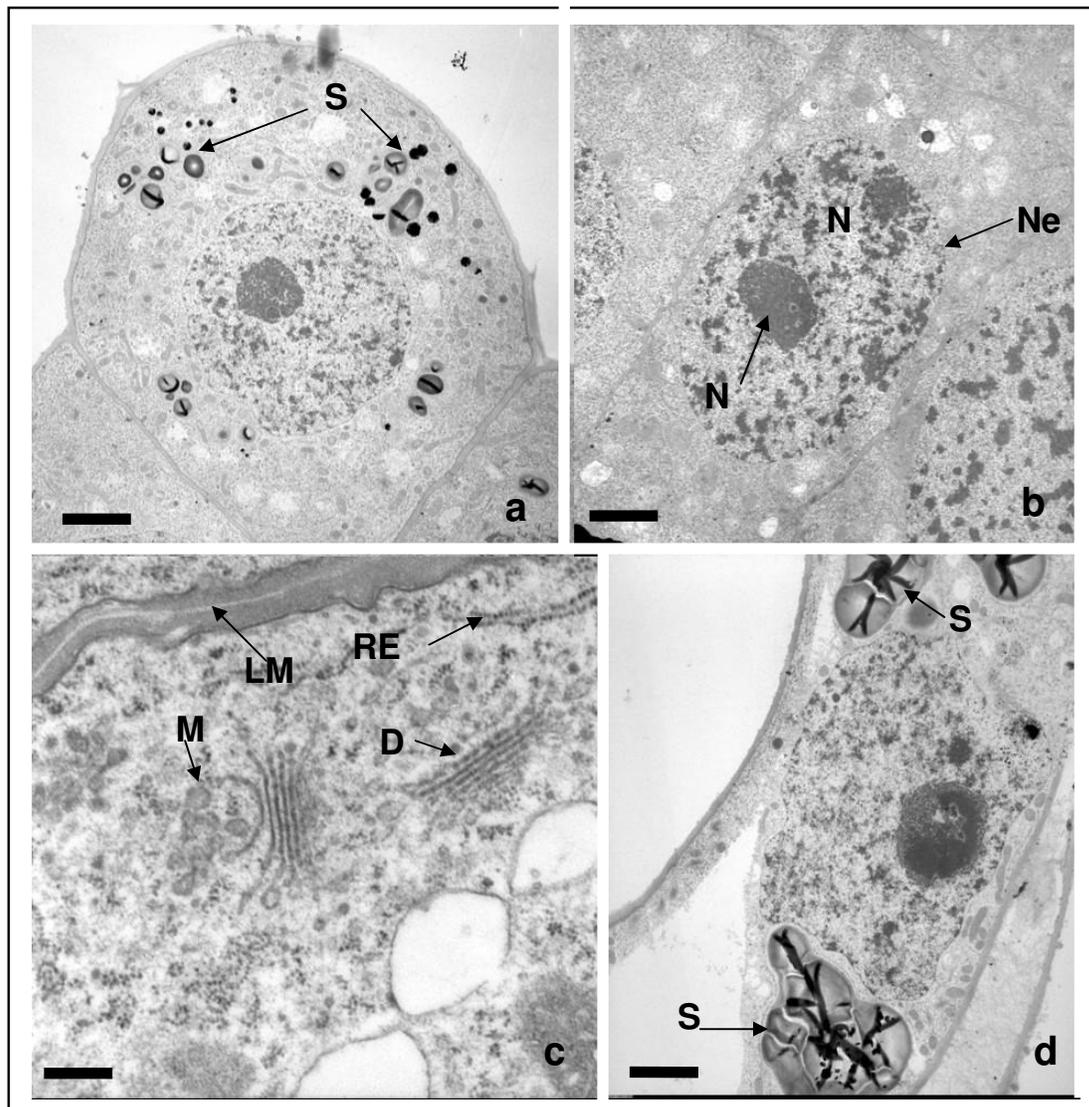


Figura 6. Análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. a) células embriogênicas com grânulos de amido (S) e pequenos vacúolos (V) dispersos pelo citoplasma (Barra=0,19 μm); b) célula embriogênica com citoplasma denso, núcleo (N), nucléolo (Nu) e envoltório nuclear (Ne) definido (Barra=0,02 μm); c) célula embriogênica em intensa atividade citoplasmática apresentando mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (RER) e dictiossomos (D); no detalhe da parede celular a lamela média (LM) (Barra=0,19 μm); d) célula do suspensor com presença de grânulos de amido (S) e núcleo (N) (Barra=0,26 μm).

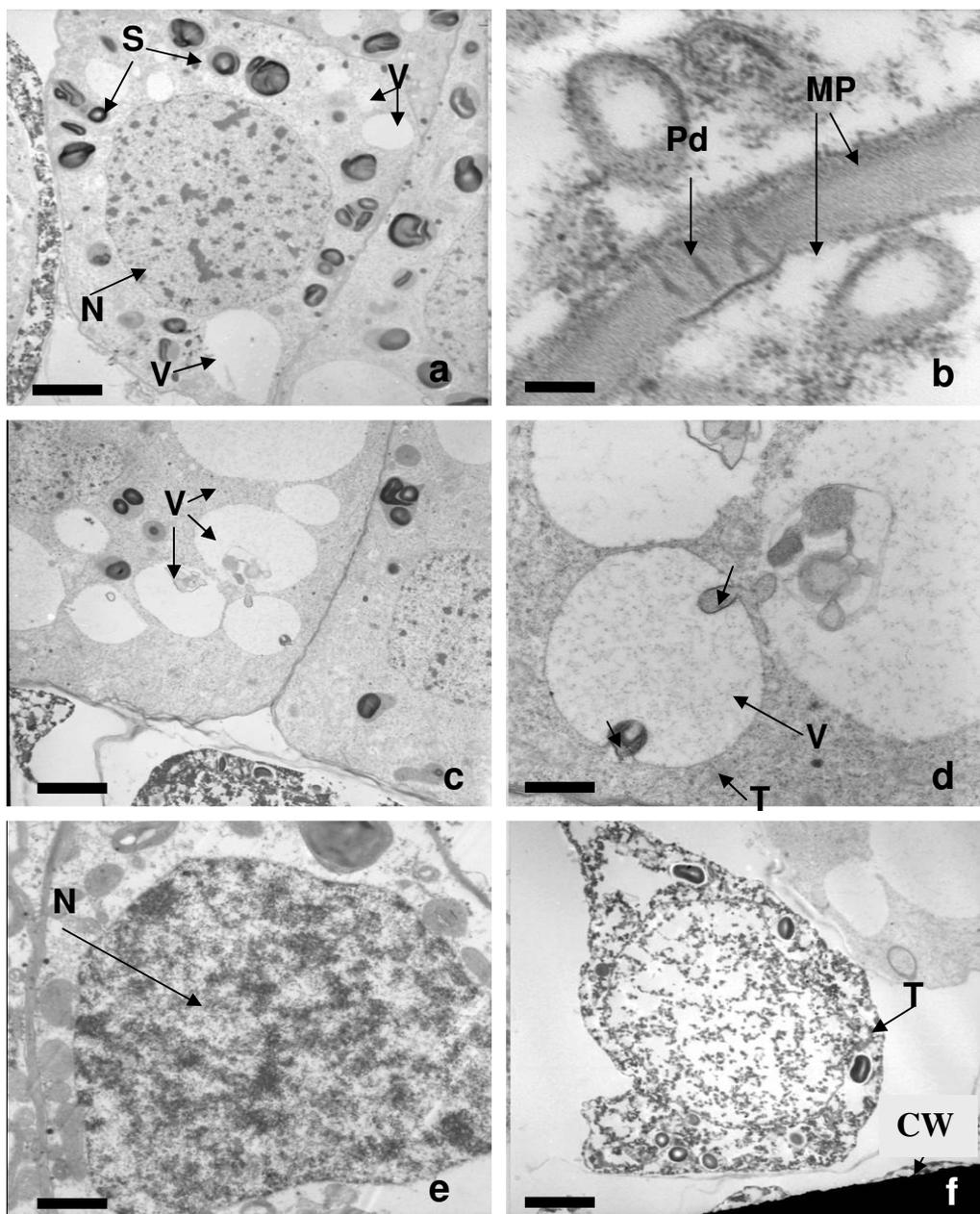


Figura 7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Análise ultraestrutural da morte celular programada (MCP) durante a embriogênese somática de *A. angustifolia*. a) célula embriogênica com pequenos vacúolos (V) e presença de grânulo de amido (S) circundando o núcleo (N) (Barra=0,26 μ m); b) parede celular evidenciando a presença de plasmodesmas (Pd) entre as células em processo de morte celular programada (MCP), MP (membrana plasmática) (Barra=0,01 μ m); c) células embriogênicas com presença de vacúolos (V) englobando vesículas (Barra=0,26 μ m); d) detalhe do englobamento de vesículas e do tonoplasto (T) circundando o vacúolo (V) (Barra=0,06 μ m); e) Núcleo de célula embriogênica com a cromatina desfragmentada (Barra=0,02 μ m); f) estágio final da MCP em que a célula é reduzida a um protoplasma em que o tonoplasto engloba os restos citoplasmático e é circundado pela parede celular (CW) (Barra=0,26 μ m).

2.3.3. Proteínas arabionogalactanas (AGPs) como marcadores espaciais e temporais da morte celular em embriões somáticos de *A. angustifolia*

AGPs são conhecidas por estimular o desenvolvimento dos embriões somáticos em angiospermas e gimnospermas (Chapman *et al.*, 2000; Egertsdotter & von Arnold, 1995; Toonen *et al.*, 1997; van Hengel *et al.*, 2001; van Hengel *et al.*, 2002; Seifert & Roberts, 2007). Contudo, a maior parte dos estudos realizados sobre o padrão de expressão espacial e temporal das AGPs durante o desenvolvimento vegetal tem sido realizado em angiospermas (Showalter, 2001). Todavia, foi observada a presença de AGPs não por imunolocalização, mas por precipitação por meio da utilização do reagente de Yariv durante o desenvolvimento da semente em *A. angustifolia* (Santos *et al.*, 2007). Estes autores observaram que as AGPs eram proeminentes durante os estádios da semente caracterizados pela intensa divisão celular e diferenciação, e sugerindo que o decréscimo de AGPs observado durante a maturação pode ser relacionado à modificação da parede celular durante a deposição de substâncias de reserva. No presente trabalho, o padrão de expressão de AGPs durante os estádios iniciais de desenvolvimento dos embriões somáticos em *A. angustifolia* foi observado por meio da localização do epítipo JIM 13 (Tabela 1). O epítipo JIM 13 reconhece uma proteína arabinogalactana com a conformação β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)-L-Rha.

Tabela 1. Reconhecimento dos epítopos em diferentes estádios de desenvolvimento do embrião durante a embriogênese somática de *A. angustifolia*

Anticorpo monoclonal/epítipo	Estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos				
	Proliferação Pró-embriões		Maturação Embriões globulares		
	Ce	Cs	Cev	Ce	Cs
JIM 13	+	++	+++	-	+++

Ce: célula embriogênica; Cev:célula embriogênica vizinha; Cs:célula suspensor
+++ detecção intensa; ++ detecção moderada; + detecção fraca; _ sem detecção.

Com relação a expressão espacial e temporal do epitopo JIM13 este foi detectado tanto em células embriogênicas quanto em células do suspensor durante os diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. angustifolia*. Em MPEs provenientes da etapa de proliferação foi observado um sinal intenso do epitopo JIM 13 em células do suspensor (Figura 8d). Já nas células embriogênicas coesas não foi detectada a presença deste epitopo. Contudo, foi observado um sinal moderado em células embriogênicas dispersas, as quais não apresentavam nenhum tipo de organização morfológica para formação de embriões somáticos (Figura 8c).

No início dos estágios finais do desenvolvimento embrionário foi observado que o padrão de expressão do epitopo JIM 13 foi específico para células embriogênicas vizinhas ou células dispersas que contornavam os embriões somáticos em desenvolvimento (Figura 8a). Foi ainda observado um intenso sinal deste epitopo em células do suspensor que nesta fase do desenvolvimento dos embriões somáticos encontrava-se em processo de degradação (Figura 8a,d). Em angiospermas o epitopo JIM 13 foi localizado principalmente em células de xilema, floema e células epidérmicas, mas a deposição deste epitopo pode diferir entre as espécies (Stacey *et al.*, 1990). Knox *et al.* (1989) utilizaram as AGPs como marcadores da determinação de células comprometidas com a MCP na população celular do meristema. Em *P. abies*, durante a diferenciação de embriões somáticos foi observado que tanto as células embriogênicas quanto as de suspensor que expressavam o epitopo JIM 13 seguiam a rota da MCP (Filonova *et al.*, 2000a). Estes autores sugeriram que em coníferas, o acúmulo de AGPs, a MCP e o desenvolvimento dos embriões somáticos são processos interligados. Ao contrário, em células mucilaginosas provenientes de acículas de *A. angustifolia* foi observado o acúmulo de AGPs, através do epitopo JIM 13, nas paredes de células em ativa secreção frente a uma drástica redução em células maduras sujeitas a MCP (Mastroberti & Mariath, 2003). No presente trabalho, os

resultados indicaram que a presença do epitopo JIM 13 esta relacionada as células em processo de MCP.

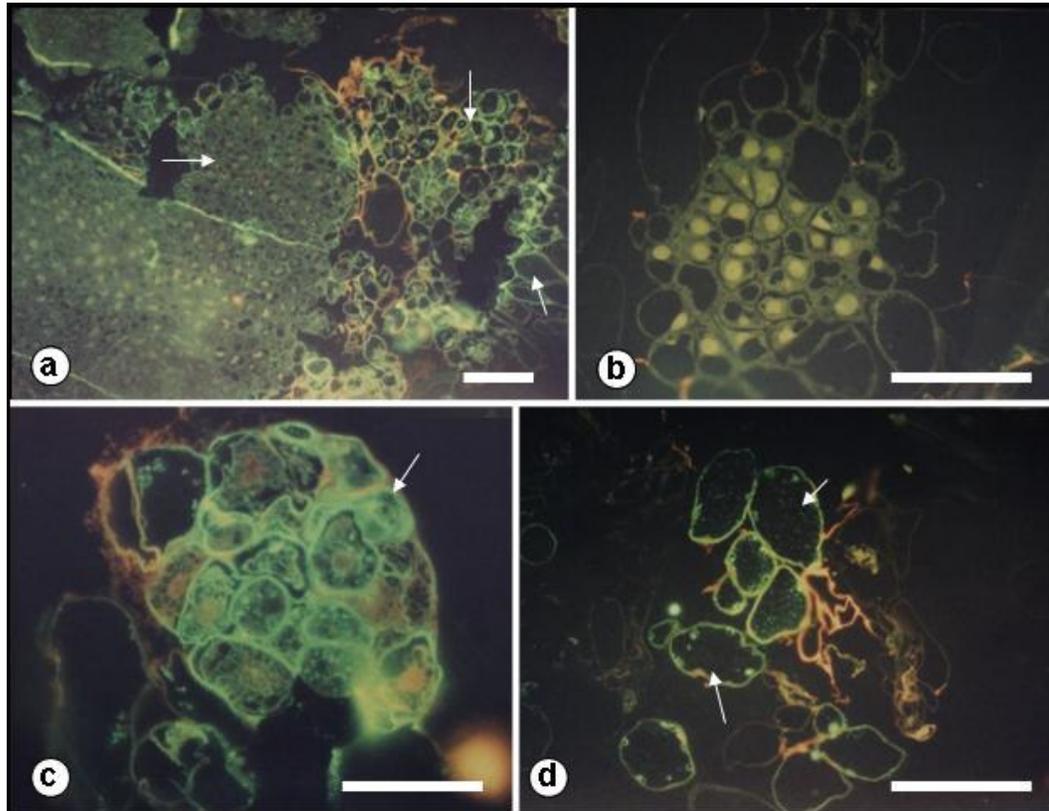


Figura 8. Padrão de expressão espacial e temporal de AGPs durante a embriogênese somática de *A. angustifolia* por meio da imunolocalização do epitopo JIM 13. a) visão geral do processo de formação do embrião somático: a direita - grupo de células embriogênicas e células de suspensor com início de degradação com reação positiva ao epitopo JIM13; a esquerda embrião somático globular inicial sem detecção; b) controle; grupo de células embriogênicas em processo de degeneração com reação positiva ao epitopo JIM 13; c,d) grupos de células do suspensor em processo de degeneração com reação positiva ao epitopo JIM 13 (Barras=1mm).

2.3.4. Efeito do ABA na morfologia e MCP durante os estádios iniciais de desenvolvimento de embriões somáticos em Norway spruce (*Picea abies*)

2.3.4.1. Desenvolvimento normal de embriões somáticos em *Picea abies*

Na presença de auxinas e citocininas culturas embriogênicas de *P. abies* proliferam-se como massas pró-embrionárias (MPEs), as quais são compostas de dois diferentes tipos celulares: células meristemáticas pequenas com citoplasma denso e células alongadas, altamente vacuoladas. A retirada dos fitorreguladores do meio de cultura estimula a diferenciação de estádios iniciais do embrião somáticos, correspondendo aos estádios iniciais de desenvolvimento do embrião zigótico. Estes embriões em estádios iniciais apresentam uma estrutura polar com uma massa globular embrionária compacta na parte apical e células dos suspensor vacuoladas na parte basal. Estas estruturas são separadas por células tubo embrionárias, exclusivas de gimnospermas. Neste estágio os embriões podem ser transferidos para o meio de maturação contendo ABA. Após uma semana de exposição ao ABA, os embriões atingem o estágio de desenvolvimento correspondente ao início dos estágio tardios do embrião zigótico. Neste momento, as células do suspensor começam a ser eliminadas por MCP. Embriões cotiledonares são formados após seis semanas em meio de cultura contendo ABA (von Arnold *et al.*, 2002; Boshkov *et al.*, 2005).

Todas as etapas da embriogênese somática em *P. abies* foram estabelecidas com sucesso e esta seqüência de eventos tem sido considerada um modelo de estudo da biologia do desenvolvimento em coníferas. Como descrito anteriormente neste capítulo, diversos trabalhos demonstraram que o desenvolvimento normal do embrião somático em gimnospermas requer um balanço entre células embrionárias e células do suspensor (Boshkov *et al.*, 2005, Helmerson *et al.*, 2008) para o qual o processo de MCP está

envolvido. Considerando que as MPEs de *A. angustifolia* foram submetidas diretamente ao tratamento de maturação com ABA sem a etapa de pré-maturação, foi proposto este experimento no qual pró-embriões de *P. abies* foram diretamente submetidos ao tratamento com ABA. Para elucidar o efeito do ABA sobre a morfologia e a MCP e estádios iniciais da embriogênese em *P. abies*, MPEs foram expostas a diferentes concentrações de ABA antes do desenvolvimento de embriões iniciais. A suplementação de ABA nesta fase afetou a morfologia e a MCP promovendo aberrações morfológicas em embriões iniciais.

2.3.4.2. Tratamento com ABA durante o estádios iniciais da embriogênese induzem morfologias anormais do embrião

Após uma semana de exposição ao ABA (0, 10, 20, 30 e 60 μM) adicionado em meio líquido durante a proliferação, não foram observadas diferenças morfológicas nas PEMs, mas a frequência de embriões somáticos iniciais aumentou comparativamente a a ausência de ABA (Figura 9). Este incremento não foi mantido quando as culturas foram transferidas para o meio de maturação semi-sólido suplementado com ABA (30 μM).

Após uma semana no tratamento de maturação, foram observadas e caracterizadas as diferenças morfológicas dos embriões somáticos no início da diferenciação. As morfologias aberrantes observadas foram frequentes e relacionadas à diferenciação do suspensor e das células embriogênicas. Normalmente, em *P. abies* embriões somáticos no início dos estádios finais do desenvolvimento embrionário apresentam uma massa embrionária distinta conectada ao conjunto de células do suspensor (Figura 10a). As células do suspensor não se dividem, mas se alongam resultando em um embrião individualizado formado a partir das massas pró-embriônicas (PEMs) (Larsson *et al.*, 2008). As anormalidades induzidas pelo tratamento com ABA durante a fase inicial e final

da embriogênese variaram desde um alto número de células do suspensor a células embriogênicas o qual conferia ao embrião a forma de ápice alargado (Figura 10d,e), comparado a forma cilíndrica durante o desenvolvimento normal (Figura 10a). O alto número de células de suspensor culminou no desenvolvimento de embriões solares com total ausência de polaridade (Figura 10 g,h). Células meristemáticas na região do suspensor (Figura 10b,c) e embriões no início dos estádios tardios (Figura 10i) também foram observados, no entanto com baixa frequência não sendo quantificados devido a dificuldade de distinguir inequivocamente cada um deles. O tratamento com ABA durante a proliferação das PEMs resultou em expressivo número de embriões gêmeos (Figura 10f).

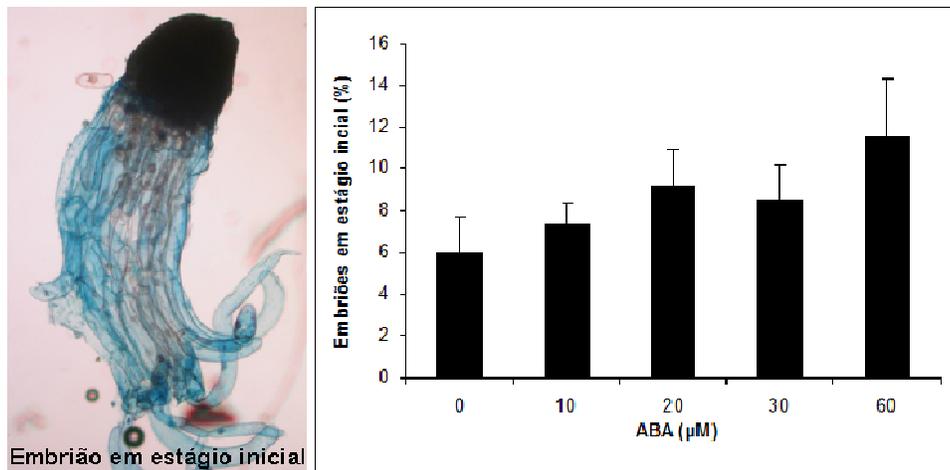


Figura 9. Frequência de embriões somáticos iniciais de *P. abies* após uma semana em meio de cultura de proliferação suplementado com ABA (0, 10, 20, 30 e 60 µM). A frequência (%) foi calculada considerando 300 massas pró-embriônicas (PEMs). Barras verticais sobre colunas representam o desvio padrão da média.

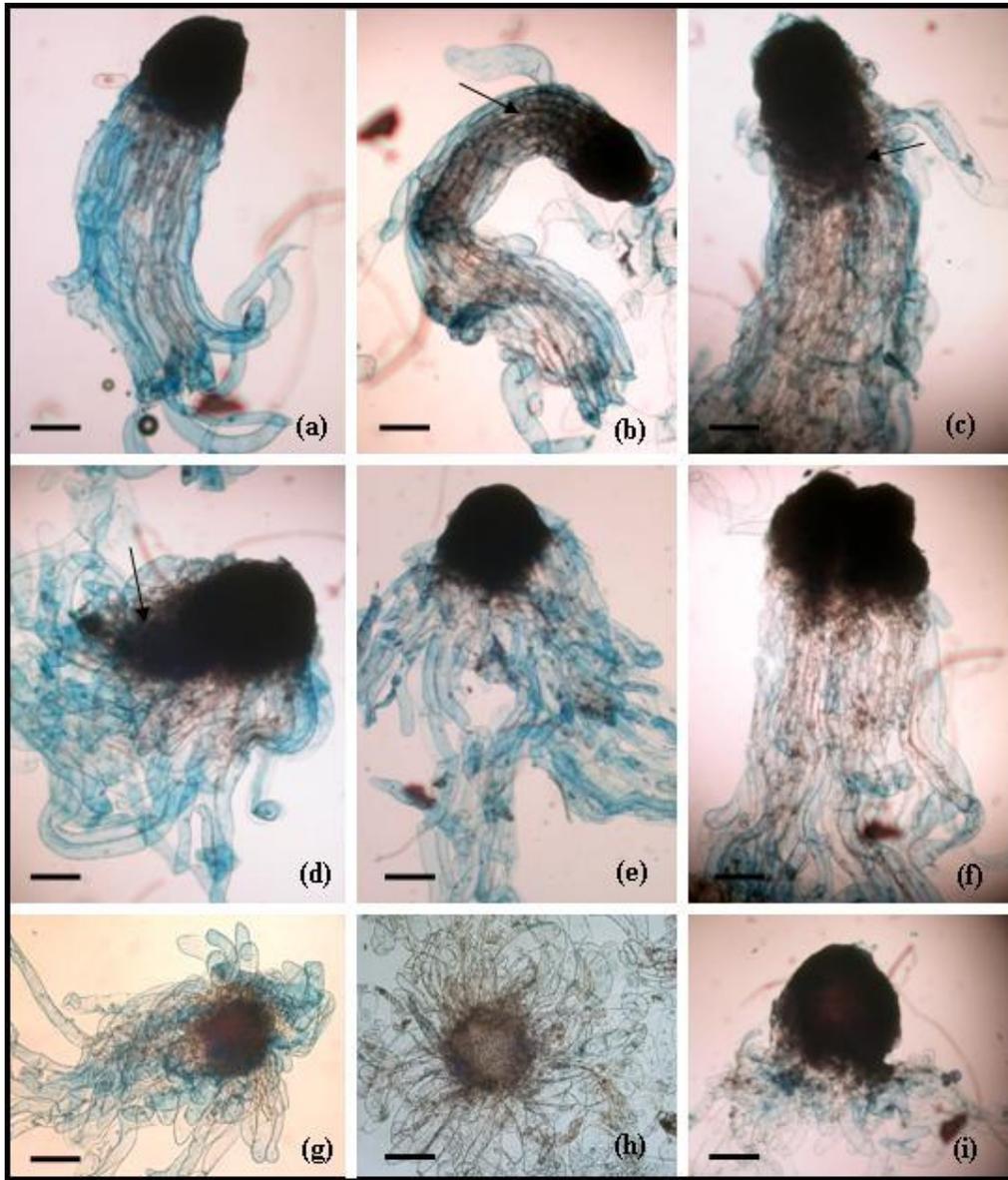


Figura 10. Caracterização das morfologias observadas nos estádios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos de *P. abies*, provenientes do meio de pré-maturação suplementado com ABA e após uma semana de exposição ao meio de cultura de maturação. a) embrião somático inicial normal; b,c) embrião somático com presença de células embriogênicas na região do suspensor; d,e) embrião somático com ápice alargado e um supranumerário grupo de células do suspensor; f) embriões gêmeos; g,h) embrião solar com total ausência de polaridade formado por um grupo de células embriogênicas circundado por células dos suspensor; i) embrião em estágio de desenvolvimento tardio com a região embriogênica deformada. (Barras 100 μ m)

Dentre as morfologias observadas foram quantificadas as aberrações morfológicas mais freqüentes. A maior freqüência de embriões somáticos normais (22,4%) foi observada no tratamento controle isento de ABA. A menor freqüência de embriões somáticos normais (8,1%) foi observada no meio de cultura suplementado com ABA (30 μ M) (Tabela 2). A baixa freqüência de embriões somáticos normais nas culturas suplementadas com ABA durante a proliferação em relação ao controle pode ser atribuído ao longo tempo de exposição das culturas ao ABA durante a proliferação. Esta exposição pode ter alterado o balanço entre as células embrionárias e de suspensor e, conseqüentemente, a polaridade normal dos embriões. Um claro efeito do tratamento com ABA nesta fase da embriogênese foi o incremento de embriões com ápice alargado (34,5%) e morfologia solar (44,7%), especialmente nos tratamentos (ABA 30 e ABA 20, respectivamente). Este incremento pode ter se refletido posteriormente no menor número de embriões somáticos maduros. Altas freqüências de embriões com ápice alargado (32,3%) e morfologia solar (42,1%) foram também observadas no tratamento com ABA 60 μ M, comparativamente à freqüência de embriões normais (13,1%) (Tabela 2). Estas duas morfologias estão possivelmente associadas ao fato de que embriões com ápice alargado são estádios iniciais de embriões com morfologia solar. Estes embriões perdem completamente a polaridade e seguem o processo de proliferação como MPEs. Estes resultados indicam que elevadas concentrações de ABA nas fases iniciais da embriogênese alteram a morfologia inicial dos embriões conduzindo a anormalidades durante os estádios tardios do desenvolvimento (Figura 11 a-f). Observou-se que após três semanas de cultivo em meio de maturação o desenvolvimento ocorreu de forma dessincronizada (Figura 11 c,d). Nas semanas seguintes foram observadas anormalidades no número de cotilédones (Figura 11e) e alongamento do hipocótilo (Figura 11 f).

Tabela 2. Frequência das diferentes morfologias observadas em embriões somáticos de *P. abies* após uma semana em meio de cultura suplementado com ABA (30 μM). As culturas eram provenientes do meio de pré-maturação suplementado com ABA (0, 10, 20, 30 e 60 μM).

Morfologia do embrião	Tratamento (μM)				
	ABA 0	ABA 10	ABA 20	ABA 30	ABA 60
Normal ^(a)	22,4 \pm 1,6	11,2 \pm 1,9	8,1 \pm 2,1	9,7 \pm 1,9	13,7 \pm 0,5
Gêmeos ^(t)	19,7 \pm 2,1	15,3 \pm 2,9	16,2 \pm 2,5	13,9 \pm 2,2	11,1 \pm 2,1
Ápice largo ^(d,e)	29,3 \pm 1,5	29,3 \pm 1,9	31,1 \pm 1,5	34,5 \pm 0,5	33,2 \pm 2,1
Solar ^(g,h)	28,6 \pm 0,0	44,2 \pm 2,6	44,7 \pm 1,9	42,0 \pm 1,6	42,1 \pm 1,8

Frequência (%) foi calculada considerando 300 massas pró-embriônicas (PEMs). Letras representam as morfologias dos embriões somáticos observados e ilustrados na Figura 10.

A habilidade de células vegetais responderem as diferentes condições de cultivo *in vitro* para continuar dividir-se ou diferenciar-se é associada à ativação seletiva e diferencial de genes (reprogramação celular), o qual caracteriza a epigênese (Zhang *et al.*, 2009). Mecanismos epigenéticos permitem a estabilização de um dado perfil gênico o qual determina a auto-renovação e diferenciação celular. Este mecanismo pode determinar a base molecular para o controle da capacidade de desenvolvimento e do grau de liberdade das células meristemáticas (Verdeil, 2007). Assim a diferenças morfológicas observadas em *A. angustifolia* e *P. abies*, assim como, a manutenção da capacidade de autoreplicativa de células embriogênicas de *A. angustifolia* e *P. sylvestris* podem ser resultados de alteração no programa genético de desenvolvimento dos embriões. Estas alterações podem ser temporais e promovidas pelas condições de cultivo *in vitro* o qual sugere ser resultado da regulação epigenética.



Figura 11. Desenvolvimento de embriões somáticos de *P. abies*, provenientes do meio de pré-maturação suplementado com ABA, após exposição ao meio de cultura de maturação suplementado com ABA (30 μ M). a) embriões somáticos iniciais após uma semana; b) embriões somáticos iniciais após duas semanas; c,d) desenvolvimento dessincronizado dos embriões somáticos após três e quatro semanas respectivamente; e) embrião somático cotiledonar normal, embrião somático globular anormal após cinco semanas; f) embrião somático anormal com hipocótilo super alongado após seis semanas em meio de maturação. (Barras 200 μ m).

2.3.4.3. Morfologias anormais evidenciam aumento da frequência de células TUNEL positivas embrionárias e de suspensor

A frequência de células positivas ao TUNEL foi diretamente proporcional a concentração de ABA suplementada ao meio de cultura durante a proliferação das MPEs. Os tratamentos com ABA 30 μ M e ABA 60 μ M resultaram em embriões com maior número de células positivas ao TUNEL comparativamente ao tratamento controle ABA 0 μ M (Figura 12). Além disso, embriões somáticos com morfologia solar apresentavam maior número de células positivas ao TUNEL comparativamente as demais morfologias (Figura 13). Embriões somáticos normais apresentavam somente células do suspensor positivas ao TUNEL (Figura 13a,b,c), enquanto que as morfologias de embriões com ápice alargado (Figura 13g,h,i) e solar (Figura 13j,k,l) apresentavam TUNEL positivo tanto nas células de suspensor quanto embrionárias. A frequência de TUNEL positiva em embriões gêmeos não foi diferente das demais morfologias. Contudo, foi observada uma tendência de que todas as morfologias anormais apresentam maior frequência de MCP tanto em células do suspensor como em células embrionárias contribuindo para o anormal desenvolvimento do embrião em *P. abies*.

Normalmente o desenvolvimento do embrião de *P. abies* apresenta dois principais picos de MCP. O primeiro deles durante o tratamento de pré-maturação em meio de cultura isento de fitorreguladores, correlacionado com o a transição das MPEs para embriões somáticos. O segundo pico foi observado durante o início da maturação dos embriões somáticos envolvido na eliminação de células do suspensor (Footitt et al., 2003). Assim os resultados do presente trabalho indicam que a suplementação de ABA durante a embriogênese inicial não somente promove aberrações morfológicas, mas também afeta o processo de MCP.

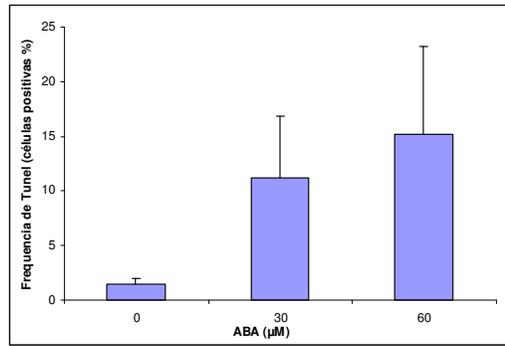


Figura 12. Teste de TUNEL em estádios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos de *P. abies*, provenientes do meio de pré-maturação suplementado com ABA e após uma semana de exposição ao meio de cultura de maturação. Frequência de células positivas ao TUNEL foi baseada no número total de núcleos corados com DAPI dentro de cada embrião. Barras verticais sobre colunas representam o desvio padrão da média

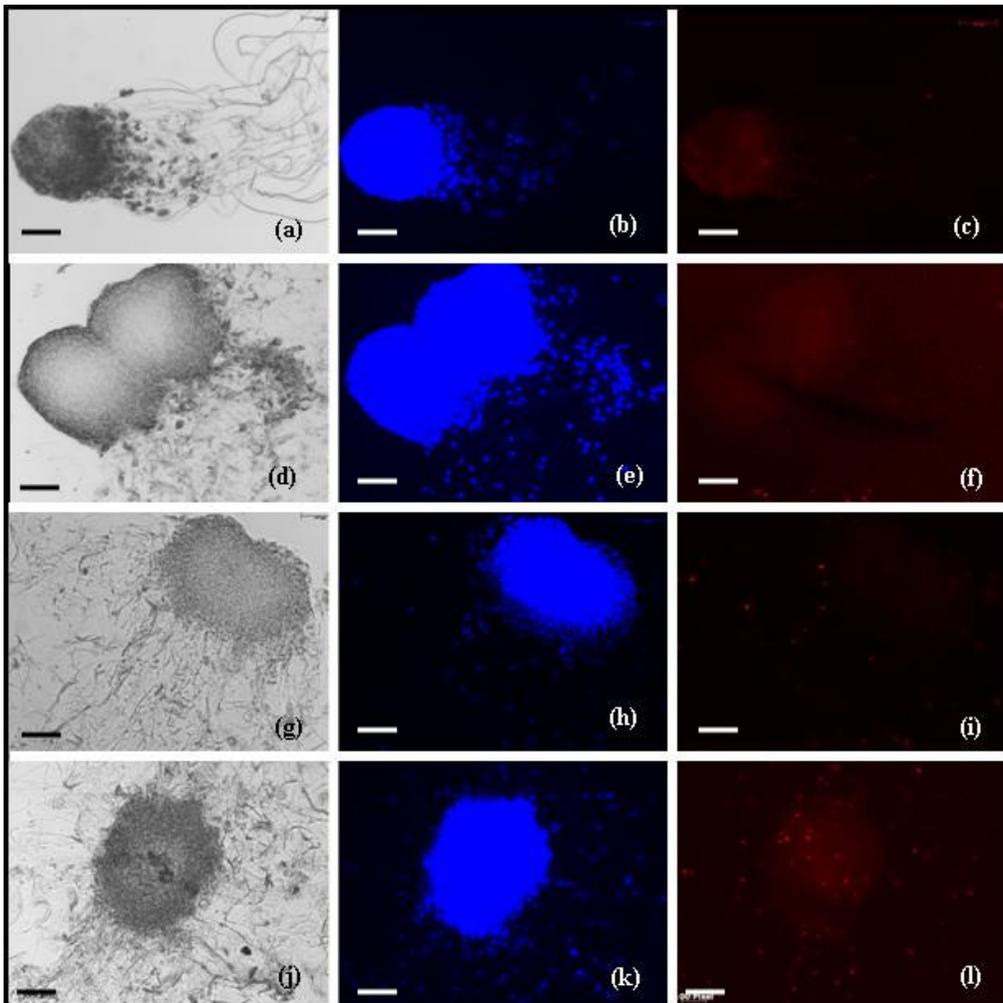


Figura 13. ABA induz morfologia anormal em embriões somáticos de *P. abies* durante a fase inicial do desenvolvimento e aumenta o número de células TUNEL positivas. Imagens de em microscopia de luz clara das diferentes morfologias do embrião normal (a), gêmeos (d), ápice largo (g) e solar (j). Os mesmos embriões foram observados com coloração para DAPI (b, e, h, k) e TUNEL(c, f, i, l).

2.3.5. Efeito de Fluoridone no desenvolvimento inicial de embriões somáticos de *P. sylvestris*

2.3.5.1. Desenvolvimento de embriões somáticos de *P. sylvestris*

A proliferação das culturas embriogênicas em *P. sylvestris* ocorreram em meio de cultura suplementado com fitorreguladores especialmente auxinas e citocininas. Culturas embriogênicas foram constituídas de uma mistura de células pequenas e meristemáticas com células do suspensor que são alongadas e vacuoladas. Estas células formavam agregados celulares os quais proliferam-se incrementando de tamanho seguido de fragmentação. A retirada destes fitorreguladores do meio de cultura promoveu o início da diferenciação dos embriões somáticos. Contudo, a progressão destes embriões somente ocorreu após a exposição ao ABA. As culturas embriogênicas continuaram a proliferar-se em meio de cultura livre de fitorreguladores e também em meio contendo ABA resultando em um lento e dessincronizado desenvolvimento dos embriões somáticos comparativamente a *P. abies*. Nesta espécie, os embriões somáticos que até o início da embriogênese final podem iniciar novamente a proliferação o qual resultou na formação de novos embriões ou regressão para o estágio de MPEs, semelhante ao observado em *A. angustifolia*. Além disso, embriões no início da embriogênese final apresentaram células embriogênicas na região do suspensor. Os embriões maduros apresentam anormalidades no número de cotilédones formados assim como no estabelecimento dos meristemas (Abrahamson & von Arnold, 2008 comunicação pessoal).

Em *P. abies* a suplementação de ABA na embriogênese inicial provocou aberrações na morfologia dos embriões e no programa de MCP. Considerando estes resultados culturas embriogênicas de *P. sylvestris* foram submetidas a diferentes concentrações de Fluoridone, que é um inibidor de ABA, durante a proliferação buscando

estimular a diferenciação de estádios iniciais do desenvolvimento do embrião somático antes da exposição ao ABA.

2.3.5.2. Fluoridone promove a diferenciação dos estádios iniciais do desenvolvimento dos embriões somáticos em *P. sylvestris*

Das duas culturas embriogênicas utilizadas inicialmente, a cultura 12:12 apresentou proliferação inicial de MPEs e posteriormente degeneração dos embriões somáticos. Esta cultura não foi responsiva ao tratamento com Fluoridone durante a proliferação assim como a suplementação de ABA durante a maturação (dados não apresentados). Para a cultura 3:10, após uma semana na presença de Fluoridone em meio de pré-maturação, foi observado um aumento no número de embriões somáticos individualizados por meio do alongamento de células do suspensor (Figura 15b). A frequência de embriões iniciais nos tratamentos Fluoridone (15, 30 e 60 μM) foi quatro vezes maior em relação ao tratamento controle (Figura 14 a). Nos tratamentos suplementados com Fluoridone foi observado que os embriões somáticos foram individualizados a partir das MPEs por meio do alongamento das células do suspensor (Figura 14 a1 e 15b).

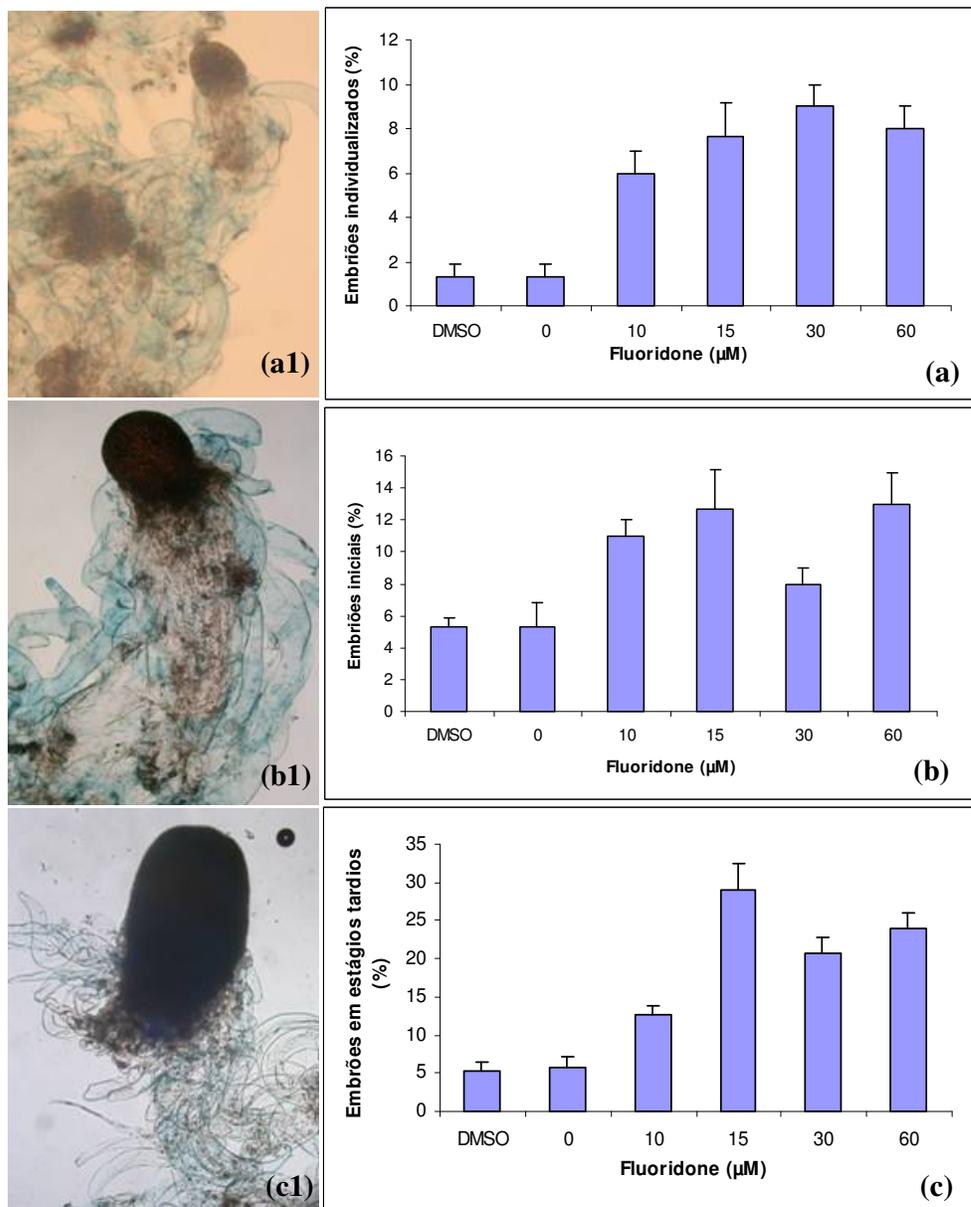


Figura 14. Efeito de Fluoridone no desenvolvimento de embriões iniciais e tardios de *P. silvestrys*. (a,a1) freqüência de embriões somáticos individualizados após duas semana em meio de cultura de pré-maturação suplementado com Fluoridone (0, 10, 15, 30 e 60 μM); (b,b1) freqüência de embriões somáticos iniciais uma semana após transferência em meio de cultura de maturação com ABA (60 μM); (c,c1) freqüência de embriões somáticos tardios 4 semanas após transferência em meio de cultura de maturação com ABA (60 μM). A freqüência (%) foi calculada considerando 300 massas pró-embriônicas (PEMs). Barras verticais sobre colunas representam o desvio padrão da média

As culturas provenientes do meio de proliferação com Fluoridone foram submetidas ao tratamento de maturação com ABA (60 μ M). Após uma semana neste tratamento foi observado que o incremento da frequência de embriões somáticos iniciais (Figura 15 c,d) foi mantido. As culturas provenientes dos tratamentos com Fluoridone (10, 15 e 60 μ M) apresentaram uma frequência significativamente superior ao tratamento controle (Figura 14b). No entanto foi observado que o tratamento com Fluoridone (30 μ M) apresentou uma redução na frequência dos embriões somáticos, porém, com valores significativamente superiores ao tratamento controle (Figura 14b). Adicionalmente, os embriões observados neste experimento apresentaram o ápice embrionário (ae) cilíndrico conectado a um longo e alinhado conjunto de células do suspensor (cs) (Figura 14b1). Comparativamente a *P. abies* descrito no item anterior, este seria o padrão de desenvolvimento normal durante a fase inicial dos embriões somáticos. A redução de ABA nas culturas durante o tratamento de pré-maturação promoveu a individualização e o aumento do número de embriões em estádios iniciais de desenvolvimento.

No início da embriogênese final após duas semanas em ABA (60 μ M) as culturas provenientes do tratamento com Fluoridone não apresentavam aberrações morfológicas nos embriões; contudo, apresentaram um incremento na frequência (dados não apresentados) de embriões somáticos gêmeos (Figura 15 e). O efeito do tratamento com Fluoridone durante a proliferação foi mantido também durante o início da fase final do desenvolvimento dos embriões somáticos. A mais alta frequência de embriões tardios (29%) foi observada no tratamento Fluoridone 15 μ M diferindo significativamente dos tratamentos com Fluoridone 30 e 60 μ M, com 23% e 26%, respectivamente (Figura 14 c). Adicionalmente todas as culturas previamente tratadas com Fluoridone apresentaram uma frequência significativamente superior do número de embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento (Figura 15 f,g,h), comparativamente ao tratamento controle.

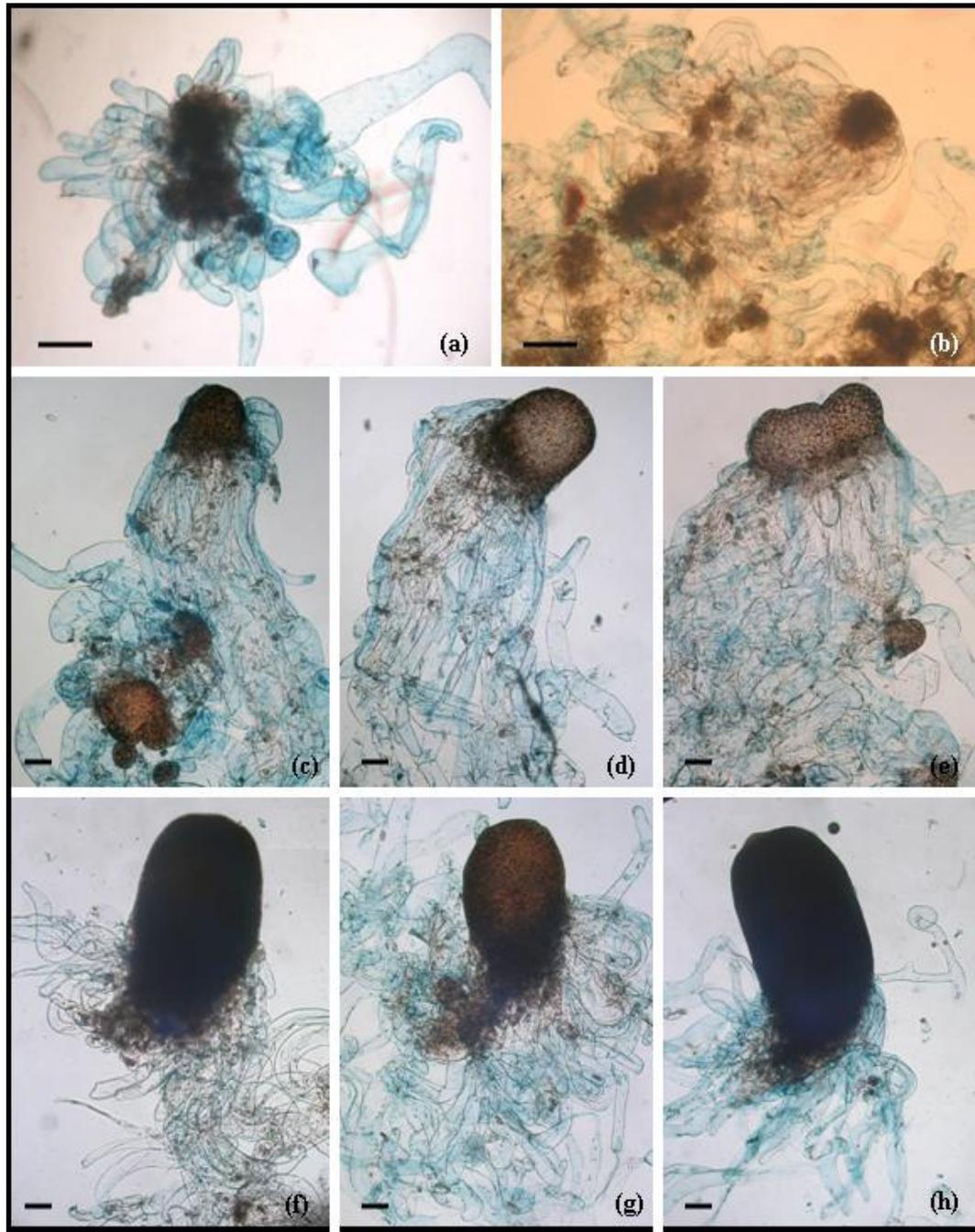


Figura 15. Modificações morfológicas avaliadas por meio da dupla coloração com carmim acético e azul de Evans durante o desenvolvimento de embriões somáticos de *P. silvestrys*. (a) MPES durante a proliferação; (b) individualização do embrião pelo alongamento das células do suspensor após uma semana em meio de pré-maturação com Fluoridone (15 μM); (c,d,e) embriões somáticos iniciais e gêmeos após uma semana em meio de maturação com ABA (60 μM); (f,gh) embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento após quatro semanas em meio de maturação com ABA (60 μM) .

2.3.5.3. Os estádios tardios de desenvolvimento do embrião somático de *P. sylvestris* mantêm a capacidade autoreplicativa

Apesar do efeito significativo do pré-tratamento com Floridone durante as fases iniciais da embriogênese o desenvolvimento de embriões somáticos de *P. sylvestris* ocorreu de forma dessincronizada (Figura 16). Células localizadas na base dos embriões somáticos tardios apresentaram reação ao carmim acético o qual é um indicativo da presença de células meristemáticas (Figura 15f,g). Estas células não se tornaram completamente determinadas para a formação de embriões somáticos mantendo a totipotencialidade e a capacidade de proliferação indeterminada. Após seis semanas em meio de cultura com ABA foi observada a progressão dos embriões somáticos para os estádios tardios do desenvolvimento (Figura 16 e,f). Neste período foi observada a proliferação de embriões somáticos iniciais sobre os embriões em estádios tardios do desenvolvimento (Figura 16 e,f). Após oito semanas em meio de cultura com ABA a diferenciação de embriões somáticos cotiledonares foi similar a morfologia dos embriões zigóticos. Contudo os embriões apresentavam baixo número de cotilédones e o estabelecimento dos meristemas não foi evidente (figura 16g,h). Concomitante a diferenciação de embriões cotiledonares foi observada a presença de embriões somáticos em estádios iniciais do desenvolvimento (Figura 16 g,h).

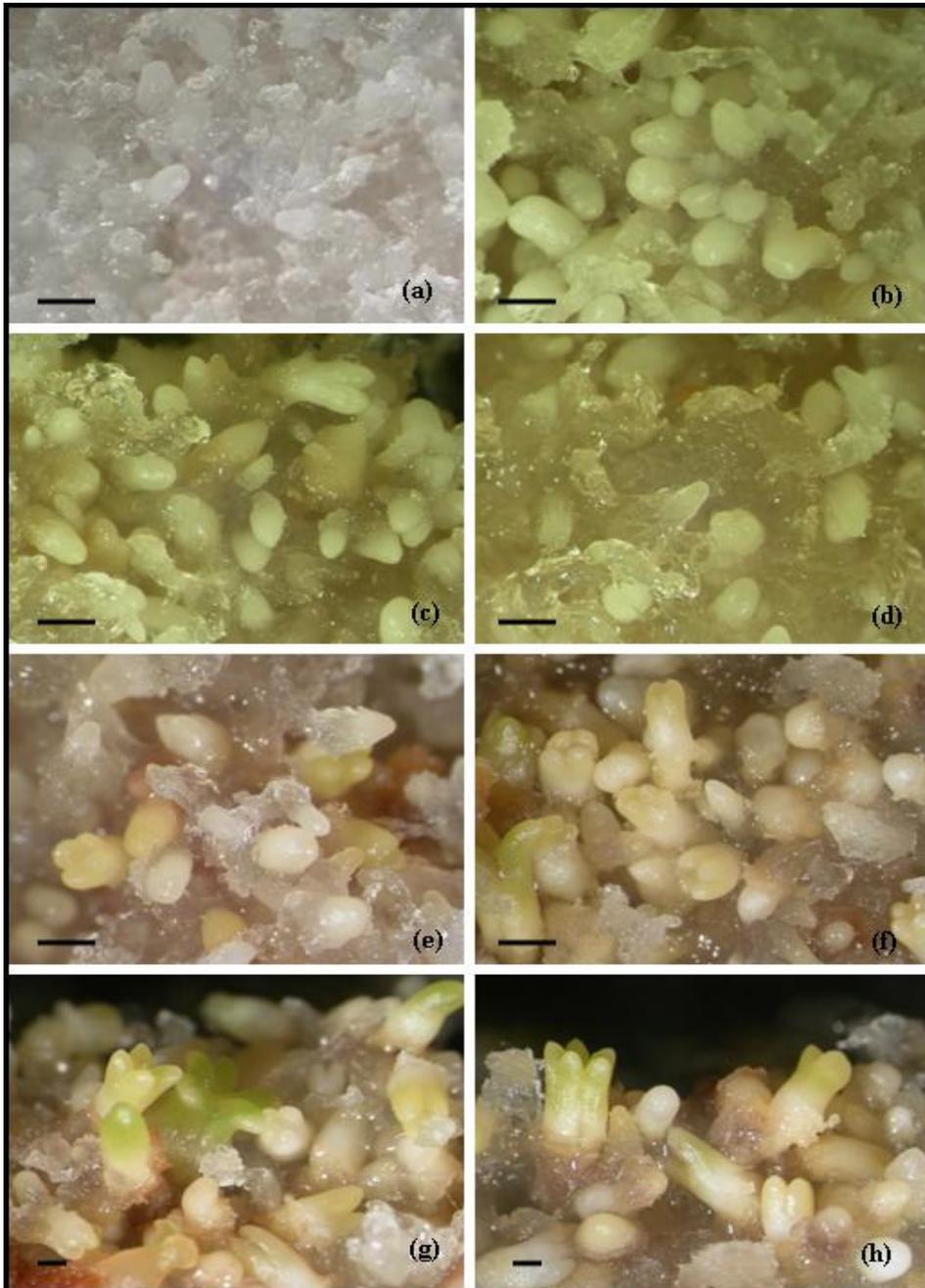


Figura 16. Desenvolvimento de embriões somáticos de *P. silvestrys* provenientes do meio de pré-maturação suplementado Fluoridone (0, 10, 15, 30 e 60 μM) e após transferência para o meio de cultura de maturação suplementado com ABA (60 μM). a) embriões somáticos iniciais após uma semana; b) embriões somáticos iniciais após duas semanas; c,d) desenvolvimento dessincronizado dos embriões somáticos após quatro semanas; e,f) desenvolvimento de embriões somáticos iniciais sobre os embriões somáticos tardios pré-cotiledonares após seis semanas; g,h) embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento após oito semanas em meio de maturação.

2.3.6. Conclusões

Analisando os sistemas celulares estudados é possível identificar diferentes tipos morfológicos associados ao efeito do ABA durante a proliferação de embriões somáticos de *P. abies* assim como o efeito do Fluoridone nos estádios iniciais do desenvolvimento do embrião em *P. silvestris*. O ABA promoveu aberrações morfológicas nos embriões somáticos iniciais e aumentou o número de células positivas ao teste de TUNEL em *P. abies*. Já o Fluoridone promoveu um incremento da individualização dos embriões com morfologia normal nos estádio iniciais em *P. silvestris*. Adicionalmente, em *P. silvestris* o desenvolvimento dos embriões foi dessincronizado e após seis semanas em meio de cultura com ABA algumas estruturas regridem para os estádios de proliferação celular.

O modelo de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia* se inicia com a formação de MPEs constituídas por um grupo de células embriogênicas conectadas a células de suspensor (Figura 4 A, B). Após 30 dias no tratamento de maturação formam-se embriões somáticos globulares iniciais constituídos por grupos embriogênicos coesos e por células de suspensor (Figura 4 C). Nesta etapa auxinas e citocininas são completamente retiradas do meio de cultura e são substituídas por ABA, maltose e PEG. Nestas mesmas condições após 60 dias de cultura observa-se a formação de embriões somáticos globulares tardios (Figura 4 D) validando os resultados observados por Steiner, (2005). Até o presente momento a embriogênese somática em *A. angustifolia* é obtida a partir de embriões somáticos imaturos. A proliferação das culturas embriogênicas ocorre em meio de cultura suplementado ou não com fitorreguladores. A ausência de fitorreguladores no meio de cultura caracteriza o estabelecimento de culturas denominadas autônomas.

A morfologia estudada em *A. angustifolia* foi semelhante ao sistema apresentados em *P. abies* e *P. sylvestris*. No entanto, identificam-se anormalidades na morfologia do

embrião somático durante as etapas iniciais do desenvolvimento. Em *A. angustifolia* são observados embriões com morfologia solar e ápice largo semelhante aqueles observados quando o modelo de *P. abies* é perturbado por ABA. Além disso, detecta-se a presença de células meristemáticas na região do suspensor em todos os estádios iniciais do desenvolvimento. A MCP ocorre somente no início da embriogênese final e não nos estádios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos. Observa-se MCP nos dois tipos celulares de *A. angustifolia*, tanto em células embriogênicas quanto em células do suspensor, detectando-se que a comunicação celular via plasmodesma é mantida durante este processo. Sugere-se que estas estruturas com morfologias anormais não progridem para os estádios de desenvolvimento tardio e regridem para o estágio de MPEs (Figura 4 C). Considerando estes resultados e baseado no sistema modelo de *P. abies* é necessária a realização de estudos associados ao balanço e transporte endógeno de auxina, os quais conferem a bipolaridade do embrião, essencial nas etapas iniciais. Além disso, a redução de componentes endógenos inibidores do processo de MCP também deve ser considerada. Assim os resultados obtidos sugerem que uma etapa de pré-maturação (ponto crítico 1- Figura 4) deve ser estabelecida em *A. angustifolia* visando à individualização e desenvolvimento de embriões somáticos iniciais com morfologia normal antes da exposição a um meio de cultura de maturação suplementado com ABA. O segundo ponto crítico (PC2 – Figura 4) refere-se as condições de cultivo que promovam o desenvolvimento normal dos embriões individualizados para estádios tardios do desenvolvimento, o qual no atual protocolo é observado em baixa frequência.

CAPÍTULO II

Análise proteômica durante a embriogênese somática de *A. angustifolia*

3.1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos diversos estudos vêm sendo realizados buscando caracterizar a dinâmica de proteínas durante o desenvolvimento vegetal, associado à caracterização do genoma e transcriptoma (Chen & Harmon 2006; Gallardo *et al.*, 2007; Baginski, 2009). A análise proteômica pode gerar informação relevante para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de desenvolvimento (Rossignol *et al.*, 2006). Para algumas espécies de coníferas o padrão de acúmulo de proteínas de reserva durante o desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos é similar e pode ser utilizado como marcador molecular do desenvolvimento embrionário destas espécies (Hakman, 1993). A caracterização do perfil e da dinâmica de proteínas torna possível analisar comparativamente o desenvolvimento do embrião *in vivo* e *in vitro* (Finnie *et al.*, 2002). Neste sentido, também análises relacionadas ao metabolismo de proteínas, aminoácidos e hormônios tem sido utilizados para estabelecer marcadores bioquímicos e moleculares para estádios específicos do desenvolvimento embrionário em espécies florestais (Silveira *et al.*, 2004a,b; Tun *et al.*, 2006; Santa Catarina *et al.*, 2006; Steiner *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2007; Steiner *et al.*, 2008).

As principais proteínas presentes nas sementes são as proteínas LEA e proteínas de reserva. As proteínas LEA são sintetizadas após a histodiferenciação do embrião e conferem tolerância a desidratação que ocorre no final do desenvolvimento da semente (Bewley & Black, 1994; Sallandrouze *et al.*, 2002). As proteínas de reserva são responsáveis pelo suprimento de N orgânico e de aminoácidos durante a germinação e crescimento da plântula para a síntese de proteínas estruturais e enzimáticas, essenciais para o metabolismo celular normal (Higgins, 1984; Shewry *et al.*, 1995). Proteínas de reserva também tem sido consideradas marcadores do processo de maturação em embriões zigóticos de gimnospermas e angiospermas (Dunstan *et al.*, 1998). Nas coníferas, tanto

embriões somáticos quanto embriões zigóticos acumulam proteínas de reserva em abundância durante a fase de maturação dos embriões (Hakman *et al.*, 1993).

A dinâmica de proteínas nos sistemas biológicos é influenciada por vários fatores internos e externos. A análise proteômica permite avaliar mudanças simultâneas e classificar o padrão temporal de acúmulo de proteínas que ocorrem durante os processos de desenvolvimento, entre os quais a embriogênese (Skylas *et al.*, 2000; Bove *et al.*, 2001).

Estudos referentes ao controle do processo de maturação em embriões somáticos requerem um melhor entendimento das mudanças estruturais nos tecidos ativos na acumulação de substâncias de reserva (Hakman, 1993; Lippert *et al.*, 2005), assim como a identificação de proteínas marcadoras para situações específicas, tais como a diferenciação celular e respostas celulares a estímulos externos diversos (Wilkins *et al.*, 1997).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar e caracterizar o perfil de expressão de proteínas por meio da análise proteômica durante diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

As análises proteômicas foram realizadas durante três diferentes estádios de desenvolvimento (pró-embrionário, embriogênese inicial e final) do embrião somático de *A. angustifolia*. Foram utilizadas culturas embriogênicas induzidas a partir de embriões zigóticos imaturos no período 2006/2007. O estádio pró-embrionário foi proveniente da etapa de proliferação. Os estádios embrionário inicial e embrionário tardio, foram provenientes de dois períodos da etapa de maturação (30 e 60 dias após a inoculação, respectivamente) sendo armazenadas em freezer (-20°C) até a posterior utilização nas análises.

Durante a etapa de proliferação as culturas embriogênicas foram subcultivadas com intervalos de 20 dias em meio de cultura BM (Gupta & Pulman, 1991) suplementado com L-glutamina (1 g.L⁻¹), mio-inositol (1 g.L⁻¹), caseína hidrolisada (0,5 g.L⁻¹) e sacarose (3% p/v), 2,4-D (2µM), BAP e Kin (0,5µM cada). Durante a etapa de maturação as culturas embriogênicas foram inoculadas em placas de petri contendo 25 mL de meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) acrescido de PEG 4000 (7%), maltose (9% v/v), carvão ativado 1,5 g.L⁻¹ e ABA (150µM). A L-glutamina (1 g.L⁻¹), mio-inositol (1 g.L⁻¹), caseína hidrolisada (0,5 g.L⁻¹) e o ABA foram filtro-esterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem. Em todas as etapas o pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0,5N) e HCl (0,5N) antes da adição do phytigel (2,5 g/L⁻¹). As culturas foram mantidas no escuro a uma temperatura de 25 ± 2°C.

3.2.2. Extração e quantificação de proteínas

O experimento foi conduzido utilizando-se três amostras de 500 mg de matéria fresca (MF) de cada estágio de desenvolvimento dos embriões. A extração foi realizada de acordo com metodologia descrita por Natarajan *et al.* (2005). As amostras foram maceradas em 1,2 mL de tampão de extração Uréia/Tiouréia contendo Uréia (7M), Tiouréia (2 M), ditioneitol (DTT) (1%), Triton 100 (2%), Pharmalyte[®] (GE Healthcare[®]) (0,5%), Fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF) (1 mM) e Pepstatina (5 µM). Após, as amostras foram agitadas em vortex por 5 min e, posteriormente, centrifugadas por 5 min a 12000 g a 4°C. O sobrenadante contendo a fração protéica foi coletado e armazenado a -20°C até a quantificação de proteínas e preparação dos géis bidimensionais. Impurezas foram removidas dos extratos protéicos através da precipitação com ácido tricloroacético (TCA) (100%) de acordo com Silveira *et al.* (2007). Amostras foram incubadas em 10% v/v de TCA (100%) durante 30 min. a 4°C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 8 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi submetido a três lavagens com acetona gelada intercaladas por centrifugações a 10.000 g por 5 min a 4°C. Após a última lavagem a acetona foi descartada com cuidado e o tubo de polipropileno (1,5 mL) foi mantido aberto para secagem do “pellet” ao ar por pelo menos 3 min, até o tubo de polipropileno secar. Em seguida o *pellet* foi solubilizado em 200µl de tampão de extração uréia/ tiouréia (Natarajan *et al.*, 2005) e centrifugado a 10000g por 5 min. a 4°C. O sobrenadante contendo a fração protéica foi coletado e armazenado a -20°C até o momento da análise em gel 2-DE. Foram preparados três géis para cada amostra. A concentração de proteínas foi determinada utilizando o método do 2D-Quanti Kit (GE-Healthcare[®]). Albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão.

3.2.3. Eletroforese bidimensional (2-DE)

Alíquotas do extrato protéico contendo 200 µg de proteína foram concentradas através da precipitação em TCA 10% (v/v) conforme descrito no item 2.2.2. O “pellet” resultante foi solubilizado em 375 µL de tampão de reidratação (Uréia (7M), Tiouréia (2 M), CHAPS (2%), (gradiente de proteínas imobilizado) IPG Buffer (pH 4-7) (0,5%), DTT (1%) e azul de bromofenol (0,002%). Amostras foram aplicadas em tiras de gel IPG (gradiente imobilizado pH) 11 cm com escala linear de separação, pH 4-7 (GE Healthcare[®]) e mantidas em reidratação por 12 h a 20 °C em IPGphor II (GE Healthcare[®]). Após reidratação, foi iniciada a focalização isoelétrica (IEF) em uma unidade IPGPhor (GE-Healthcare[®]), a 20 °C com corrente elétrica limitada a 50 mA/IPG. O ajuste de voltagem foi de 500 V a 0.5 kVh, 1.000 V a 0.8 kVh, 8.000 V a 13.5 kVh e 8.000 V a 20 kVh conforme recomendação do fabricante. Antes de iniciar a análise em segunda dimensão, as tiras de gel IPG foram reduzidas por 20 min em 3 mL de tampão de equilíbrio (Tris-HCl (50mM), Uréia (6M), glicerol (30%), SDS (2%), azul de bromofenol (0,002%) contendo DTT (125mM), seguido de alquilação por 20 min em 3 mL de tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida (125 mM). A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 12%, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Foi utilizado o sistema Protean II (Bio-Rad[®]), acoplado a um sistema de resfriamento MultitempII (GE-Healthcare[®]) a 15°C. A separação eletroforética foi conduzida a 12.5 mA/gel por 50 min e 25 mA/gel até o Azul de Bromofenol atingir a base inferior do gel. Marcador de peso molecular (Bio-Rad[®]) com 6 bandas de proteína entre 14 e 94 kDa foi utilizado como padrão.

As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com Comassie de acordo com Westermeier *et al.* (2002). Os géis foram incubados durante uma noite em solução de fixação contendo metanol (50%), ácido acético (12%) e água destilada (38%). Após, os

géis foram incubados por 12 h em solução de Azul de Coomassie Coloidal G-250 em tiosulfato de sódio (0,02%) seguidos de três lavagens de 1 min em H₂O Milli-Q. Após, os géis foram submergidos em Tris base 0,1M com pH 6,5 por 3 min e incubados com sulfato de amônio 20%. Os géis foram descorados com ácido acético 1% (v/v) e armazenados em ácido acético (1%) até a análise de imagens.

3.2.4. Análise do gel

Os géis foram digitalizados com Image Scanner (GE-Healthcare[®]) e analisados no programa Image Master Platinum (GE-Healthcare[®]). Foi utilizado o termo “*spot*” para designar peptídeos observados nos géis. A autenticidade e o contorno de cada “*spot*” de proteína foram validados e editados por inspeção visual em todas as repetições de cada estágio de desenvolvimento. Avaliou-se o número, a porcentagem de volume e distribuição dos “*spots*”. As proteínas foram consideradas diferencialmente expressas quando exibida uma variação de ± 2 vezes e foram consideradas significativas pelo teste Tukey com 95% de significância.

Para visualizar a diferença de expressão dos volumes nos diferentes estádios da embriogênese, foi construída uma matriz de similaridade das proteínas identificadas durante as diferentes fases da embriogênese com base na distância euclidiana, usando o software GENESIS (versão 1.7.2 Graz University of Technology, Institute for Genomics and Bioinformatic, Áustria, (www.genome.tugraz.at)).

3.2.5. Digestão dos spots

A metodologia seguida para a digestão com tripsina foi descrita por Westermeier *et al.* (2002). Os “*spots*” foram manualmente recortados géis e colocados em tubos de polipropileno de 0,5 mL. Foi adicionada a solução de descoloração com acetonitrila (50%)

e bicarbonato de amônio (25 mM) por 1h na temperatura ambiente ou até a remoção do corante. As amostras foram desidratadas com acetonitrila (100%) por 2 min e mantidas em bomba de vácuo 5 min. Para reidratação foi utilizado 10 µL de solução de tripsina (10 µg.mL⁻¹ de Tripsina Promega, Madison, USA) em bicarbonato de amônio (25mM), pH 8. A digestão foi realizada durante a noite a 37°C. Para a remoção dos peptídeos do gel adicionou-se 30 µL de solução de extração (50% acetonitrila, 5% Trifluoracético - TFA), homogeneizado no vortex por 30 min a temperatura ambiente e o homogenizado foi coletado em novos tubos tipo eppendoff de 500 µL.

3.2.6. Análise em espectrômetro de massa e interpretação dos dados

A identificação de proteínas foi realizada no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, com a colaboração do Prof. Dr. Emmanuel Maltempi e Prof. Dr. Luciano Huergo.

O volume obtido foi seco e depois hidratado com 2 µL da solução (4% TFA (2,5%), 75% acetonitrila (100%), 21% de água ultra pura). Foi misturado 1 µL dos peptídeos contendo TFA com 1 µL da matriz saturada (ácido α-ciano-4- hidroxibenzóico, Sigma) e aplicado na placa leitora. Os espectros MS e MS/MS foram determinados no espectrômetro de massa MALDI Tof/Tof (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) (Ultraflex, Bruker Daltonic). O equipamento foi calibrado com padrão interno de peptídeos II (Sigma). Os espectros MS e MS/MS gerados foram analisados usando o programa Flex Analysis (Bruker Daltonics). As massas dos peptídeos foram utilizadas para buscas na base de dados NCBI e SwissProt utilizando Mascot *on line* (matrixsciences.com). Os parâmetros utilizados para a aceitação da identificação foram: taxonomia: plantas verdes; enzima: tripsina; clivagem perdida: 1; modificações variáveis:

carbamidometil; modificações fixas: Oxidação Metionina; tolerância de massa do peptídeo: 100 ppm e tolerância de massa do fragmento: 0,6 Da.

3.2.7. Análise estatística

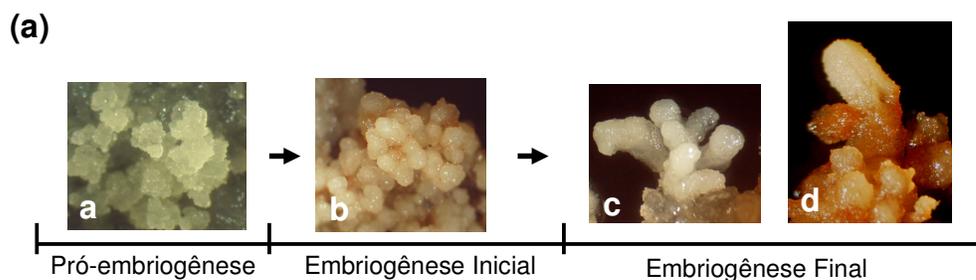
Todos os tratamentos dos experimentos da cultura *in vitro* foram realizados em triplicata. Também foram realizadas triplicatas de géis 2-DE para cada estágio de desenvolvimento do embrião. Somente foram avaliados “spots” presentes nos três géis sendo assim considerados reproduzíveis.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos

A embriogênese somática em *A. angustifolia* se inicia com a formação de PEMs constituídos por um grupo de células embriogênicas conectadas a células de suspensor o que constitui a fase pró-embriônica (Figura 1a). Após 30 dias no tratamento de maturação os proembriões se tornam individualizados das PEMs pelo alongamento do suspensor e estabelecimento da polaridade (Figura 2b). Nesta etapa os fitorreguladores, são completamente retirados do meio de cultura, o qual foi então suplementado com ABA, maltose e PEG. Nestas condições após 60 dias de cultura observou-se a formação de embriões em estádios tardios do desenvolvimento em que o ápice torna-se coeso e o suspensor em degeneração (Figura 2c,d). O perfil proteico em géis bidimensionais correspondeu a estas três fases do desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*.

Padrão de desenvolvimento de embriões somáticos em *A. angustifolia*



Tratamentos e pontos de coleta das amostras

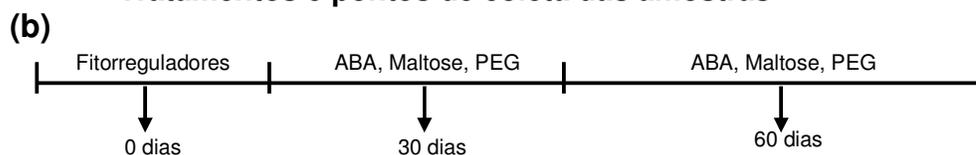


Figura 1. (a) Padrão de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia* correspondentes aos estádios de desenvolvimento utilizados neste estudo. (b) Tratamentos e períodos de coleta das amostras correspondente as diferentes fases do desenvolvimento do embrião somático (a). Amostra 1 (0 dias) - cultura embriogênica proveniente da etapa de proliferação em meio de cultura BM (Gupta & Pullmann, 1991) suplementado com 2,4-D ($2\mu\text{M}$), BAP e Kin ($0,5\mu\text{M}$ cada) contendo predominantemente pró-embriões somáticos. Amostra 2 (30 dias) - culturas embriogênicas coletadas após 30 dias de subcultivo em meio de cultura BM (Gupta & Pullmann, 1991) suplementado com ABA ($150\mu\text{M}$), Maltose (9% p/v) e PEG (7% p/v) isento de fitorreguladores contendo embriões somáticos em estádios iniciais do desenvolvimento. Amostra 3 (60 dias) - culturas coletadas após 60 dias de cultivo nas mesmas condições da amostra 2 contendo embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento.

3.3.2. Conteúdo de proteínas e perfil protéico em géis bidimensionais

A concentração de proteínas totais aumentou durante os diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático (Figura 2). Pequenas variações não significativas na concentração de proteínas durante a fase pró-embriônica e embriogênese inicial foram observadas. Já durante a embriogênese final foi a concentração de proteínas foi o dobro comparativamente aos estádios iniciais (Figura 2). Nesta mesma espécie, ao longo da embriogênese zigótica foi também observado um acúmulo de proteínas nos estádios

tardios do desenvolvimento (Balbuena *et al.*, 2009), corroborando assim os resultados do presente trabalho. Além disso, durante os estádios iniciais do desenvolvimento grande parte de proteínas são expressas continuamente devido a alta demanda de proteínas envolvidas no processo de divisão celular (Gallardo *et al.*, 2003).

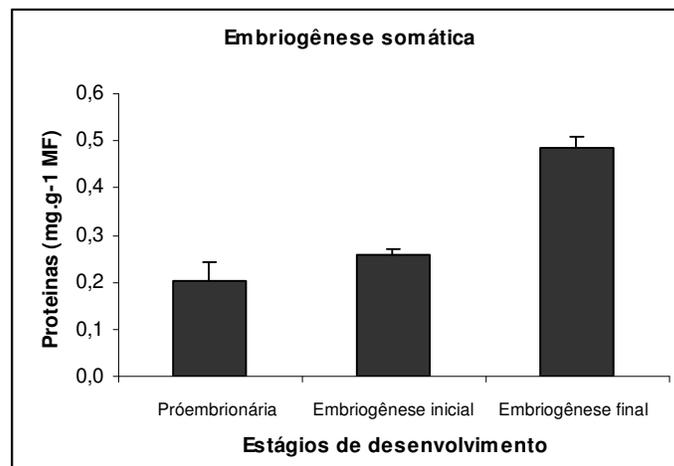


Figura 2. Conteúdo de proteínas da fase pró-embriônica, embriogênese inicial e embriogênese final durante o desenvolvimento do embrião somático de *A. Angustifolia*. Barras verticais sobre colunas representam \pm desvio padrão da média.

O mapa 2-DE apresentou diferentes perfis de proteínas durante o desenvolvimento embrionário, evidenciando alterações na expressão relacionadas ao número de polipeptídeos em diferentes classes de peso molecular e ponto isoelétrico (Figura 3). Observou-se um aumento do número de proteínas de alto peso molecular e uma diminuição de proteínas de baixo peso molecular durante o desenvolvimento dos embriões somáticos (Figura 3). Todos os estádios de desenvolvimento avaliados apresentaram predominância de proteínas com peso molecular entre 20 kDa e 60 kDa. Nas coníferas, as proteínas de reserva possuem peso molecular entre 55 e 60 kDa, que em condições desnaturantes podem resultar em polipeptídios com peso molecular entre 22 e 42 kDa (Hakman, 1993). O incremento da expressão de proteínas com alto peso molecular é

fundamental para o desenvolvimento embrionário e isto se relaciona com atividades de manutenção e reserva, enquanto que proteínas de baixo peso molecular estão relacionadas a processos de síntese manutenção do metabolismo (Vensel *et al.*, 2005).

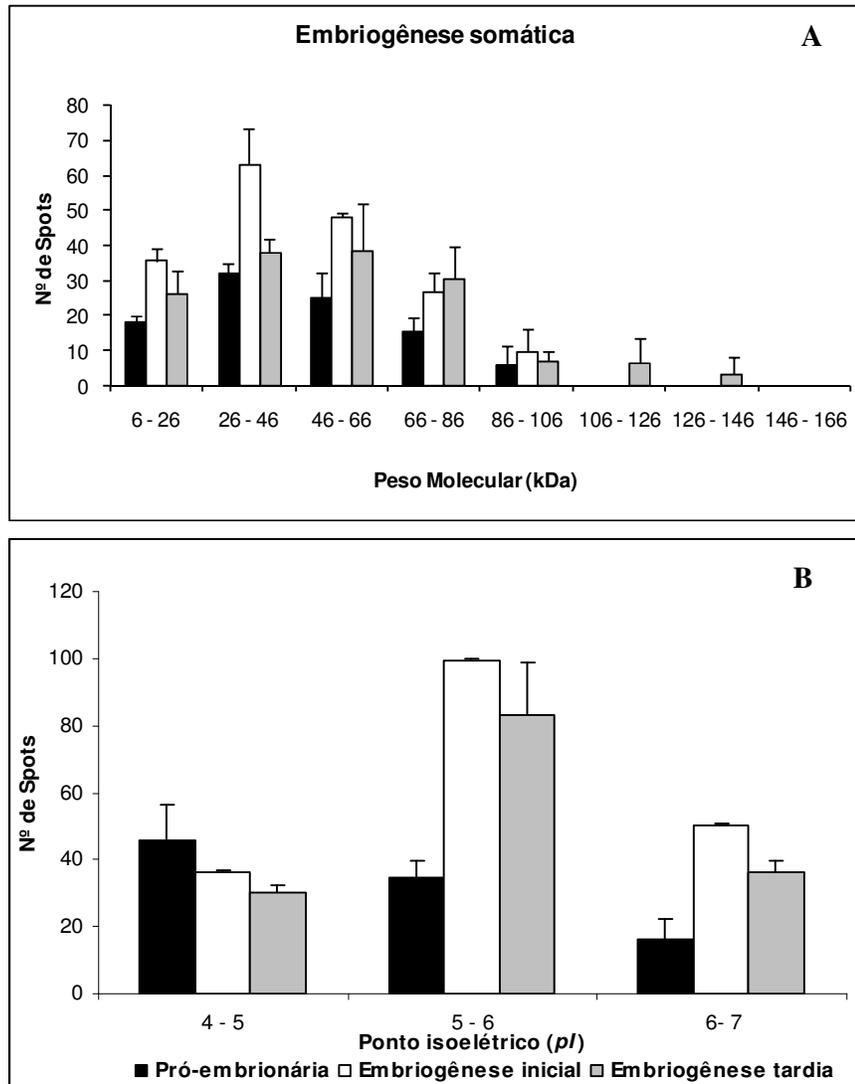


Figura 3. Distribuição do número médio de “spots” de acordo com o parâmetro peso molecular (Kda) e ponto isoelétrico (pI) no gel 2-DE dos estádio de pró-embriônico, embriogênese inicial e embriogênese taradia durante o desenvolvimento do embrião somático de *A. Angustifolia*. Valores foram obtidos dos spots presentes nas três repetições de cada estádio. Barras verticais sobre colunas representam \pm desvio padrão da média.

A análise do perfil 2-DE das diferentes fases de desenvolvimento durante a embriogênese somática de *A. angustifolia* revelou a dinâmica de proteínas envolvidas no desenvolvimento do embrião (Figura 4). Evidenciou-se a presença de proteínas específicas e comuns durante o processo de desenvolvimento (Figura 5).

O número de “spots” detectados nos diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática foi de 117 polipeptídeos no estágio de pró-embriônico, 209 durante a embriogênese inicial e 168 durante a embriogênese final (Figura 3). A análise comparativa durante a embriogênese somática demonstrou que um grande número de proteínas foram observadas exclusivamente em cada estágio de desenvolvimento, com 38, 123 e 88 polipeptídeos presentes especificamente nos estádios pró-embriônico, embriônico inicial e tardio, respectivamente (Figura 3). Foram observados 37 polipeptídeos comuns aos estádios de desenvolvimento analisados; 61 polipeptídeos foram comuns aos estádios de pró-embriônico e embriônico inicial; 62 comuns aos estádios embriônicos inicial e tardio e 55 comuns aos estádios pró-embriônico e tardio (Figura 5).

A análise proteômica da embriogênese zigótica de *A. angustifolia* evidenciou 426, 425 e 353 “spots” no estágio pró-embriônico, globular e torpedo, respectivamente (Balbuena *et al.*, 2009). Assim, evidenciou-se no presente trabalho um baixo número total de spots em todos os estádios de desenvolvimento comparativamente ao outro trabalho com a mesma espécie. Esta diferença pode ser explicada por dois aspectos (i) as proteínas presentes no megametófito foram analisadas em conjunto com o embrião zigótico no trabalho de Balbuena *et al.* (2009); (ii) a utilização, no referido trabalho, de Nitrato de Prata que confere sensibilidade maior na coloração de proteínas comparativamente ao Corante Comassie Brilliant Blue (Westermeier *et al.*, 2002).

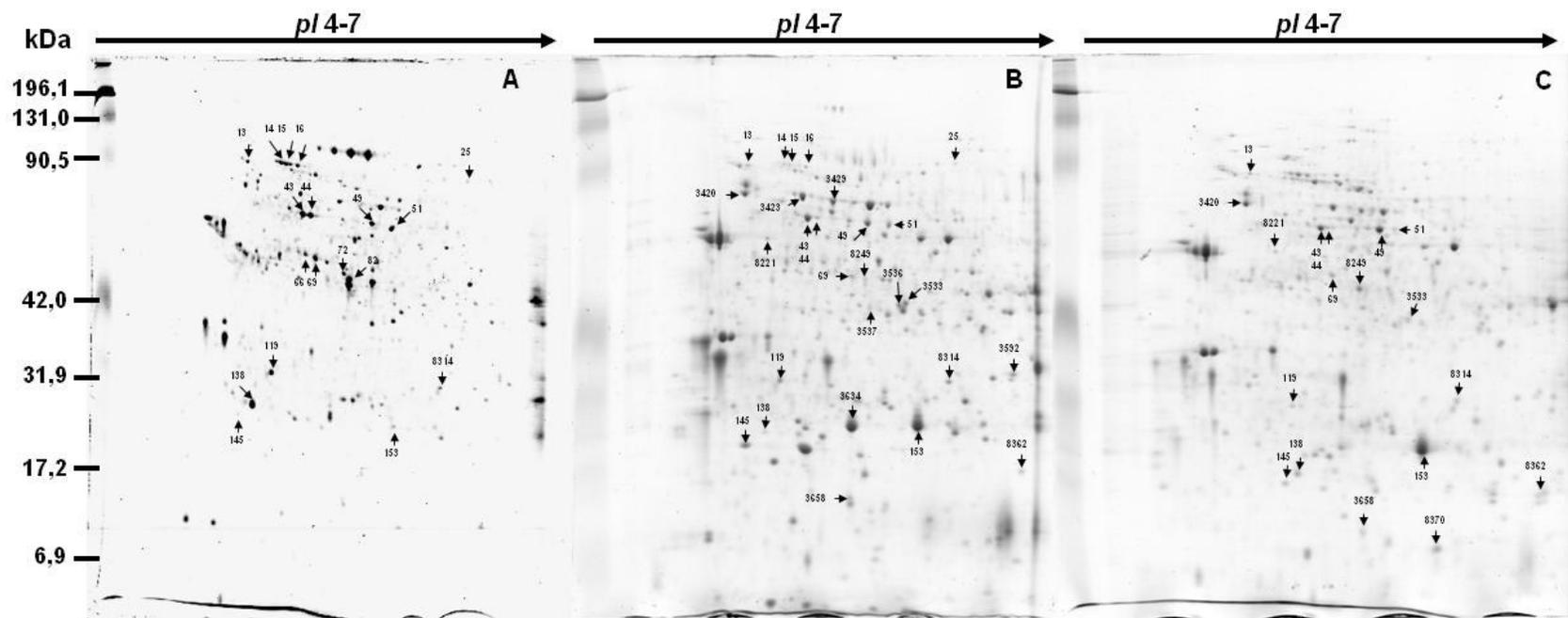


Figura 4. Perfil 2-DE da fase pró-embriônica (A), embriogênese inicial (B) e embriogênese final (C) durante o desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*. As imagens representam o perfil de proteínas expressas a partir das amostras coletadas durante a proliferação (0 dias), maturação (30 e 60 dias). O gradiente de pH e a posição dos marcadores de peso molecular estão indicados no topo e lado esquerdo das imagens, respectivamente. Os números indicados nos géis se referem as proteínas identificadas durante as diferentes fases de desenvolvimento do embrião, as quais estão especificadas na Tabela 1. Os mesmos números em diferentes géis representam a mesma proteína. Números únicos representam proteínas específicas.

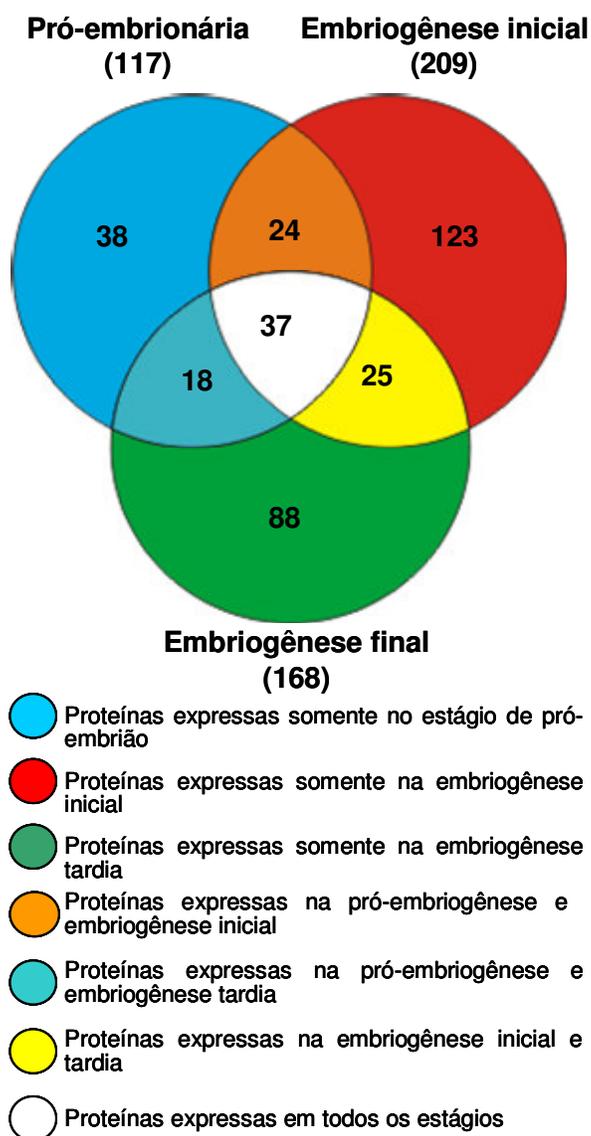


Figura 5. Expressão diferencial de proteínas, em número de “spots”, entre a fase pró-embrionária, embriogênese inicial e embriogênese final durante o desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*. Valores entre parêntesis representam o número total de spots em cada fase. Valores foram obtidos a partir do gel sintético contendo somente os spots presentes nas três repetições de cada estágio.

3.3.3. Identificação e perfil de expressão de proteínas

Apesar do número de “spots” observados nas diferentes fases do desenvolvimento do embrião somático e do fato da *A. angustifolia* não apresentar o genoma seqüenciado, no presente trabalho foram identificadas 35 proteínas durante as diferentes fases analisadas (Tabela1). A classificação funcional destas proteínas foi a agrupada de acordo a base de dados do “*gene ontology*” de acordo com os processos biológicos e componentes celulares (Figura 7). A classe mais representativa das proteínas identificadas foi a aquela relacionada com o metabolismo de carboidratos com 11,1% (Figura 7a). Com relação aos componentes celulares a mitocôndria (16,7%) seguida do núcleo e o proteassomo (13,9%) foram as organelas mais envolvidas (Figura 7b).

Avaliando a expressão diferencial através do critério percentagem de volume dos spots e com base na similaridade do padrão de expressão, foram estabelecidos três principais grupos durante as diferentes fases do desenvolvimento do embrião somático para as proteínas identificadas (Figura 6). As proteínas com maior expressão durante a fase pró-embriônica foram agrupadas no Grupo A, aquelas maior expressão durante a embriogênese inicial foram agrupadas no Grupo B e aquelas com maior expressão durante a embriogênese final foram agrupadas no Grupo C (Figura 6).

No grupo A foram detectadas observadas algumas proteínas como, por exemplo, actina (spot 66), ascorbato peroxidase (spot 138), ATP sintase (spot 44), enolase (spot 119), proteína sintase glucano α 1,4, proteína de ligação luminal (spot 14, 15, 16) e proteína de choque térmico (spot 13) (Tabela 1). Estas proteínas estão associadas tanto aos eventos de transdução de sinais, metabolismo de carbono, resposta a estresse quanto aos mecanismos de divisão celular (Alberts, 2006). A fase pró-embriônica pode ser caracterizada especialmente pela presença de proteínas envolvidas em divisão celular (Gallardo *et al.*, 2003), uma vez que nesta fase ocorre intensa proliferação de PEMs. Em

A. angustifolia, também durante esta etapa, foi observada a presença de grânulos de amido tanto em células embrionárias quanto em células de suspensor durante o processo de proliferação das PEMs (Steiner, 2005) o que certamente justifica a presença de proteínas relacionadas ao metabolismo de carbono. A proteína sintase glucano α 1,4, observada durante a embriogênese inicial, está envolvida na síntese de polissacarídeos de parede celular (Alberts, 2006). Já, a actina é considerada uma proteína altamente conservada e é essencial componente do citoesqueleto, na organização e movimento de componentes citoplasmáticos e crescimento (Alberts, 2006). Durante a embriogênese somática de *M. truncatula* a expressão da proteína de choque térmico 70 kDa (HSPs *heat shock proteins*) e a proteína de ligação luminal decresceram após oito semanas de cultivo, demonstrando que alta expressão destas proteínas foi necessária para a manutenção das células durante o crescimento inicial (Imin *et al.*, 2005). Assim a detecção destas proteínas durante a fase pró-embriônica de *A. angustifolia* sugere que as mesmas estão especialmente conectadas aos eventos relacionados à divisão celular.

Durante a embriogênese inicial as proteínas com maior percentagem no volume de expressão reunidas no grupo B incluíram proteína de ligação subunidade rubisco (spot 3423), precursor malato desidrogenase (spot 3533, 3536), adenilato quinase B (spot 3592) e DNA endonuclease (spot 3634) (Tabela 1). Esta fase é caracterizada pelo estabelecimento da polaridade e individualização do embrião a partir das PEMs (von Arnold *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2008). Conforme descrito no Capítulo I do presente trabalho, os embriões somáticos nesta fase de desenvolvimento apresentam uma série de anormalidades especialmente no que diz respeito à manutenção da atividade mitótica e balanço hormonal. A proteína adenilato quinase B tem sido descrita como sendo essencial para a manutenção do crescimento celular em arroz (Kawai *et al.*, 1992), e apresenta alta expressão durante esta fase (Figura 6). Isso pode estar relacionado com as anormalidades

observadas. Além da proteína malato desidrogenase envolvida no metabolismo de carbono, também a presença proteína de ligação subunidade rubisco foi confirmada durante a embriogênese zigótica nesta espécie (Balbuena *et al.*, 2009). Estes autores sugeriram que durante a embriogênese zigótica o aparato fotossintético é diferenciado a partir do estágio de desenvolvimento torpedo que corresponde a embriogênese final.

Já no grupo C, no qual foram detectadas as proteínas com maior expressão durante a embriogênese final observou-se a presença da glutamina sintetase (spot 8249), proteassomo subunidade α tipo 6 (spot 126), foforilase UDP-glucose (spot 49) e a proteína de reserva vicilina (spot 8362) (Tabela 1). Durante esta etapa o ápice embrionário se torna coeso e as células do suspensor são degradadas na medida em que o embrião se desenvolve (Steiner, 2005). As proteínas observadas nesta etapa estão de maneira geral associadas ao metabolismo de carboidratos, síntese de parede celular e a maturação de embriões o qual inclui o acúmulo de compostos de reserva (von Arnold, 2002; Carney & Pullman, 2007). Estes resultados estão de acordo com aqueles observados na análise proteômica da embriogênese zigótica em *A. angustifolia* as quais também apresentaram grupos específicos de proteínas durante as distintas fases de desenvolvimento do embrião (Balbuena *et al.*, 2009). A principal similaridade entre o perfil protéico durante a embriogênese zigótica e somática nesta espécie foi o acúmulo de proteínas de reserva durante a fase de embriogênese final.

A presença das proteínas glutamina sintetase (spot 8249) de reserva vicilina (spot 8362) foram sugeridas como proteínas que poderiam ser associadas aos estádios tardios do desenvolvimento e que esta última poderia ser utilizada como um marcador de qualidade do desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. angustifolia* (Silveira *et al.*, 2008, Balbuena *et al.*, 2009). No protocolo de embriogênese somática em *A. angustifolia* previamente estabelecido por Steiner (2005), foram observados baixos números de

embriões somáticos maduros e diversas anormalidades durante a fase pró-embriônica. Apesar disso, no presente trabalho foi observada a presença de proteínas de reserva durante a embriogênese final quando as culturas foram submetidas ao ABA. Em *Picea glauca* a proteína de reserva vicilina somente foi observada após as culturas serem submetidas ao tratamento com ABA (Lippert *et al.*, 2005) corroborando com os nossos resultados.

Durante as fases finais da embriogênese somática em coníferas a síntese das proteínas de reserva e proteínas LEA pode ser estimulada em resposta ao ABA exógeno (Tautorus *et al.*, 1991). O ABA está envolvido na expressão dos genes *lea* que codificam as proteínas LEA. Dong *et al.* (1997) reportaram o aparecimento de diversas novas proteínas em resposta a retirada de fitorreguladores do meio de cultura e a exposição ao ABA em *P. glauca*. Mesmo assim, tem sido observado que apesar de embriões somáticos maduros acumularem substâncias de reserva em resposta ao ABA, estes apresentam anormalidades morfológicas as quais limitam a germinação em *Pinus taeda* (Carney & Pullman, 2007), *Feijoa sellowiana* (Pescador *et al.*, 2008) e *Pinus sylvestris* (von Arnold *et al.*, 2009, dados não publicados). Assim os resultados do presente trabalho sugerem que a presença da proteína de reserva vicilina por si só não indica que a histogênese normal dos embriões somáticos foi estabelecida, mas sim indica que a histogênese e acúmulo de substâncias de reserva são processos que ocorrem durante a embriogênese final, mas podem não acontecerem simultaneamente.

A atividade do complexo proteassomo é associada aos processos de proliferação celular e que decresce quando as células são estimuladas ao processo de diferenciação (Amsterdam *et al.*, 1993). Em *Picea glauca* foi sugerido que o decréscimo ou ausência de atividade do proteassomo pode ser um marcador confiável para estudar o desenvolvimento embrionário, uma vez que foi observado um decréscimo na expressão desta proteína

durante os estádios tardios do desenvolvimento (Lippert *et al.*, 2005). Ao contrário, no presente trabalho foi observado um incremento da proteína proteassomo subunidade α tipo 6 (spot 8314) durante a fase final do desenvolvimento do embrião (Figura 6). Um estudo do desenvolvimento embrionário de galinhas demonstrou que o incremento na atividade de proteassomo está relacionado também a anormalidades durante o desenvolvimento destes embriões (Hutson *et al.*, 1997). Assim, em *A. angustifolia* o incremento na expressão desta proteína durante os estádios tardios pode estar associado ao baixo número de embriões somáticos formados e à ocorrência de suas anormalidades.

O estudo dos diferentes padrões de expressão permite o entendimento da relação entre os diferentes grupos de proteínas com os diferentes eventos durante o desenvolvimento do embrião. Vários estudos nesse sentido foram feitos com diversas espécies, detectando variações nos níveis de expressão de determinadas proteínas, em diferentes condições de cultivo como em *Medicago truncatula* (Imin *et al.*, 2004, 2005), *Picea glauca* (Lippert *et al.*, 2005), *Cyclamen persicum* (Winkelmann *et al.*, 2006) e *Vitis vinifera* (Marsoni *et al.*, 2008). Em embriões somáticos de *Acacia sellowiana* foram detectadas 74 proteínas com diferença de expressão nos estádios de desenvolvimento destes embriões (Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos no presente trabalho se configuram em um conjunto de importante fonte de informação para o entendimento das relações complexas envolvidas no metabolismo e no controle da embriogênese somática em coníferas. Demonstrou-se a expressão diferencial de proteínas durante os estádios iniciais de desenvolvimento da embriogênese somática de *A. angustifolia*. Estas informações contribuem para o entendimento da dinâmica de expressão de proteínas durante desenvolvimento do embrião nesta espécie.

Tabela 1. Lista de proteínas identificadas durante a embriogênese somática de *A. angustifolia*

No. Spot ^a	Nome da Proteína	Espécies com proteínas homólogas	MW/PI ^b		Protein ^c Score%	Seqüência ID peptídeos ^d	Acesso ID ^e
			Obs	Teor			
13	Proteína relacionada choque térmico 70 kDa (HSPs)	<i>Pisum sativum</i>	88.0/4.5	75.6/5.2	46	IINEPTA ASLAYGFER	gil399942
14	Proteína ligação luminal 4 (BiP 4)	<i>Nicotiana tabacum</i>	88.0/4.7	73.7/5.0	46	IKDAVVTV PAYFNDAQR	gil729620
15	Proteína ligação luminal	<i>Spinacia oleracea</i>	87.0/4.8	73.7/5.0	40	DAVVTVP AYFNDAQ	BIP_SPIOL
16	Proteína ligação luminal 5 (BiP 5)	<i>Nicotiana tabacum</i>	86.0/4.9	73.9/5.0	43	DAVVTVP AYFNDAQR	gil729623
25	Possível proteinase subtitilina serina	<i>Musa acuminata</i>	79.0/6.4	79.9/6.6	46	GAHP DWSPGAIK	gil102139846
43	ATP sintase subunidade β , mitocondrial	<i>Arabidopsis thaliana</i>	66.0/4.9	59.8/6.1	38	CALVYGQMNEPPGAR	ATPBM_ARATH
44	ATP sintase subunidade β , mitocondrial	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	65.0/5.05	62.0/5.0	44	IPSAVGY PTLATDLGG LQER	ATPBM_CHLRE
49	Fosforilase UDP-glucose	<i>Pinus taeda</i>	63.0/5.5	53.1/5.2	64	YSGSNIDIHIFN QSQYPR K	gil148887793
51	Fosforilase UDP-glucose	<i>Pinus taeda</i>	61.0/5.7	53.1/5.2	41	YSGSNIDIHIFNQSQYPR M	gil148887793
66	Actina – 42 (fragmento)	<i>Solanum tuberosum</i>	53.0/5.0	37.0/5.4	34	TYEL PDGQVITIGA ER	ACT1_SOLTU
69	Proteína produto não nomeado	<i>Oryza sativa</i>	52.0/5.1	42.2/5.2	73	SYELPDGQVI TIGAER	gil20322
79	Não conhecida	<i>Picea sitchensis</i>	48.0/5.3	39.7/5.9	45	HETA DIHTFSWGVA NR	gil116779848
82	Glucano proteína sintase α 1,4	<i>Zea mays</i>	46.0/5.4	41.2/5.7	41	NLDFLEMWR	UPTG_MAIZE
119	Enolase (fosfoglicerato desidratase)	<i>Solanum lycopersicum</i>	30.0/4.7	48.0/5.6	92	YGQDAT NVGDEGGFAP NIQENK	gil119354
83 14	Proteassomo subunidade α tipo 6	<i>Glycine max</i>	28.0/6.15	27.6/6.1	43	R HITIFSPEGR L	PSA6_SOYBN
138	Ascorbato peroxidase	<i>Pinus pinaster</i>	25.0/4.5	27.4/5.4	99	YAQDEDAF FADYAEHLK	gil39939493

Tabela 1. (continuação)

No. Spot ^a	Nome da Proteína	Espécies com proteínas homólogas	MW/PI ^b		Proteín ^c Score %	Sequência ID peptídeos ^d	Acesso ID ^e
			Obs	Teor			
145	Ascorbato peroxidase	<i>Pinus pinaster</i>	24.0/4.4	27.4/5.4	86	K YAQDEDAFFADYAE AHL K L	gil39939493
153	Não conhecida	<i>Picea sitchensis</i>	23.0/5.7	23.9/5.3	46	K DVGPSLYYIDYIATLHK V	gil116778950
3420	Proteína produto não nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	81.0/4.7	50.7/8.0	50	DDGSGGDQE SR	gil157353266
3423	Proteína de ligação subunidade Rubisco	<i>Arabidopsis thaliana</i>	80.0/5.2	64.1/6.2	61	R GYISPYFVTDSEK M	RUBB_ARATH
3429	Não conhecida	<i>Populus trichocarpa</i>	78.0/5.4	45.1/4.8	50	GYIS PYFITDQK	gil118481051
3442	ATP sintase subunidade β mitocondrial	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	72.0/5.2	62.0/4.9	88	RIPSAVGYQPTLATDLGG LQER I	ATPBM_CHLRE
3533	Precursor malato desidrogenase	<i>Medicago sativa</i>		43.5/8.1	57	GVDV VVIPAGVPRK	gil2827084
3536	Precursor malato desidrogenase	<i>Medicago sativa</i>	46.0/5.9	43.5/8.1	66	GVDV VVIPAGVPR	gil2827084
3537	Precursor malato desidrogenase	<i>Medicago sativa</i>	46.0/5.7	43.5/8.1	66	GVDV VVIPAGVPR	gil2827084
3592	Adenilato quinase B	<i>Oryza sativa</i>	34.0/6.8	26.8/7.6	37	K VPGVDDVTGEPLIQR K	KAD2_ORYSJ
3634	DNA endonuclease	<i>Peperomia polybotrya</i>	26.0/5.6	32.1/9.9	39	MLISGFLVKP R	gil854348
3658	Não conhecida	<i>Picea sitchensis</i>	15.0/5.6	21.0/8.5	50	EAIEF YGDFDGR	gil116791600
8221	Homóloga protease regulatória Subunidade 26S	<i>Arabidopsis thaliana</i>	57.0/4.9	46.8/4.9	51	DSYLI LDTLPSEYDS	gil556560
8249	Glutamina sintetase	<i>Lactuca sativa</i>	47.0/5.5	39.6/5.2	43	HKEH IAAYGEGNER	GLNA_LACSA
43	ATP sintase subunidade β - 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>		59.8/6.2	38	CALVYGQMN EPPGAR	ATPBM_ARATH
8362	Proteína de reserva vicilina	<i>Araucaria angustifolia</i>	16.0/6.8	53.6/7.7	48	NPYVFKEEE QER	gil21913852
8368	Não conhecida	<i>Picea sitchensis</i>	11.0/5.5	21.0/8.5	63	EAIEF YGDFDGR	gil116791600
8370	Fator de iniciação transdução eucariótica 5A-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	9.0/6.0	17.7/5.8	44	TF PQQAGTIR	IF5A2_SOLLC

a - Nº do spot corresponde aos números indicados na Fig 4

b – Massa molecular e PI experimental e teórico

c – Score da Proteína a partir do MASCOT

d – Sequência de peptídeos identificados a partir dos dados MSMS

e – Identificação da primeira proteína usando a base de dados NCBI e SwisProt

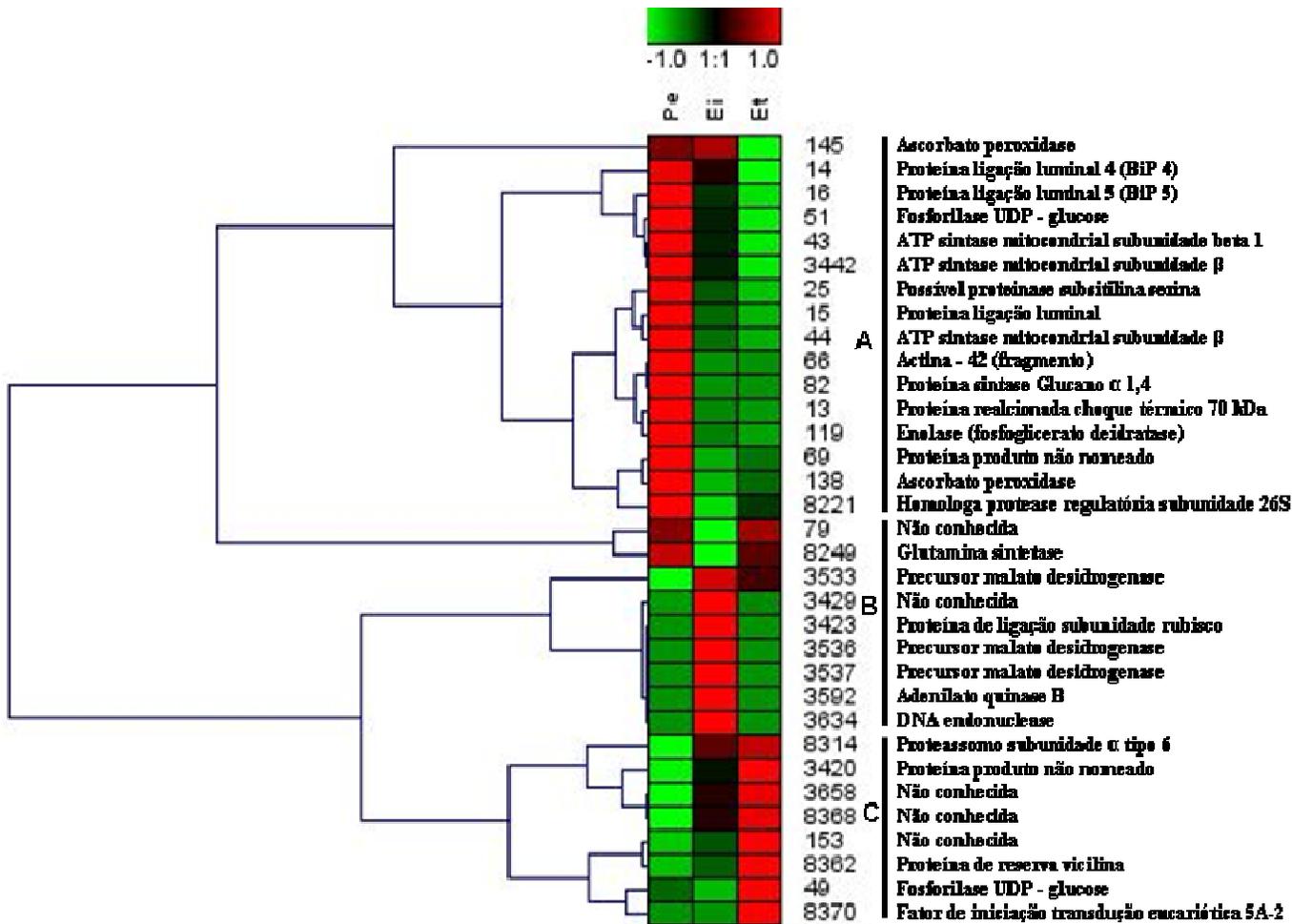


Figura 6. Dinâmica de expressão, com o critério percentagem de volume, das 35 proteínas identificadas durante a fase pró-embriônica, embriogênese inicial e embriogênese final do desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*. Valores obtidos a partir dos géis contendo somente spots presentes em todas as três repetições de cada estágio.

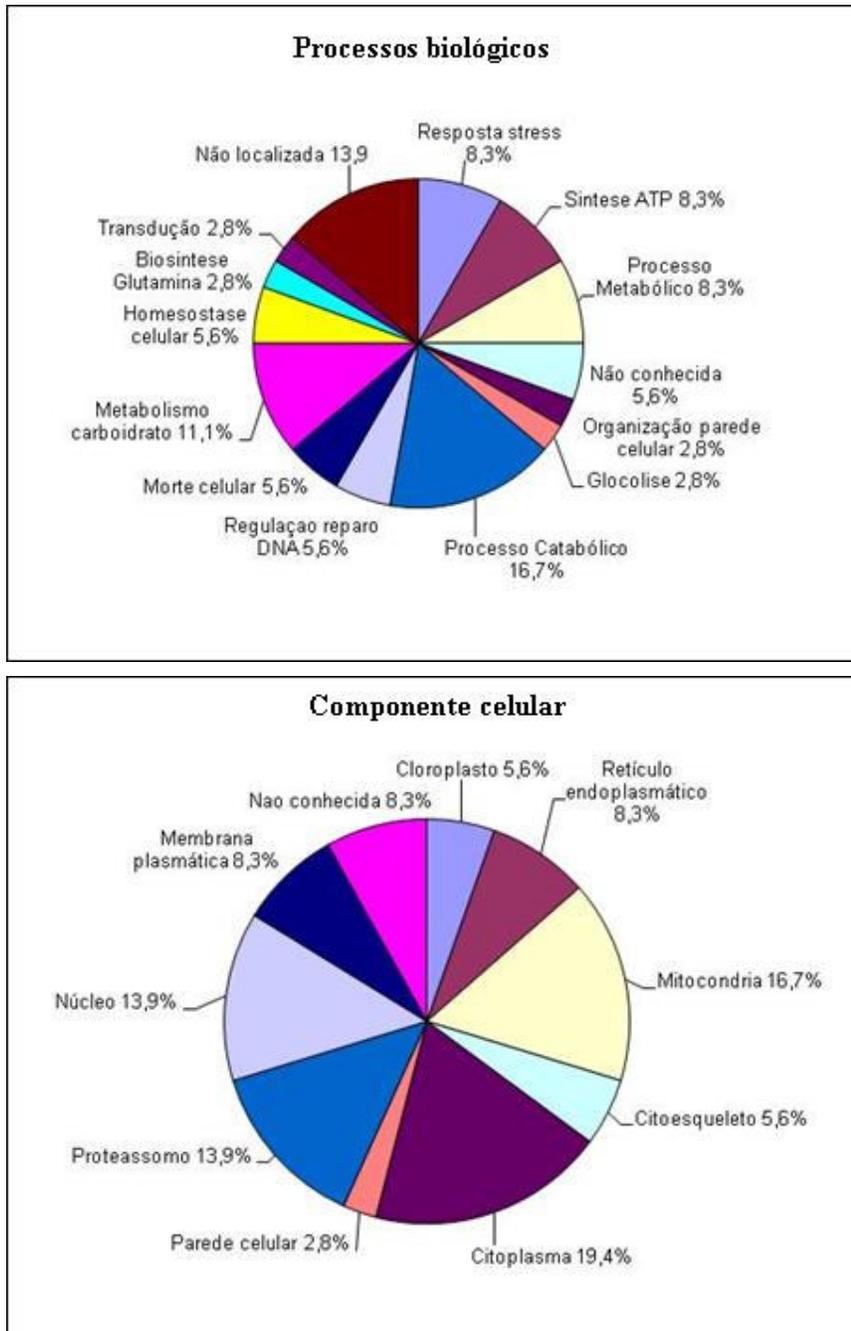


Figura 7. Classificação funcional das proteínas identificadas durante o desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*. A classificação funcional de acordo a base de dados do gene ontology (<http://www.expasy.org>)

3.3.4. Conclusões

O estudo da expressão diferencial de proteínas durante a embriogênese é fonte importante de conhecimento para o entendimento das relações complexas envolvidas no

metabolismo e no controle da embriogênese em plantas. O presente estudo demonstrou a expressão de proteínas durante os estádios iniciais de desenvolvimento da embriogênese somática de *A. angustifolia*. Estas informações contribuem para o entendimento da dinâmica de expressão de proteínas durante desenvolvimento do embrião nesta espécie. Foram identificadas proteínas associadas aos diferentes fases da embriogênese incluindo as proteínas relacionadas a histogênese assim como a proteína de reserva vicilina especificamente durante a embriogênese final. Apesar de ter sido observada diversas anormalidades durante o desenvolvimento assim como uma baixa frequência de embriões somáticos maduros foi possível a identificação de proteínas semelhantes aquelas observadas no embrião zigótico desta espécie.

Foi observada uma diferença expressiva de proteínas totais e de número de “spots” nos diferentes estádios de desenvolvimento. Apesar disso, o protocolo para a identificação de proteínas utilizando MSMS, descrito neste trabalho, precisa ser aprimorado. No Brasil, este tipo de protocolo apresenta um gargalo especialmente no que diz respeito a etapa de digestão protéica e obtenção dos espectros de massa. Esta limitação no protocolo assume grande magnitude especialmente para espécies que não possuem o genoma seqüenciado como é o caso de *A. angustifolia*. Apesar disso, trabalhos em colaboração externa ao Brasil, assim como alguns grupos pioneiros desta técnica no Brasil têm obtido sucesso na identificação. Os resultados obtidos no presente trabalho contribuem para que a técnica de proteômica de plantas apresente um aprimoramento compatível com sua importância emergente no Brasil.

CAPITULO III

**Expressão do homólogo do gene SERK em culturas embriogênicas de *Araucaria*
*angustifolia***

4.1. INTRODUÇÃO

As fases da ontogenia associadas a um programa genético e epigenético especificado a partir das primeiras divisões do zigoto resultam no desenvolvimento de um embrião vegetal (Laux & Jürgens, 1997). Durante a embriogênese somática um grupo de células sofre alterações bioquímicas e morfológicas culminando com a formação do embrião, sendo que a expressão gênica é o principal ponto de controle da ontogenia (Rojas-Herrera *et al.*, 2002).

Os processos moleculares que governam a competência para a embriogênese em células vegetais ainda não estão totalmente esclarecidos. A aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário envolve um processo complexo que inclui a desdiferenciação, reativação celular, alterações nos planos de divisões celulares e reprogramação do metabolismo e desenvolvimento (Fehér *et al.*, 2006). O gene “*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*” (*DcSERK*) foi relacionado a expressão da competência celular em cultura de tecidos de cenoura (*Daucus carota*) (Schmidt *et al.*, 1997). O gene *SERK* codifica um receptor transmembrana que contém um domínio intracelular de proteína-Kinase e um domínio extracelular rico em repetições de leucina, pertencente a uma grande e diversificada família de receptores Kinases em vegetais (Becraft, 1998). Em diversas espécies *Arabidopsis* (*AtSERK1*) (Hecht *et al.*, 2001; Salaj *et al.*, 2008), *Dactylis glomerata* (*DgSERK*) (Somleva *et al.*, 2000), *Medicago trunculata* (*MtSERK*) (Nolan *et al.*, 2003), *Theobroma cacao* (Oliveira Santos *et al.*, 2005; Alemanno *et al.*, 2008), *Triticum aestivum* (Singla *et al.*, 2008) e *Vitis vinifera* (Schellenbaum *et al.*, 2008) a expressão de homólogos do gene *SERK* foi associada a aquisição de competência embriogênica. Assim, a expressão do gene *SERK* é considerada como um marcador de células competentes para a formação de embriões somáticos sugerindo a sua utilização

para distinguir células embriogênicas competentes e não competentes para a embriogênese (Suprasanna & Bapat, 2005).

Em agregados celulares de *O. catharinensis* cultivados em diferentes meios de cultura, a expressão do gene *SERK* foi associada à competência embriogênica (Santa Catarina *et al.*, 2004). Neste trabalho, o 2,4-D foi associado à expressão do gene *SERK* e foi observada a existência de populações de células competentes e não competentes no mesmo material.

A indução do gene *SERK* pela auxina foi recentemente descrita para culturas embriogênicas de *M. trunculata* (Nolan *et al.*, 2003). Apesar de este estudo indicar que a embriogênese somática está associada com a alta expressão do gene *SERK*, a auxina isoladamente não induziu a embriogênese, como no caso de cenoura e *Arabidopsis* (Schmidt *et al.*, 1997). Em *M. trunculata* a auxina induziu a formação de raízes, existindo uma regulação positiva do gene *MtSERK1* durante a diferenciação, o que sugere que o mesmo apresenta uma participação mais ampla na morfogênese das culturas (Nolan *et al.*, 2003).

Em *A. angustifolia*, ainda não foi estabelecido um protocolo completo de embriogênese somática e estudos do monitoramento da competência das culturas embriogênicas, para a formação dos embriões somáticos, podem auxiliar na identificação dos aspectos limitantes para a regeneração completa de plantas por meio desta rota morfogênica *in vitro*. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi monitorar a expressão dos homólogos do gene *SERK* em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas a diferentes tratamentos durante a etapa de proliferação e maturação.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

Foram utilizadas culturas embriogênicas de *A. angustifolia* da etapa de proliferação e maturação. Durante a etapa de proliferação foram coletadas amostras do meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) na presença de 2,4-D (2 μ M), BAP e Kin (0,5 μ M) e ausência destes fitorreguladores, denominadas de BM20 e BM00, respectivamente. Durante a etapa de maturação estas amostras foram coletadas após serem submetidas 35 dias ao tratamento com ABA (150 μ M), PEG (7% p/v), Maltose (9% p/v) e foram denominadas de BM2 35d e BM0 35d.

A análise da competência embriogênica das culturas através do monitoramento da expressão do homólogo do gene SERK foi realizada em colaboração com Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas – Instituto de Biologia/UNICAMP.

4.2.2. Extração de RNA

Realizou-se a extração de RNA utilizando-se Trizol. As amostras foram maceradas em graal com nitrogênio líquido e em seguida, transferidas para tubo falcon (15 mL) contendo Trizol, numa relação de 10 mL de trizol para 2 gramas de amostra. A amostra foi agitada até completa homogeneização com o Trizol, seguindo-se a incubação em temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4°C para ajudar na limpeza. A fase superior foi coletada com auxílio de uma pipeta e transferida para tubo falcon de 15 mL novo, onde adicionou-se clorofórmio (temperatura ambiente) numa relação de 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de trizol coletado. Após agitação vigorosa (15 segundos), as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 3 min, e centrifugadas por 3000 rpm, por 15 min, a 4°C. Em seguida, coletou-se a fase

superior (fase aquosa), que foi transferida para tubos eppendorfs de 1,5 mL (colocado 1 mL para cada tubo de polipropileno), onde adicionou-se 600 µL de isopropanol (temperatura ambiente) para cada 1 mL de amostra, misturando-se aproximadamente 20 vezes por inversão. Após 10 min em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas 10.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado com cuidado (para evitar que o “*pellet*” seja deslocado do fundo do tubo), e o “*pellet*” foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado. A amostra foi agitada em vortex por alguns segundos e centrifugada a 6.000 rpm, por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado com cuidado, e o “*pellet*” foi lavado novamente com etanol absoluto gelado. A centrifugação foi repetida, descartando o sobrenadante com cuidado e o tubo de polipropileno foi mantido aberto para secagem do “*pellet*” ao ar por pelo menos 10 min, até o tubo de polipropileno secar. Em seguida, o “*pellet*” foi re-suspendido em 20 µL de água DEPC (dietilpirocarbamato) 1%, sob agitação em vortex, por 15 min.

4.2.3. Quantificação de RNA total

Procedeu-se a quantificação de RNA por espectrofotometria (260 nm) e a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para a quantificação por espectrofotometria, misturou-se 5 µL de amostra concentrada de RNA extraído em 600 µL de água DEPC. Após calibração do aparelho com água DEPC, procedeu-se a quantificação do RNA da amostra.

Para a eletroforese, utilizou-se o gel desnaturante de agarose 1%, onde misturou-se 0,35 g de agarose, 3,5 mL de tampão MOPS 10X (MOPS a 20mM (pH 7,0), acetato de sódio a 8 mM e EDTA a 1 mM (pH 8,0)) e 30 mL de água DEPC (para um total de 35 mL de gel), seguido de aquecimento até dissolver a agarose. Quando esta solução atingiu uma

temperatura de aproximadamente 40 °C, adicionou-se 1,75 mL de formaldeído 37%, em capela, e colocou-se este gel em cuba de eletroforese, estando pronto para uso após a solidificação. A amostra foi preparada utilizando-se 10 µL de tampão de denaturação + 2 µL de amostra de RNA extraído. Esta mistura foi mantida em temperatura de 56 °C, por 15 min. Após este período, a amostra mantida em gelo e foi aplicada no gel em contendo tampão de corrida TAE. A corrida foi realizada em 100V, 60 mA, por 30 min. Em seguida, o gel foi fotografado em luz ultravioleta.

Cada mL do tampão de denaturação é composto de: 100 µL de tampão MOPS 10X; 175 µL de formaldeído; 500 µL de formamida deionizada; 80 µL de brometo de etídio (1 mg/mL); 100 µL de tampão de amostra e 45 µL de água DEPC.

4.2.4. RT-PCR para clonagem de homólogos de SERK

Visando a avaliação dos padrões de expressão de alguns genes marcadores utilizou-se a técnica de PCR reversa (RT-PCR) para a clonagem de genes candidatos. Entre estes marcadores, estão os expressos nas células embriogênicas como o gene *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase* (SERK, Schmidt *et al.*, 1997; Santa-Catarina *et al.*, 2004). Para tal, realizou-se a extração de RNA total de culturas embriogênicas conforme descrição no item 4.4. A produção da primeira fita de cDNA foi realizada com utilização do kit de RT-PCR (Superscript, Invitrogen) e a síntese dos fragmentos correspondentes aos homólogos prováveis dos genes marcadores previstos inicialmente, com a utilização de iniciadores 5' e 3' desenhados a partir de regiões conservadas dos genes mencionados acima (Haecker *et al.*, 2004), a partir de alinhamentos de seqüências homólogas de diferentes espécies. Os iniciadores utilizados foram: SERK5 (5'-ATGGCNTTYGCNTGGTGG-3') e SERK3 (5'-YTCNGANGAYTTNCCNGT-3'). As condições de PCR variaram apenas quanto à temperatura de anelamento dos iniciadores.

Estas temperaturas foram as recomendadas pela empresa responsável pela síntese dos iniciadores (Imprint) e foram: SERK: 51°C por 40 s. As demais condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min e 40 ciclos de 94°C por 40 s; (ciclo de anelamento específico) e 72°C por 1min. Após a PCR, os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e documentados.

A seguir, as bandas foram cortadas do gel e purificadas com o Kit Purê Link Quick Gel extraction (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA assim obtidos foram quantificados e clonados no vetor PCR2.1 (TA Cloning kit, Invitrogen). As construções obtidas foram transformadas em *E. coli* (células eletrocompetentes DH5-alfa) e 10 transformantes foram selecionados para posterior análise por seqüenciamento. Dez colônias brancas foram escolhidas de cada experimento de transformação e foram sub-cultivadas para extração de plasmídeos. Os plasmídeos foram extraídos com o Kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen). Após dosagem, uma alíquota das extrações plasmidiais foram testadas para a presença do inserto clonado, mediante digestão com a endonuclease EcoRI e os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose 1%. Após a confirmação da presença do inserto no vetor, amostras de DNA foram enviadas em duplicata para seqüenciamento na concentração de 100ng/ml. Os iniciadores utilizados para o seqüenciamento foram o T7 (forward) e M13 (reverso). O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) do CENA/USP. Após a clonagem e caracterização da porção conservada dos fragmentos dos genes citados, procurou-se a clonagem da seqüência completa do gene, mediante o alongamento das fitas de cDNA com emprego das técnicas de 3'-RACE e 5'-RACE, utilizando-se o kit Marathon TM cDNA Amplification (Clontech). Os sub-clones assim obtidos também foram clonados e seqüenciados como descrito acima.

4.2.5. Caracterização dos possíveis homólogos de SERK por análise de seqüências

Os cromatogramas gerados pelo seqüenciamento foram processados pelo programa PHRED e a montagem das seqüências consenso foi realizada pelo programa CAP3. As seqüências assim obtidas foram comparadas com as seqüências dos bancos de dados do NCBI com o emprego do algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)). Alinhamentos múltiplos das seqüências obtidas com os possíveis homólogos de *Arabidopsis* ou de outras espécies para as quais estas seqüências estejam disponíveis foram realizados com o emprego do programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Cladogramas e árvores filogenéticas foram obtidas utilizando-se matrizes obtidas com cálculo de distância. As árvores foram construídas por neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), com cálculo e Bootstrap para 1000 repetições. O desenho das árvores foi feito com os Programas TreeView ou MEGA (<http://www.megasoftware.net>).

4.2.6. Caracterização do padrão de expressão dos possíveis homólogos de SERK por hibridização *in situ*

Com base nos resultados preliminares das RT-PCRs, os materiais utilizados para os experimentos de hibridização *in situ* foram embriões somáticos de *A. angustifolia* cultivados em meio BM0 (meio BM sem fitorreguladores) e BM2 35d (meio BM acrescido de PEG, maltose e ABA) após o repique e após 35 dias em cultivo. Para a fixação, o material coletado foi imediatamente mergulhado em 4% paraformaldeído (p/v) em tampão fosfato e submetido a vácuo (60 mmHg) por 20 min ou até que o material afundasse completamente na solução do fixador. O material foi fixado por 24 h a 4°C ou por 2 h à temperatura ambiente.

Os tecidos fixados foram desidratados em série etílica até etanol absoluto onde permaneceram pelo menos 2 dias. Em seguida as amostras desidratadas foram emblocadas em parafina, seccionadas seriadamente (8 μm) e montados em lâminas de vidro.

As sondas sense e antisense foram obtidas com a transcrição *in vitro* dos fragmentos clonados por RT-PCR correspondentes aos cDNAs/genes estudados. As moléculas de RNA utilizadas como sonda foram sintetizadas na presença de dUTPs marcadas com digoxigenina (DIG), segundo as instruções do fabricante do material de marcação (Roche). A hibridização foi conduzida sob condições de estringência apropriadas no material desparafinado em xilol e submetido ao tratamento de pré-hibridização com proteinase-K (Dornelas *et al.*, 1999; 2000). A visualização do sinal foi obtida através de reação colorimétrica, utilizando-se anticorpos anti-DIG conjugados à fosfatase alcalina, empregando NBT/BCIP como substrato (Fastblue plus levamisole, Roche). Os resultados foram observados e documentados em um microscópio Zeiss Axioskop 50 equipado com câmera fotográfica digital (Zeiss).

4.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Quantificação de RNA

Para as amostras da fase de proliferação foi observada uma concentração de RNA total de 1,43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para a amostra BM00, e 1,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a amostra BM20. Para as amostras da fase de maturação observou-se uma concentração de RNA total de 0,99 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para a amostra BM035d, e 4,42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a amostra BM235d (Tabela 1). Foi observado, por meio de eletroforese em gel de agarose (1%), que não ocorreu degradação do RNA das amostras das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* (Figura 1).

Tabela 1. Rendimento e qualidade do RNA total por espectrofotômetro em amostras de *A. angustifolia*.

Tratamento	(PM) Peso Macerado*	RNA Total	Rendimento $\mu\text{g/g PM}$
BM0 0	1,596 g	1,43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	101,74
BM2 0	1,833 g	1,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	116,8
BM0 35d	1,19 g	0,99 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	61,0
BM2 35d	2,0 g	4,42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	293,84

* Peso macerado: Peso da matéria fresca (MF) após a maceração com Nitrogênio Líquido.

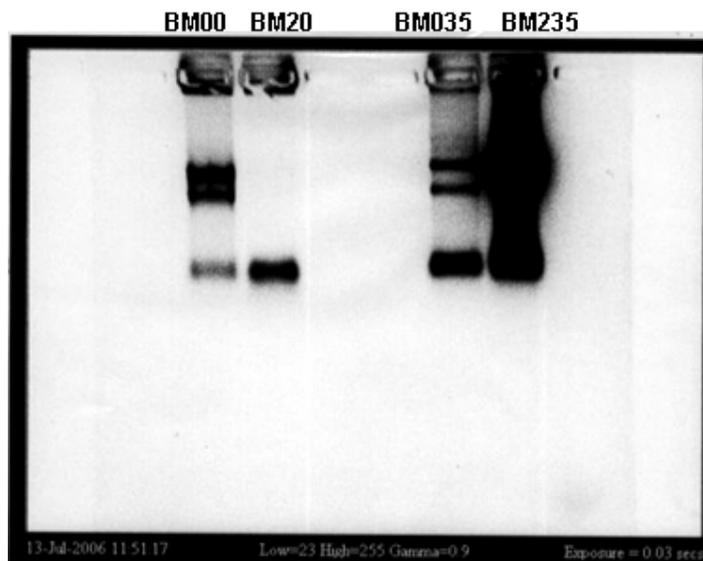


Figura 1. RNA em gel de agarose (1%) obtidos em 4 amostras de *A. angustifolia*. BM00 = Meio de cultura BM sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D ($2\mu\text{M}$) BAP e Kin ($0,5\mu\text{M}$) (fase proliferação); BM0 35d - culturas provenientes do meio BM00 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA ($150\mu\text{M}$) (fase maturação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA ($150\mu\text{M}$) (fase maturação).

4.3.2. Obtenção de homólogos de SERK

Foram obtidos fragmentos de amplificação a partir de todas as reações de PCR testadas. O produto obtido com o emprego dos primers referentes ao gene SERK, parece amplificar bandas diferencialmente, dependendo da amostra de cDNA empregada, segundo os resultados da RT-PCR (Figura 2). Este resultado concorda com outros dados de expressão diferencial de homólogos de SERK em que a expressão do gene está

correlacionada com a indução de respostas embriogênicas *in vitro* (Santa-Catarina *et al.*, 2004).

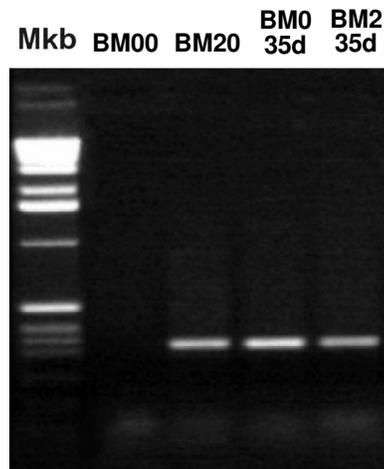


Figura 2. RT-PCR a partir de RNAs extraídos de culturas celulares de *A. angustifolia*, com utilização de primers degenerados para o gene SERK. Os códigos em cada canaleta representam os diferentes meios de cultura onde foram cultivados os materiais utilizados para extração de RNA: BM00 = Meio de cultura BM sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2 μ M) BAP e Kin (0,5 μ M) (fase proliferação); BM0 35d - culturas provenientes do meio BM00 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 μ M) (fase maturação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 μ M) (fase maturação). Mkb: Marcador molecular.

4.3.3. Clonagem e caracterização dos possíveis homólogos de SERK

A super-família de proteínas-quinase em plantas contém um grupo de receptores-kinase (Receptor-Like Kinases, RLKs) caracterizados por um domínio extra-celular, um domínio transmembrana e um domínio de proteína-kinase intracelular (para uma revisão, veja Becraft, 1998). O provável papel das RLKs em plantas é a transdução de sinais ambientais e/ou informações provenientes de células vizinhas para o acionamento de respostas específicas em processos do desenvolvimento. Um destes processos é a embriogênese somática, onde a resposta embriogênica de um grupo de células depende

não apenas do tipo de célula introduzida *in vitro*, mas também da composição do meio de cultura. Experimentos que almejavam correlacionar o potencial embriogênico de culturas celulares com o padrão de expressão diferencial de genes, permitiram o isolamento do gene *SERK* em cenoura (Schmidt *et al.*, 1997). Vários genes codificadores de RLKs semelhantes à *SERK* foram isolados em angiospermas (Santa-Catarina *et al.*, 2004), mas relatos da identificação e clonagem de genes relacionados à *SERK* em gimnospermas são escassos na literatura (Cairney & Pullman, 2007).

No presente trabalho, um clone parcial de uma RLK de *A. angustifolia* foi isolado por PCR usando-se iniciadores degenerados correspondentes a uma região altamente conservada entre as seqüências de cDNA de *SERK* de *Arabidopsis* e de cenoura. No domínio extra-celular de proteínas *SERK* típicas, o peptídeo sinal é seguido de um provável zíper de leucina (ZIP), cinco repetições ricas em leucina (LRRs, leucine-rich repeats), e um domínio rico em prolina (SPP). A análise dos diferentes clones de uma provável *SERK* de *A. angustifolia* revelou que todos codificavam uma mesma proteína, que foi denominada *AbSERK1*. Para a obtenção de maior informação a respeito da seqüência nucleotídica de *AbSERK1*, experimentos de 3' e 5'-RACE foram realizados. O maior clone obtido contém 2095pb e possui um quadro aberto de leitura (ORF) de 471 aminoácidos, no entanto, a ORF se inicia na região do quarto LRR e, portanto, não apresenta o códon codificador da primeira metionina, correspondendo a 69% da extensão da proteína *SERK1* de *Arabidopsis* (Figura 3). A identidade de seqüência entre a proteína *AbSERK* e outros homólogos de *SERK* descritos na literatura variou entre 65% e 86%. Esta similaridade não foi constante ao longo de toda a seqüência protéica e foram particularmente baixas nas regiões N-terminal, no peptídeo sinal e na região adjacente ao domínio transmembrana (Figura 3).

Com o objetivo de investigar a relação entre os homólogos vegetais de *SERK*, uma comparação filogenética da seqüência protéica de *AbSERK* com seus homólogos putativos em outras espécies vegetais foi realizada. Considerando a variação considerável de seqüência em determinadas regiões das proteínas *SERK*, o alinhamento utilizado para a construção da árvore filogenética considerou apenas a região do domínio kinase (Figura 4). A função descrita na literatura para os membros da sub-família *SERK* de proteínas kinase é bastante variável e inclui de resistência à doenças ao controle da embriogênese (Becraft, 1998; Baudino *et al.*, 2001; Santa-Catarina *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2008). Entre este grupo bastante heterogêneo de proteínas, *AbSERK* juntamente com *AtSERK1* formam um clado distinto, suportado por valores significativos de Bootstrap, de acordo com a análise comparativa de seqüências (Figura 4).

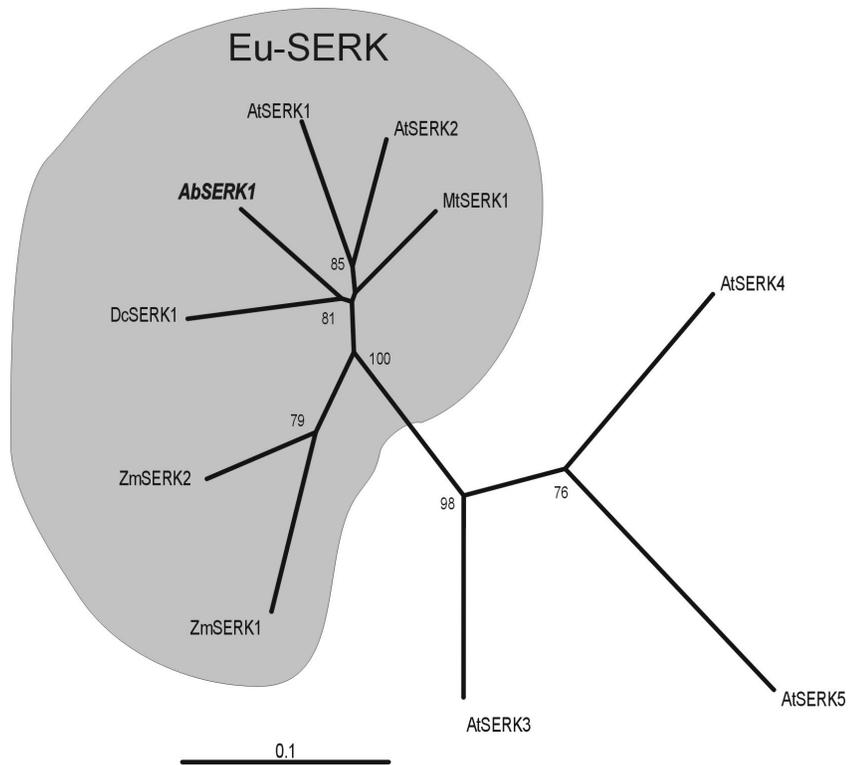


Figura 4. Relações filogenéticas entre homólogos de *SERK*. As seqüências protéicas correspondentes aos domínios kinase I-XI de diferentes homólogos de *SERK* foram alinhados e uma matriz de distância (Saitou& Nei, 1987) gerada. Esta matriz foi utilizada para a construção do cladograma por *neighbour-joining*. A barra indica 10% de substituições não-sinônimas. Os números indicam valores de bootstrap, em porcentagem (1000 repetições). Apenas os valores acima de 75% são mostrados.

Este grupo foi denominado de *EU-SERK* e as funções descritas na literatura para todas as proteínas do clado *EU-SERK* estão relacionadas com o controle do processo embriogênico (Schmidt *et al.*, 1997; Baudino *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001). Observou-se que a expressão de *AbSERK* foi ativada em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, segundo os dados de RT-PCR.

4.3.4. Caracterização do padrão de expressão dos possíveis homólogos de SERK por hibridização *in situ*

A análise da seqüência do fragmento clonado demonstrou tratar-se de um provável homólogo do gene *SERK*, inicialmente descrito em cenoura (Schmidt *et al.*, 1997). Desta forma este gene foi nomeado como *AaSERK* (*A. angustifolia SERK*). Uma comparação da seqüência protéica deduzida de *AaSERK* com as seqüências de outras RLKs descritas na literatura indicou que a proteína *AaSERK* pertence ao clado denominado de *EU-SERK*. As funções descritas na literatura para todas as proteínas do grupo *EU-SERK* estão relacionadas com o controle do processo embriogênico (Schmidt *et al.*, 1997; Baudino *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001). Uma vez que, segundo os dados de experimentos de RT-PCR observou-se que a expressão de *AaSERK* é ativada em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* foram realizados ensaios de hibridização *in situ* para determinar o padrão de expressão de *AaSERK* durante a proliferação e maturação do processo de embriogênese somática. Comparou-se os padrões de expressão de *AaSERK* em calos em fase de proliferação (cultivados em meio BM isento de fitorreguladores BM0) e em calos embriogênicos em fase de maturação (após 35 dias de cultura em meio BM com ABA, PEG e maltose (BM2 35d); Figura 5).

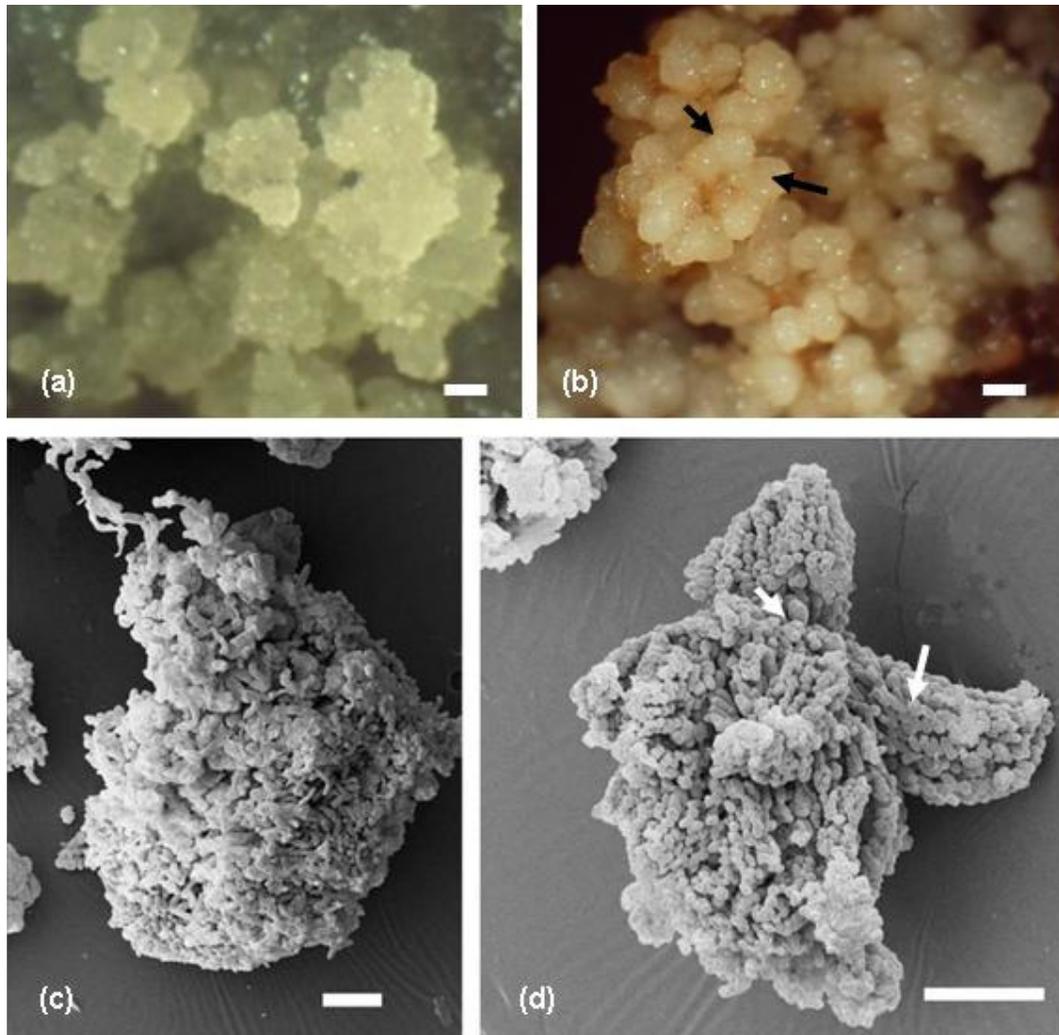


Figura 5. Estereomicroscopia e microscopia eletrônica de varredura de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* em fase de proliferação (cultivados em BM0) (a,c) e durante a embriogenese inicial na: fase de maturação (em meio BM2 35d (Meio de)) (b,d). Nas culturas em BM0 não há formação aparente de embriões somáticos iniciais, apenas pro-embriões. Em culturas cultivadas em meio BM2 35d, observa-se a formação de embriões somáticos em fases iniciais do desenvolvimento sobre a superfície da cultura. BM0 - Meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2 μ M) BAP e Kin (0,5 μ M) (fase proliferação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 μ M) (fase maturação). Barras: 500 μ m.

As culturas embriogênicas em BM0 não mostraram sinais de expressão de *AaSERK*, (Figura 5 A) em conformidade com o observado nos resultados de RT-PCR .

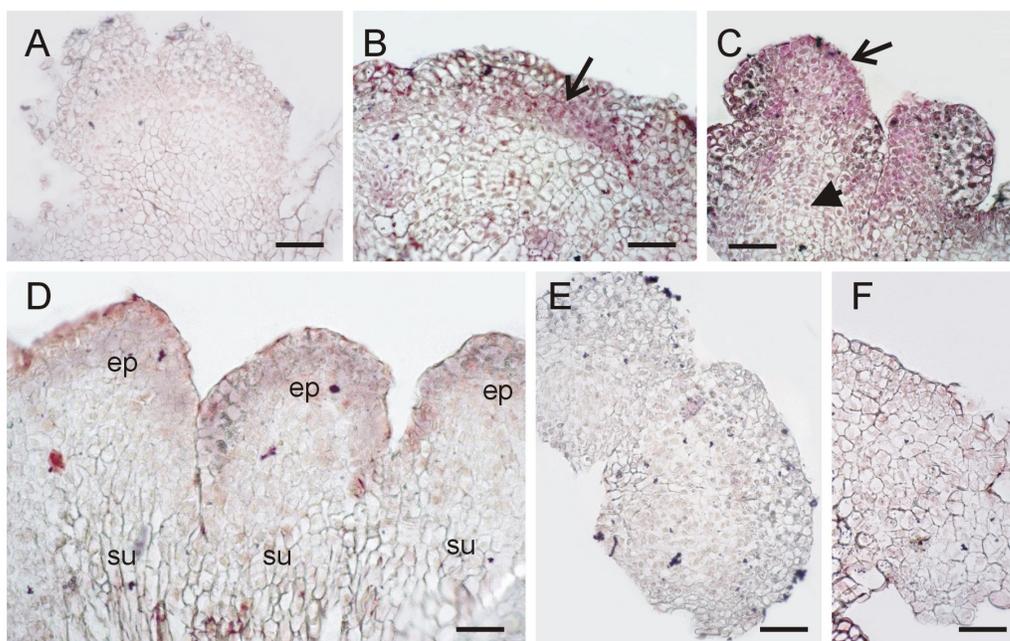


Figura 6. Hibridização *in situ* com a utilização de sondas sense (E-F) e antisense (B-D) de *AaSERK* em *A. angustifolia*. O sinal de hibridização é observado pela presença da coloração rosa-arroxeadado. A: Cultura em meio de proliferação (BM0); B: Cultura em meio BM2 35d. A seta indica um grupo de células em intensa divisão celular apresentando sinais de hibridização. C: cultura em meio de maturação (BM2 35d) apresentando estruturas semelhantes a embriões iniciais. A seta indica o ápice embrionário, com sinal intenso de hibridização e a ponta de seta indica a células do suspensor as quais estão em processo de degeneração, com sinal menos intenso de hibridização. D: Embriões somáticos apresentando sinal de hibridização apenas nas regiões periféricas do ápice embrionário (ep). Culturas em meio BM0 (E) e em meio BM2 35 dias (F) não apresentaram sinais de hibridização acima do ruído de fundo, quando hibridizados com a sonda sense. ep: ápice embrionário; su: suspensor. BM0 - Meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2 μ M) BAP e Kin (0,5 μ M) (fase proliferação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 μ M) (fase maturação). Barras: 500 μ m. Barras: A, C e E: 250 μ m. B, D e F: 100 μ m.

As culturas cultivadas por 35 dias em meio de maturação (BM2 35d) mostraram a formação de embriões somáticos em estádios iniciais assim como de pro-embriões caracterizando o desenvolvimento dessincronizado. A observação em microscopia eletrônica de varredura das culturas embriogênicas revelou a presença de embriões em estádios iniciais do desenvolvimento na superfície da cultura (Figura 6B). A análise

citoquímica revelou que os pró-embriões somáticos de apresentam células do suspensor, as quais são alongadas em oposição às células do ápice embrionário as quais são isodiamétricas e compactas; (Figura 6 B). Os embriões somáticos em estádios iniciais do desenvolvimento são formados por um grupo de células embriogênicas com ausência de suspensor ou com este já em fase de degeneração conforme descrito no Capítulo I. Células embriogênicas coesas as quais são precursoras dos estádios tardios do desenvolvimento do embrião apresentaram forte sinal de hibridização com a sonda de *AaSERK* (Figura 7 B). A medida que os pró-embriões somáticos se desenvolvem, há a formação de dois domínios distintos: o ápice embrionário que contém células isodiamétricas e de citoplasma denso, apresentando forte sinal de hibridização com a sonda de *AaSERK*; e o grupo de células do suspensor que possuem um sinal fraco ou não hibridizam com a sonda de *AaSERK* (Figura 6 C). À medida que o embrião é individualizado das PEMs (massas celulares proembrionárias) por meio do alongamento das células de suspensor, este assume uma posição mais distal do agregado celular que lhe deu origem. Nesta fase, a expressão de *AaSERK* limita-se à região periférica do ápice embrionário e o sinal de hibridização não é mais detectado nas células do suspensor. Não se detectou sinal de hibridização das sondas sense controle (Figura 6 E e F).

Apesar de vários homólogos de *SERK* já terem sido descritos em espécies angiospermas, não há relatos na literatura do padrão de expressão de *SERK* em gimnospermas (Afzal *et al.*, 2008). O único relato da identificação de homólogos putativos de *SERK* em gimnospermas foi através da análise de ESTs (Carney *et al.*, 2006; Cairney & Pullman, 2007). Os padrões de expressão observados para *AaSERK* é semelhante ao observado para os homólogos de *SERK* de angiospermas (Schmidt *et al.*, 1997; Baudino *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001; Santa-Catarina *et al.*, 2004). Em todos os casos relatados na literatura, a expressão dos homólogos de *SERK* inicia-se em um grupo pequeno de células

pró-embriônicas, em meio a outras células que não expressam o gene, como observado em *A. angustifolia*. Desta forma, o gene *SERK* pode ser considerado um confiável marcador molecular para as células com potencial embriogênico (Santa-Catarina *et al.*, 2004). Na maioria das espécies angiospermas, a formação da estrutura do suspensor durante a embriogênese somática é um fato raro. Durante a embriogênese zigótica, no entanto, observou-se que a expressão dos homólogos de *SERK* limita-se as células embriônicas apenas nas fases iniciais (até fase globular), sendo que a expressão no suspensor pode (em *Arabidopsis thaliana*, Hecht *et al.*, 2001) ou não (em *Hieracium* subgênero *Pilosella*, Tucker *et al.*, 2003) ser detectada. Em *A. angustifolia* o padrão de expressão de *SERK* durante a embriogênese somática assemelha-se ao observado para *Hieracium* subgênero *Pilosella*, uma vez que o sinal de expressão de *AaSERK* foi drasticamente reduzido nas células do suspensor, à medida em que as mesmas se diferenciaram. Perspectivas futuras se relacionam com a investigação do padrão de expressão de *AaSERK* durante a embriogênese zigótica em *A. angustifolia*, uma vez que o resultado poderia indicar se a expressão de *SERK* nas células do suspensor em angiospermas é uma característica basal ou derivada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir do estudo das diferentes rotas de desenvolvimento da embriogênese somática em gimnospermas foi possível, no presente trabalho, descrever o padrão de desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. angustifolia* indicando os estádios críticos deste protocolo e comparando este sistema com os de outras coníferas. O padrão de desenvolvimento é específico para cada sistema e a *A. angustifolia* apresenta diferenças comparadas ao sistema de *P. sylvestris* e *P. abies*. Considera-se que embriogênese somática em *A. angustifolia* envolve três fases: indução, proliferação e maturação. A primeira fase envolve a formação do primeiro grupo de células em intensa divisão celular a partir do ápice embrionário zigótico. A segunda fase é representada pela proliferação das massas pró-embriônicas (MPEs) que apresentam três estádios de desenvolvimento característicos os quais podem ser distinguidos pela organização celular e número de células (MPEs I, II e III). A terceira fase abrange o desenvolvimento dos embriões somáticos (inicial, tardio e maturação) as quais seguem o mesmo estereótipo observado nos embriões zigóticos. Contudo em *A. angustifolia* embriões somáticos maduros são observados em baixa frequência. Na primeira e a segunda fase o meio de cultura é suplementado com fitorreguladores (auxinas e citocininas) enquanto que a terceira fase é promovida pela retirada destes e pela suplementação de ABA, PEG e maltose.

Foram identificadas diversas anormalidades dos embriões somáticos durante o início da terceira fase e os resultados aqui obtidos suportam a hipótese de que isto ocorre devido ao inadequado estádio de desenvolvimento em que os pró-embriões provenientes da fase de proliferação foram submetidos ao tratamento com ABA. Essa hipótese foi confirmada quando o modelo do normal desenvolvimento de embriões somáticos de *P. abies* foi perturbado. Nesta espécie, quando as MPEs são diretamente submetidas ao ABA, sem a etapa de pré-maturação, são observadas as mesmas anormalidades morfológicas identificadas em *A. angustifolia*. Além disso, a inibição endógena de ABA por meio do

Fluoridone promoveu a diferenciação inicial dos embriões somáticos em *P.sylvestris*. Assim, sugere-se que o gargalo existente no protocolo de embriogênese somática em *A. angustifolia* está na transição das MPEs para embriões somáticos. Os embriões somáticos em estádios iniciais mantêm a capacidade autoreplicativa retornando para estádios de PEMs com ausência de MCP. Isto explicaria a baixa frequência de embriões somáticos maduros observados nesta espécie.

Com base nestes resultados foram identificamos dois pontos de controle neste protocolo: i) individualização do embrião somático a partir das MPEs pelo alongamento do suspensor e posterior degradação por MCP; ii) progressão destes embriões com morfologia normal para os estádios tardios do desenvolvimento. Baseado nestas hipóteses sugere-se o estabelecimento de uma etapa adicional ao protocolo, a etapa de pré-maturação, a qual está presente na maior parte dos protocolos de embriogênese somática desenvolvidos para coníferas. Esta etapa deve incluir tratamentos que promovam o adequado balanço hormonal endógeno, estabelecimento de bipolaridade e MCP das células de suspensor. Esta etapa deve inibir a capacidade autoreplicativa e canalizar as células a uma rota específica do desenvolvimento culminando coma a individualização de embriões somáticos bipolares com morfologia normal.

Cada fase do desenvolvimento embrionário apresenta suas especificidades morfológicas e bioquímicas o qual foi confirmado pela análise proteômica. Nos três estádios de desenvolvimento morfológicos analisados (pró-embrionário, embriogênese inicial e final) foram observadas grupos de proteínas com expressão diferencial. Apesar de serem observadas proteínas que estão totalmente de acordo coma aquelas observadas em outros trabalhos que estudaram o desenvolvimento do embrião, incluindo o embrião zigótico desta espécie, são apontados alguns pontos de controle em termos de morfologia qualidade e frequência dos embriões somáticos formados. Sabe-se da ocorrência de

anormalidades nos embriões conforme descrito no parágrafo anterior. No entanto, foi observada, por exemplo, a presença de proteína de reserva vicilina durante a embriogênese final. Apesar de que esta proteína é considerada como uma proteína marcadora da maturação por diversos trabalhos, os resultados obtidos, tomados em conjunto sugerem que a mesma não é suficiente para conferir a qualidade dos embriões somáticos maduros. Isto porque, apesar de acumularem proteínas de reserva os embriões somáticos podem apresentar anormalidades morfológicas, como a ausência de meristemas, múltiplos cotilédones ou anormalidades em tecidos procambiais.

No entanto, deve ser considerado que a identificação das proteínas observadas nos diferentes estádios foi limitada, constituindo-se em uma limitação do protocolo de análise proteômica, utilizado no presente trabalho. A superação desta limitação técnica pode permitir que este tipo de análise seja utilizado para a identificação e localização temporal de proteínas associadas aos pontos críticos do protocolo de embriogênese em Araucária. Dentre estas proteínas pode-se mencionar aquelas relacionadas ao estabelecimento da bipolaridade dos embriões, como por exemplo, proteínas do transporte de auxina. Isto permitirá avaliar como os tratamentos físicos e químicos utilizados no meio de cultura alteram a presença deste tipo de proteína. Além disso, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para proteínas específicas, semelhante ao JIM 13 avaliado neste trabalho, permitira o monitoramento não somente da qualidade dos embriões mas também dos eventos fisiológicos envolvidos durante a ontogênese. Assim, apesar das dificuldades encontradas para a aplicação da técnica de proteômica para uma espécie com genoma não seqüenciada, como é o caso da *A. angustifolia*, esta técnica se configura como ferramenta de estudo promissora. Sua aplicação permite o estabelecimento da etapa inicial de conexão entre os genes de um organismo, o qual é um sistema constante, e o perfil protéico o qual é extremamente dinâmico.

Finalmente foi estudado o padrão de expressão do gene SERK nas culturas embriogênicas durante a fase pró-embriônica e embriogênese inicial. Novamente considerando as anormalidades observadas no modelo Araucária, pode-se concluir que o gene SERK é um eficiente marcador de células competentes. A expressão deste gene foi observado em células do ápice embrionário e células embriogênicas que constituíam as PEMs. Durante a fase pró-embriônicas a expressão foi observada somente quando o meio de cultura foi suplementado com auxina. Estes resultados confirmam este gene como um marcador de competência embriogênica conforme já foi descrito em diversas outras espécies. Além disso, este é o primeiro trabalho que descreve o gene SERK como sendo um marcador de células competentes em gimnospermas. O único relato anterior deste gene para gimnospermas foi baseado em ESTs. Assim sugere-se que a competência embriogênica pode ser regulada por mecanismos evolutivamente conservados.

6. REFERÊNCIAS

- AFZAL AJ, WOOD AJ, LIGHTFOOT DA (2008) Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Mol Plant Microbe Interact* 21:507-517.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P Ciclo celular e morte celular programada. In: *Biologia molecular da célula*, Artmed Editora, 4ª edição, 2006, p.981-1026.
- ALEMANN L, DEVIC M, NIEMENAK N, SANIER C, GUILLEMINOT J, RIO M, VERDEIL JL, MONTORO P (2008) Characterization of *leafy cotyledon1-like* during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta*, 227:853–866
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25: 3389-3402.
- AMSTERDAM A, PITZER F, BAUMEISTER W, (1993) Changes in intracellular localization of proteasomes in immortalized ovarian granulosa cells during mitosis associated with a role in cell cycle control. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 1993, 90, 99–103.
- ANSELMINI JI & ZANETTE F (2008) Micrografting morphological characterization in *Araucaria angustifolia* *Ciência Rural*, 38:967-973.
- ARNOLD CD, MITRENGA D, MAYRESBACH H (1975) Gefriertro und einbstung in glycolmethacrylat (GMA) – Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. *Acta histochemistry* 14:271-277.
- ASTARITA LV & GUERRA MP (1998) Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 10: 113-118.
- ASTARITA LV & GUERRA MP (2000) Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae), *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 36, 194-200.
- ASTARITA LV, FLOH EIS, HANDRO W (2003a) Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidase associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). *Plant Growth Reg.* 39:113-118.
- ASTARITA LV, FLOH EIS, HANDRO W (2003b) Free amino acids, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biol. Plantarum* 47:53-59.
- ASTARITA LV, HANDRO W, FLOH EIS (2003c) Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Rev. Bras. Bot.* 26:163-168.
- ATTREE SM & FOWKE LC (1993) Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 35, 1-35.

- BABA AIA, NOGUEIRA FCS, PINHEIRO CB, BRASIL JB, JEREISSATI ES, JUCA TL, SOARES AA, SANTOS MF, DOMONT GB, CAMPOS FAP (2008) Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Science* 175: 717–723.
- BAGINSKY S (2009) Plant Proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectrometry Reviews*, 2009, 28, 93– 120.
- BALBUENA TS, SILVEIRA V, JUNQUEIRA M, DIAS LLC, SANTA-CATARINA C, SHEVCHENKO A, FLOH EIS (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) *Journal Proteomic* doi:10.1016/j.jprot.2009.01.011,
- BAUDINO S, HANSEN S, BRETTSCHEIDER R, HECHT VF, DRESSELHAUS T, LÖRZ H, DUMAS C, ROGOWSKY PM (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* 213:1-10.
- BECRAFT PW (1998) Receptor kinases in plant development. *Trends Plant Sci* 3: 384-388.
- BELL PR (1994) Commentary. Apomictic features revealed in a conifer. *Int. J. Plant Sci.*, 155:621-622.
- BEWLEY JD & BLACK M *Seeds: Physiology of development and germination*. 2. ed. New York: Plenum Publishing, 1994. 445p.
- BOUZON ZL Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (*Gigartinales* - *Rhodophyta*). *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná. 1993. 66p.
- BOVE J, JULLIEN M, GRAPPIN P (2001) Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol.* 3:1002.1–1002.5
- BOZHKOV PV, FILONOVA LH, SUAREZ MF, HELMERSSON A, SMERTENKO AP, ZHIVOTOVSKY B, VON ARNOLD S (2004) VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death Differ.* 11: 175–182.
- 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*, 77:6:20.
- BOZHKOV PV, SUAREZ MF, FILONOVA LH, DANIEL G, ZAMYATNIN JR AA, RODRIGUEZ-NIETO S, ZHIVOTOVSKY B, SMERTENKO A (2005) Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis *PNAS* 102:14463–14468.

- BURG K, HELMERSSON A, BOZHKOV P, VON ARNOLD S (2007) Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine *Journal of Experimental Botany* 58: 687-698.
- BURLINGAME L (1915) The morphology of *Araucaria brasiliensis*. III. Fertilization, the embryo, and the seed. *Botanical Gazette*, 59:1-39.
- CAIRNEY J & PULLMAN G (2007) The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New Phytologist* 176:511-536.
- CAIRNEY J, ZHENG L, COWELS A, HSIAO J, ZISMANN V, LIN J, OUYANG S, THIBAUD-NISSEN F, HAMILTON J, CHILDS K, PULLMAN GS, ZHANG Y, OH T, BUELL CR (2006) Expressed Sequence Tags from loblolly pine embryos reveal similarities with angiosperm embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 62:485-501.
- CAMPALANS A, PAGÈS M, MESSEGUER R (2000) Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38:449-457.
- CANGAHUALA-INOCENTE GC, VILLARINO A, SEIXAS D, DUMAS-GAUDOT E, TEREZI H, GUERRA MP (2009) Differential proteomic analysis of developmental stages of *Acacia sellowiana* somatic embryos *Acta Physiologia Plant* DOI 10.1007/s11738-008-0259-.
- CÁNOVAS FM, DUMAS-GAUDOT E, RECORBET G, JORRIN J, MOCK HP, ROSSIGNOL M (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* 4:285-298.
- CARVALHO PER *Espécies arbóreas brasileiras*. Colombo: Embrapa Florestas, v1, 2003, 1039 p.
- CARVALHO PER *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. EMBRAPA-CNPQ. Colombo-PR, 1994. 70-78p.
- CHALUPA V (1985) Somatic embryogenesis in and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Commonwealth Forestry Institute* 14: 57-63.
- CHAPMAN A, BLERVACQ AS, VASSEUR J, HILBERT JL (2000) Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta* 211: 305-314.
- CHEN S & HARMON AC (2006) Advances in plant proteomics. *Proteomics* 6:5504-5516.
- CHIBANI K, ALI-RACHEDI S, JOB C, JOB D, JULLIEN M, GRAPPIN P (2006) Proteomic Analysis of Seed Dormancy in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142:1493-1510.
- CLARKE, P.G. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181: 195-213.

- CYR DR, KLIMASZEWSKA K (2002) Conifer somatic embryogenesis: II. Applications *Dendrobiology*, 48:41–49.
- DOGRA PD (1978) Morphology, development and nomenclature of conifer embryo. *Phytomorphology* 28:307–322.
- DONG JZ & DUNSTAN DI (1997) Endochitinase and β -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta* 201:189-194.
- DORNELAS MC, VAN LAMMEREN AAM, KREIS M (2000) *Arabidopsis thaliana* SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. *Plant Journal* 21 :419-429.
- DORNELAS MC, WITTICH P, VON RECKLINGHAUSEN I, VAN LAMMEREN, AAM, KREIS M (1999) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. *Plant Mol Biol* 39:137-147.
- DUNSTAN DI, DONG JZ, CARRIER D, ABRAMS S (1998) Ets following ABA treatment of spruce somatic embryos. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 34:159-168.
- DURZAN DJ (2008) Monozygotic Cleavage Polyembryogenesis and Conifer Tree Improvement. *Цитология и генетика*. 3.:29-46.
- DURZAN DJ Process control in somatic polyembryogenesis, In J.E. Hällgren. *Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology*, 8:147. Swedish University of Agricultural Sciences. 1988.
- EGERTSDOTTER U & VON ARNOLD S (1998) Development of somatic embryos in Norway spruce. *Journal Experimental of Botany* 49:155-162.
- EDWARDS C & MASON WL (2006) Stand structure and dynamics of four native Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) woodlands in northern Scotland *Forestry*, 79: 261-277.
- FEHÉR A, PASTERNAK TP, DUDITS DN (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:201-207.
- FEHÉR A. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? In: Mujib, A.; Šamaj, J. *Somatic Embryogenesis*. Plant Cell Monographs. vol. 2 (Eds.) 2006, 365 p.
- FERNANDEZ JH Identificação e caracterização de proteínas e genes expresso diferencialmente durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *Araucaria angustifolia*. *Tese de doutorado*. Campinas. Universidade Estadual de campinas. 2001, 126p.
- FILONOVA L, BOZKOV P, VON ARNOLD S (2000b) Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J Exp Bot* 51:343-349.

FILONOVA L, VON ARNOLD S, DANIEL G, BOZHKO V (2002) Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. *Cell Death and Differentiation* 9:1057-1062.

FILONOVA LH, BOZHKO V, BRUKHIN VB, DANIEL G, ZHIVOTOVSKY B, VON ARNOLD S (2000a) Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J. Cell Sci.* 113:4399–4411.

FIND J, GRACE L, KROGSTRUP P (2002) Effect of anti-auxins on maturation of embryogenic tissue cultures of Nordmanns fir (*Abies nordmanniana*) *Physiologia Plantarum* 116: 231 – 237.

FINNIE C, MELCHIOR S, ROEPSTORFF P, SVENSSON B (2002) Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiol.* 129:1308–1319.

FOOTITT S, INGOUFF M, CLAPHAM D, VON ARNOLD S (2003) Expression of the *viviparous 1* (*Pavp1*) and *p34cdc2* protein kinase (*cdc2Pa*) genes during somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst). *J. Exp. Bot.* 54:1711-1719.

GALLARDO K, FIRNHABER C, ZUBER H, HÉRICHER D, BELGHAZI M, HENRY C, KÜSTER H, THOMPSON R (2007) A Combined Proteome and Transcriptome Analysis of Developing *Medicago truncatula* Seeds: Evidence for Metabolic Specialization of Maternal and Filial Tissues. *Molecular & Cellular Proteomics*, doi:10.1074/mcp.M700171

GALLARDO K, JOB C, GROOT SPC, PUYPE M, DEMOL H, VANDEKERCKHOVE J, JOB D (2001) Proteomic Analysis of *Arabidopsis* Seed Germination and Priming. *Plant Physiology*, 126, 835-848.

GALLARDO K, SIGNOR C, VANDEKERCKHOVE JI, THOMPSON RD, BURSTIN J (2003) Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic process related to reserve accumulation. *Plant Physiol.* 133:664–682.

GARCÍA-MARTÍN G, MANZANERA JA, GONZA ME, GONZALEZ-BENITO MF (2005) Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 171–177.

GIFFORD EM & FOSTER AS *Morphology and evolution of vascular plants*, W. H. Freeman Co, New York, 1988 p. 401-453.

GUERRA MP, SILVEIRA V, SANTOS ALW, ASTARITA LV, NODARI RO. Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, In S. Jain; P. Gupta; R. Newton (eds.). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 6: 2000, 180-205, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

GUERRA MP, SILVEIRA V, SCHNAIDER L, SEDREZ M, NODARI RO. In SIMÕES, L.L. e LINO, C.F. (ed) *Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais*. São Paulo. SENAC. 2002.

GUERRA MP, STEINER N, MANTOVANI A, NODARI RO, REIS MS, SANTOS K Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. In: Barbieri RL, *Evolução de Plantas Cultivadas*, EMBRAPA, Brasília-DF. 2008, p.149-184.

GUERRA MP, TEIXEIRA JB, TORRES AC. Poliembriogênese Somática, in Torres, A.C. e Caldas, L. *Técnicas e Aplicações da Biologia Celular e Molecular em Plantas*, Embrapa. 1999.

GUNAWARDENA AH, GREENWOOD JS, DENGLER NG (2004) Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. *Plant Cell* 16:60–73.

GUPTA PK & DURZAN DJ (1986) Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Bio/Technology* 4: 643–645.

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, *US patent* , 5: 36- 37.

HAECKER A, GROß-HARDT R, GEIGES B, SARKAR A, BREUNINGER H, HERRMANN M, LAUX T (2004) Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131:657–668

HAINES RJ & PRAKASH N (1980) Proembryo development and suspensor elongation in *Araucaria Juss.* Aust, *Journal of Botany*, 28: 511-523.

HAKMAN I & VON ARNOLD S (1985) Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). *Journal of Plant Physiology*. 121:149-158.

HAKMAN I (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 87:148-159.

HAKMAN I, HALLBERG H, PALOVAARA J (2009) The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator protein PIN during *Picea abies* somatic embryo development *Tree Physiology*, doi:10.1093/treephys/tpn048

HARRIS N & OPARKA KJ (1994) *Plant Cell Biology. A Practical Approach* IRL Press: Oxford.

HAVEL L & DURZAN DJ (1996a) Apoptosis in plant. *Bot. Acta.*, 109:1-10.

HAVEL L & DURZAN DJ (1996b) Apoptosis during diploid parthenogenesis and early somatic embryogenesis of Norway Spruce. *Int. J. Plant Sci.*, 157:8-16.

- HECHT V, VIELLE-CALZADA JP, HARTOG MV, SCHMIDT ED, BOUTILIER K, GROSSNIKLAUS U, DE VRIES SC (2001) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* 127:803-816.
- HELMERSSON A, VON ARNOLD S, BOZHKOV PV (2008) The level of free intracellular zinc controls programmed cell death/cell survival decisions in plant embryos. *Plant Physiology.* 147:1158-1167.
- HIGGINS TJV (1984) Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annual Review of Plant Physiology* 35:191-221.
- HÖGBERG KA (2003) Possibilities and Limitations of Vegetative Propagation of Norway spruce. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. *Silvestria* 294.
- HUTSO NR, RHODES MR, KIRBY ML (1997) Differential expression of a proteasomal subunit during chick development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234: 216–223.
- IMIN N, GOFFARD N, NIZAMIDIN M, ROLFE BG (2008) Genome-wide transcriptional analysis of super-embryogenic *Medicago truncatula* explant cultures *BMC Plant Biology*, 8:110,1-14.
- IMIN N, JONG F, MATHESIUS U, VAN NOORDEN G, SAEED NA, WANG X, ROSE RJ, ROLFE BG (2004) Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics* 4:1883–1896.
- IMIN N, NIZAMIDIN M, DANIHER D, NOLAN KE, ROSE RJ, ROLFE BG (2005) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6- benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiology*, 137:1250–1260.
- JAIN SM, GUPTA PK, NEWTON RJ *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 388.
- JIMÉNEZ VM, GUEVARA E, HERRERA J, BANGERTH F (2005) Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 23:567–572.
- JOHANSEN DA *Plant embryology*. Chronica Botanica Company, New York. 1950
- KEINONEN-METTÄLÄ K, JALONEN P, EUROLA P, VON ARNOLD S & VON WEISSENBERG K (1996) Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 11: 242–250.
- KNOX JP, DAY S, ROBERTS K (1989) A set of surface glycoproteins forms an early marked of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L. *Development*, 106:47-56.

- KNOX JP, LINSTED PJ, PEART J, COOPER C, ROBERTS K. (1991) Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant Journal* 1:317-326.
- KORMUTÁK A & VOOKOVÁ B (1997) Biochemical variation between non-embryogenic and embryogenic calli of silver fir. *Biologia Plantarum*, 39:125-130.
- KORMUTÁK A, SALAJ T, VOOKOVÁ B (2006) Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. *Biologia Bratislava*, 61: 479-485.
- LAM E, KATO N, LAWTON M, (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848–853.
- LANGHANSOVÁ L, KONRÁDOVÁ H, VANEK T (2004) Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of Panax ginseng somatic embryos. *Plant Cell Rep* 22:725–730.
- LARSSON E, SITBON F, LJUNG K, VON ARNOLD S (2007) Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce *New Phytologist* 177: 356–366.
- LARSSON E, SITBON F, VON ARNOLD S (2008) Polar auxin transport controls suspensor fate *Plant Signal Behav* 7: 469–470.
- LAUX T, JURGENS G Embryogenesis: A New Start in Life. *Plant Cell* 9:989-1000. Merkle, S. A.; Parrott W. A.; Flinn, B. S. 1995. *Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, cap. 5. 1997. p. 155 – 203.
- LELU MA, BASTIEN C, DRUGEAULT A, GOUEZ ML, KLIMASZEWSKA K (1999) Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without plant growth regulators. *Physiologia Plantarum* 105, 719–728.
- LI XY, HUANG FH, MURPHY JB, GBUR EE (1998) Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant*, 34:22-26.
- LIPPERT D, ZHUANG J, RALPH S, ELLIS DE, GILBERT M, OLAFSON R, RITLAND K, ELLIS B, DOUGLAS CJ, BOHLMANN J (2005) Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics* 5: 461–473.
- MANTOVANI A, MORELLATO LPC, REIS MS (2004) Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Revista Brasileira de Botânica* 27:787-796.
- MARSONI M, BRACALE M, ESPEN L, PRINSI B, NEGRI AS, VANNINI C (2008) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera* *Plant cell reports*, 27:347-356.

- MASTROBERTI AA & MARIATH JEA (2003) Compartmented cells in the mesophyll of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Australian Journal of Botany*, 51:267– 274.
- MATTOS JR de O Pinheiro Brasileiro. 1. 2^a ed. Artes gráficas Princesa Ltda. Lages-SC. 1994.
- MISRA S In: SM JAIN, PK GUPTA & RJ NEWTON, (eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, p. 119-142.
- MO LH, EGERTSDOTTER U, VON ARNOLD S (1996) Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. *Annals of Botany* 77:143-152.
- MORAES FMS Análise Proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* Mez(Lauracea). *Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Molecular)* - Universidade de Brasília. 2006, 95 p.
- MORDHORTS AP, TOONEN MAJ, DE VRIES S (1997) Plant Embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16:535-576.
- NATARAJAN S, XU C, CARPENA TJ, GARRETT WM (2005) Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal. Biochem* 342:214–220.
- NEWTON RP, BRENTON AG, SMITH CJ, DUDLEY E (2004) Plant Proteome Analysis by Mass Spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry*, 65:1449-1485.
- NOGUEIRA FCS Análise Proteômica da Deposição de Proteínas em Sementes em Desenvolvimento e Suspensões Celulares Embriogênicas de Feijão-de-Corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007, 115p.
- NOLAN KE, IRWANTO RR, ROSE RJ (2003) Auxin up regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root forming and embryogenic cultures *Plant Physiol.* 133: 218-230.
- OLIVEIRA SANTOS M, ROMANO E, YOTOKO KSC, TINOCO LMP, DIAS BBA, ARAGAO FJM (2005) Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-likekinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis, *Plant Sci.* 168:723-729.
- PANZA V, LÁINEZ V, MARODER H, PREGO I, MALDONADO S (2002) Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140:273-281.
- PARK OK (2004) Proteomics studies in plants. *J. Bioch. Mol. Biol.* 37:133-138.
- PARK YS, LELU-WALTER MA, HARVENGT L, TRONTIN JF, MAC EACHERON I, KLIMASZEWSKA K, BONGA JM (2006) Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus*

banksiana, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant cell organ tissue culture* 86: 87-101.

PESCADOR R, KERBAUY GB, VIVIANI D, KRAUS JE (2008) Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae) *Revista Brasil Bot*, 31:155-164.

REITZ PR & KLEIN RM (1966) Araucariáceas. In: Reitz, PR *Flora Ilustrada Catarinense*, 1:1-55.

REITZ R, KLEIN RM, REIS A. *Projeto Madeira de Santa Catarina*. Separata 28 de sellowia–Herbário Barbosa Rodrigues, Itajai. 1978.

ROJAS-HERRERA R, QUEIROZ-FIGUEROA FR, MONFORTE-GONZÁLEZ M, SÁNCHEZ-TEYER F, LOYOLA-VARGAS VM (2002) Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* revealed by RT-PCR differential display. *Mol. Biotechnol.* 21: 43-50.

ROSSIGNOL M, PELTIER JB, MOCK HP, MATROS A, MALDONADO AM, JORRÍN JV (2006) Plant proteom analysis: a 2004 – 2006 update. *Proteomics* 6:5529–5548.

SAITOU N & NEI M (1987) The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec Biol Evol* 4:406-425.

SALAJ J, VON RECKLINGHAUSEN IR, HECHT V, VRIES SC, SCHEL JHN, VAN LAMMEREN AAM (2008) AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 709-714.

SALLANDROUZE A, FAUROBERT M, MAËTAOUI ME (2002) Characterization of the development stages of cypress zygotic embryos by two-dimensional electrophoresis and by cytochemistry. *Physiology Plant*, 114:608 – 618.

SANTA-CATARINA C, HANAI LR, DORNELAS MC, VIANA AM, FLOH EIS (2004) SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 79:53-61.

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 Regul* 49:237–247.

SANTOS ALW, SILVEIRA V, STEINER N, VIDOR M, GUERRA MP (2002) Somatic Embryogenesis in Paraná Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). *Brazilian archives of Biology and Technology*, 45: 97-106.

SANTOS ALW, STEINER N, GUERRA MP, ZOGLAUER K, MOERSCHBACHER BM (2008) Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 52:195-199.

SANTOS ALW, WIETHÖLTER N, 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.

SCHELLENBAUM P, JACQUES A, MAILLOT P, BERTSCH C, MAZET F, FARINE S, WALTER B (2008) Characterization of VvSERK1, VvSERK2, VvSERK3 and VvL1L genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *Plant Cell Rep* 27:1799–1809

SCHMIDT ED, GUZZO F, TOONEN MA, DE VRIES SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124:2049-2062.

SEIFERT GJ & ROBERTS K (2007) The Biology of Arabinogalactan Proteins *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:137–61

SETOGUCHI H, OSAWA TA, PINTAUD J, JAFFRÉ T & VEILLON J (1998) Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. *Am. J. of Botany*, 85:1507.

SHEWRY PR, NAPIER JA, TATHAM AS (1995) Seed storage proteins. Structures and Biosynthesis. *The Pant Cell*, 7: 945.

SHIMIZU JY & OLIVEIRA YMM *Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da Araucaria no sul do Brasil*. EMBRAPA-URPFCS. Documentos, 04. Curitiba-PR. 1981, 9p.

SHOWALTER AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:1361-1362.

SILVEIRA V, Aspectos fisiológicos e bioquímicos da embriogênese em *Araucaria angustifolia* e *Pinus taeda*. *Tese de doutorado*. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2004.

SILVEIRA V, BALBUENA TS, SANTA-CATARINA C, FLOH EIS, GUERRA MP, HANDRO W (2004a) Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regulation*, 44:147-156.

SILVEIRA V, FLOH EIS, HANDRO W, GUERRA MP (2004b) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76:53–60.

SILVEIRA V, SANTA-CATARINA C, BALBUENA 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*. *Biol. Plant.* 52: 101-104.

SILVEIRA V, SANTA-CATARINA C, TUN NN, SCHERER GFE, HANDRO W, GUERRA MP, FLOH EIS (2006) Polyamine effects on the endogenous polyamine

contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant Sci* 171: 91-98.

SILVEIRA V, STEINER N, 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*. Brasil: 2:463 – 470.

SINGH H *Embryology of Gymnosperms*. Handbuch der Pflanzenanatomie, v.10. (Berlin: Gebruder Borntraeger), 1978.

SINGLA B, KHURANA JP, KHURANA P (2008) Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum* *Plant Cell Rep*, 27:833–843

SKYLAS DJ, MACKINTOSH JA, CORDWELL SJ, BASSEAL DJ, WALSH BJ, HARRY J, BLUMENTHAL C, COPELAND L, WRIGLEY CW, RATHMELL W (2000) Proteome approach to the characterization of protein composition in the developing and mature wheat-grain endosperm. *J. Cereal Sci.* 32:169–188.

SMERTENKO AP, BOZHKOVA PV, FILONOVA LF, VON ARNOLD S, HUSSEY PJ (2003) Re-organization of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. *The Plant Journal*, 33:813-824.

SOMLEVA MN, SCHMIDT EDL, DE VRIES SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep* 19:718-726.

SONG D, LI G, SONG F, ZHENG Z (2007) Molecular characterization and expression analysis of OsBISERK1, a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase, during disease resistance responses in rice. *Mol Biol Rep* 35:275–283.

SOUTER M & LINDSEY K (2000) Polarity and signalling in plant embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 51: 971-983.

STACEY NJ, ROBERTS K, KNOX JP (1990) Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. *Planta* 180:285-292.

STASOLA C, VAN ZYL L, EGERSTDOTTER U, CRAIG D, LIU W, SEDEROFF RR (2003) The effects of Polyethylene Glycol on Gene Expression of Developing White Spruce Somatic Embryos. *Plant Physiology*, 131:49 – 60.

STASOLLA C & YEUNG E (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryos quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 15-35.

STEEL RGD & TORRIE JH (1988) Bioestadística: Principios y Procedimientos. México: Mc Graw – Hill. 633p.

STEINER N Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante e embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* Bert O. Kuntze. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2005, 123p.

STEINER N, SANTA-CATARINA C, ANDRADE JBR, BALBUENA TS, GUERRA MP, HANDRO W, FLOH EIS, SILVEIRA V (2008) *Araucaria angustifolia* Biotechnology. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 2: 20-28.

STEINER N, SANTA-CATARINA C, SILVEIRA V, FLOH EIS, GUERRA MP (2007) Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* Embryogenic cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 89: 55-62.

STEINER N, VIEIRA F DON, MALDONADO S, GUERRA MP (2005) Carbon Source Affects Morphogenesis and Histodifferentiation of *A. angustifolia* Embryogenic Cultures. *Brazilian archives of Biology and Technology* 48:896-903.

SUÁREZ MF, BOZHKO V (ed.): *Plant Embryogenesis* - Humana Press, Totowa 2008. 184 pp.

SUPRASANNA P & BAPAT VA. Differential Gene Expression During Somatic Embryogenesis. *Plant Cell Monographs* In: A. Mujib · J. Samaj: Somatic Embryogenesis Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.

TAUTORUS TE, FOWKE LC, DUNSTAN DI (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany*, 69:1873-1899.

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.

TIAN L, ZHANG L, ZHANG J, SONG Y, GUO Y (2009) Differential proteomic analysis of soluble extracellular proteins reveals the cysteine protease and cystatin involved in suspension-cultured cell proliferation in rice. *Biochimica et Biophysica Acta* 17:459-467.

TOONEN MAJ, SCHMIDT EDL, HENDRIKS T, VERHOEVER HA, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC (1996) Expression of the JIM8 cell wall epitope in carrot somatic embryogenesis. *Planta* 200:167-173.

TUCKER MR, ARAUJO ACG, PAECH NA, HECHT V, SCHMIDT EDL, ROSSELL JB, DE VRIES SC, KOLTUNOW AMG (2003) Sexual and Apomictic Reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* Are Closely Interrelated Developmental Pathways *The Plant Cell*, 15:1524-1537.

TUN NN, SANTA-CATARINA C, BEGUM T, SILVEIRA V, HANDRO W, SEGAL FLOH EI, SCHERER GFE (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology* 47:346-354.

VAN HENGEL AJ, TADESSE Z, IMMERZEEL P, SCHOLS H, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC (2001) N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis *Plant Physiology* 125:1880-1890.

- VAN HENGEL AJ, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC (2002) A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPS) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 114:637-644.
- VENSEL WH, TANAKA CK, CAI N, WONG JH, BUCHANAN BB, HURKMAN WJ (2005) Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* 5:1594–1611.
- VERDEIL JL, ALEMANN L, NIEMENAK N, TRANBARGER TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* 12:243–252
- VOGEL G (2005) How Does a Single Somatic Cell Become a Whole Plant? *Science*, 309(5731):86.
- VON ARNOLD S, EGERTSDOTTER U, EKBERG I, GUPTA P, MO H, NÖRGAARD J Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*), In: Jain S; Gupta P; Newton R *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 3, Kluwer Publishers, Netherlands. 1995.
- VON ARNOLD S, SABALA I, BOZKOV P, DYACHOK J, FILANOVA L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 233–249.
- WESTERMEIER R & NAVEN T *Proteomics in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- WILKINS MR, WILLIAMS KL, APPEL RD, HOCHSTRASSER D. (Eds.) *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer-Verlag, Berlin, 1997p. 493.
- WILLIAMS EG & MAHESWARAN G (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57:443-462.
- WINKELMANN T, VAN DORSSELAER DHA, HANS-PETER BRAUN MS (2006) Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination. *Physiologia Plantarum*, 224:508 – 519.
- ZOGLAUER K, BEHRENDT U, RAHMAT A, ROSS H *Somatic embryogenesis – the gate of biotechnology in conifers* In: Rücker, W.; Laimer, H.: *Plant tissue culture one hundred years after Gottlieb Haberlandt*. Springer-Verlag, im Druck. 2002.
- ZHANG M, XU C, YAN H, ZHAO N, VON WETTSTEIN D, LIU B (2009) Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F1 hybrids of sorghum pure lines are accompanied by increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases. *The Plant Journal* 57: 666–679.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)