

**NEUSA STEINER**

**PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DURANTE A  
EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA E SOMÁTICA DE  
*Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KUNTZE.**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina, como requisito  
parcial à obtenção do título de mestre em  
Recursos Genéticos Vegetais.**

**Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra**

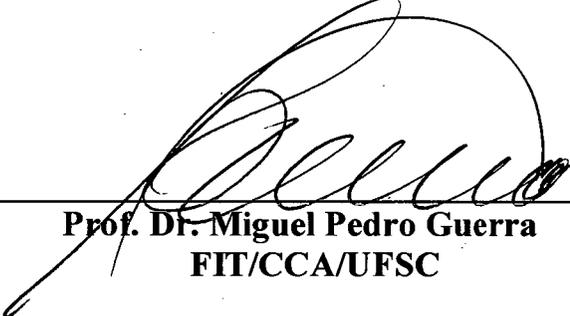
**Florianópolis  
2005**

**"PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS  
DURANTE A EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA E  
SOMÁTICA EM *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE"**

**NEUSA STEINER**

**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final pelo Orientador e membros  
da Comissão Examinadora.**

**Comissão Examinadora:**



---

**Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra  
FIT/CCA/UFSC**



---

**Dr. Adauto Bellarmino de Pereira Netto  
UFPR/PR**



---

**Pesq. Dr. Mário Vidor  
EPAGRI/SC**



---

**Prof. Dr. Marcelo Maraschin  
FIT/CCA/UFSC**

Florianópolis, fevereiro de 2005

**“A verdadeira fortaleza é a que nos torna inflexíveis, quando se trata da virtude” (Plutarco).**

**AGRADECIMENTOS**

Minha gratidão ao Professor Dr. Miguel Pedro Guerra pela orientação, por toda a confiança, atenção e amizade dispensadas durante a realização deste trabalho, e por todas as oportunidades que me ofereceu durante a graduação e mestrado.

Aos professores Rubens Nodari e Mauricio Sedrez dos Reis pela atenção e amizade dispensada durante o mestrado.

Aos professores, Dra. Eny. I. S. Floh e Dr. Walter Handro do Laboratório de Biologia Celular de Plantas da Universidade de São Paulo que permitiram a realização das análises bioquímicas realizadas neste trabalho.

À profesora, Dra. Sara Beatriz Maldonado da Universidade de Buenos Aires, pelo incentivo e pelas valiosas contribuições a este trabalho.

Aos amigos, André Luis e Vanildo Silveira pela atenção, por todas as técnicas que me ensinaram e pelo incentivo ao meu trabalho.

À Claudete Santa Catarina, por todo apoio, assistência nas análises bioquímicas e por todas as valiosas contribuições durante a realização deste trabalho.

Aos professores, Dr. Aducto B. Pereira, Dr. Marcelo Maraschin, Dr. Adelar Mantovani e ao pesquisador Dr. Mário Vidor por aceitar tão gentilmente fazer parte da banca deste trabalho.

À Luisa e Bernadete pela presteza e dedicação com que me ajudaram em tantos momentos, em especial a Luisa pela atenção técnica dispensada desde os tempos de minha graduação.

À Karine, pelo apoio e pelo seu "discreto" bom humor em momentos de descontração, ao Lírio pela fortaleza e à Gabriela pela amizade e companheirismo.

Ao Felipe do Nascimento Vieira, pela amizade, dedicação e ajuda na realização das coletas e dos experimentos.

À todos os colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética vegetal, pela amizade e convivência.

À toda turma RGV-2002 pela convivência, pelas festas, pela confiança e bom humor.

Ao Nei por todo amor, suporte, incentivo e total apoio para realização deste trabalho.

Aos meus pais, Donato Steiner e Darci Beltrame Steiner, e aos meus irmãos, Marcelo, Tiago e Felipe, por compreenderem a minha ausência e pela confiança e apoio durante minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade de realização deste trabalho e pela confiança depositada.

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Santa Catarina por oferecer o ensino gratuito e de qualidade.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b>	<b>1</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES</b>	<b>11</b>
<b>1.1 JUSTIFICATIVA</b>	<b>12</b>
<b>1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>13</b>
1.2.1. <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i>	13
1.2.2. EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA EM CONÍFERAS	14
1.2.3. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CONÍFERAS	15
1.2.4. SUSPENSÕES CELULARES	17
1.2.5. PARÂMETROS DO METABOLISMO ASSOCIADO A EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA E SOMÁTICA	19
1.2.5.1. <i>Poliaminas</i>	19
1.2.5.2. <i>Ácido abscísico (ABA) e ácido indol-3-acético (AIA)</i>	20
1.2.5.3. <i>Proteínas e compostos de reserva</i>	21
<b>1.3. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
1.3.1. OBJETIVO GERAL	22
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
<b>CAPITULO I*</b>	<b>24</b>
<b>INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS</b>	<b>24</b>
<b>DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i></b>	<b>24</b>
<b>2.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>25</b>
<b>2.2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
2.2.1. MATERIAL VEGETAL	26
2.2.2. INDUÇÃO DAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	26
2.2.3. MULTIPLICAÇÃO DAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	27
2.2.4. EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE AMIDO	27
2.2.5. EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS	28
2.2.6. DETERMINAÇÃO DE POLIAMINAS	29
2.2.7. DETERMINAÇÃO DE AIA E ABA	30
2.2.8. DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA SECA	31
<b>2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
2.3.1. INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS	31

2.3.2. MORFOLOGIA CELULAR E COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA	35
2.3.3. PROTEÍNA, AMIDO, ABA E MATÉRIA SECA	39
2.3.4. AIA	42
2.3.5. POLIAMINAS	44
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>47</b>
<b>DINÂMICA DE CRESCIMENTO E ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE SUSPENSÕES CELULARES EMBRIOGÊNÉTICAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i></b>	<b>47</b>
<b>3.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>48</b>
<b>3.2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
3.2.1. MATERIAL VEGETAL	49
3.2.2. MEIO DE CULTURA	49
3.2.3. CONDIÇÕES DE CULTURA <i>IN VITRO</i>	50
3.2.4. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMIDO	50
3.2.5. DETERMINAÇÃO DE POLIAMINAS	51
3.2.6. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
<b>3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
3.3.1. DINÂMICA DE CRESCIMENTO E PH DO MEIO DE CULTURA	51
3.3.2. POLIAMINAS	55
3.3.3. PROTEÍNAS E AMIDO	62
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>64</b>
<b>PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIQUÍMICOS DURANTE A EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA E MATURAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNÉTICAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i></b>	<b>64</b>
<b>4.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>65</b>
<b>4.2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>66</b>
4.2.1. MATERIAL VEGETAL	66
4.2.2. MEIO DE CULTURA	66
4.2.3. CONDIÇÕES DE CULTURA <i>IN VITRO</i>	67
4.2.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA E CITOQUÍMICA	67
4.2.5. DETERMINAÇÃO DE AIA E ABA	68
4.2.6. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMIDO	68
4.2.7. INCREMENTO DA MATÉRIA FRESCA (MF) E DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA SECA (MS)	69
4.2.8. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
<b>4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
4.3.1. PROTEÍNAS E AMIDO DURANTE A EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA	69
4.3.2. DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS	71
4.3.3. INCREMENTO DA MATÉRIA FRESCA (MF) E MATÉRIA SECA (MS)	77
4.3.4. PROTEÍNAS E AMIDO	78
4.3.5. AIA E ABA	82

---

<b>CAPITULO IV</b>	<b>87</b>
<b>EFEITO DAS POLIAMINAS EXÓGENAS DURANTE A MULTIPLICAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i></b>	<b>87</b>
<b>5.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>88</b>
<b>5.2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>89</b>
5.2.1. MATERIAL VEGETAL	89
5.2.2. MEIO DE CULTURA	89
5.2.3. CONDIÇÕES DE CULTURA <i>IN VITRO</i>	89
5.2.4. INCREMENTO DA MATÉRIA FRESCA (MF) E DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA SECA (MS)	90
5.2.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMIDO	90
5.2.6. DETERMINAÇÃO DE AIA E ABA	90
5.2.7. DETERMINAÇÃO DE POLIAMINAS	91
5.2.8. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	91
<b>5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>91</b>
5.3.1. INCREMENTO DA MATÉRIA FRESCA (MF) E MATÉRIA SECA (MS)	91
5.3.2. PROTEÍNAS E AMIDO	94
5.3.3. AIA E ABA	95
5.3.4. POLIAMINAS	98
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>102</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>110</b>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES

Figura 1. Curva de crescimento celular típica, na qual se relaciona o número de células nas diferentes fases (inicial, exponencial, linear, de desaceleração e estacionária) com o tempo de cultivo (Adaptado de Szabados *et al.*, 1993) .....18

CAPITULO I

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento de indução de *A. angustifolia*.....27

Tabela 2. Estádio de desenvolvimento dos embriões zigóticos de *A. angustifolia* provenientes de três genótipos diferentes em três datas de coleta.....32

Tabela 3. Taxa de indução das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* a partir de embriões zigóticos em diferentes estádios de desenvolvimento.....33

Tabela 4. Efeito da fonte de carbono na taxa de indução de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.....34

Tabela 5. Taxa média de indução de culturas embriogênicas em *A. angustifolia* em resposta a diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores.....35

Figura 1. Embriogênese zigótica e somática em *Araucaria angustifolia*. A) pró-embrião zigótico, b) embrião zigótico globular, c) embrião zigótico pré cotiledonar, d) embrião zigótico cotiledonar e) embrião zigótico cotiledonar tardio, f) indução da cultura embriogênica a partir do ápice embrionário zigótico, g) multiplicação da cultura embriogênica, h) tipos celulares mais frequentes

em culturas embriogênicas na fase de multiplicação, i,j,k,l) sucessivos estágios de desenvolvimento de pró-embriões somáticos. (Barras a,b,c,d,e,f,g=1mm; h=12,5µm; I,j,k=25µm; l=50 µm e m=125 µm).....37

Figura 2. Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas à análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans. a) células pequenas isodiamétricas reativas ao carmim acético, b) células alongadas e vacuoladas permeáveis ao corante azul de Evans, c) culturas embriogênicas com morfologia bipolar induzidas e mantidas em meio de cultura suplementado com maltose. O pró-embrião é formado por um agregado de células embriogênicas conectado a células do suspensor, d) culturas mantidas em meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) suplementado com sacarose apresentando morfologia difusa, com distúrbio da polaridade. O pró-embrião consiste em um agregado de células embriogênicas circundado por células do suspensor (Barras a,b = 15µm e b,c = 250µm).....38

Figura 3. Diagrama dos eventos morfogenéticos associados ao protocolo de embriogênese somática em *A. angustifolia*. a, b) efeito da fonte de carbono na morfologia das culturas embriogênicas e histodiferenciação dos embriões somáticos.....39

Tabela 6. Efeito dos tratamentos de multiplicação no conteúdo endógeno de AIA, ABA, proteína, amido e MS% das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. Maltose (M), sacarose (S), fitorreguladores 2,4-D (2µM), BAP e Kin (0,5µM cada) (2) e ausência de fitorreguladores (0).....43

Tabela 7. Efeito da fonte de carbono no conteúdo endógeno de AIA, ABA, proteína, amido e MS durante a multiplicação das culturas embriogênicas de *A. Angustifolia*.....44

Tabela 8. Efeito da presença e ausência de fitorreguladores no conteúdo endógeno de AIA, ABA, proteína, amido e MS durante a multiplicação das culturas embriogênicas de *A. Angustifolia*.....44

Figura 4. (A) PAs Totais, (B) razão de PAs, (C) PAs Livres e (D) PAs conjugadas das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* nos diferentes tratamentos de multiplicação. Meio de cultura BM suplementado para maltose (M), sacarose (S), fitorreguladores 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M cada) (2) e isento de fitorreguladores (0). (A e B) Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $p < 0,05$ ) (C.V.<sub>A</sub> = 11,2%; C.V.<sub>B</sub> = 7,3%) (C e D) Dados representam a média  $\pm$  desvio padrão.....46

## CAPITULO II

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento de suspensões celulares de *A. angustifolia*.....49

Figura 1. Efeito da fonte de carbono e dos fitorreguladores suplementados ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) em suspensões celulares de *A. angustifolia*. (A) Dinâmica de crescimento (B) pH do meio de cultura. Tratamentos: SF (BM + sacarose (3%) + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); S (BM +sacarose (3%)), MF (BM +maltose (3%) + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); M (BM + maltose (3%)); CF (BM + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); CMS (BM).....54

Figura 2. Efeito da fonte de carbono e fitorreguladores suplementados ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) em suspensões celulares de *A. angustifolia*. (A,B,C) Put, Spd e Spm Livre (D,E,F) Put, Spd e Spm Conjugada. Tratamentos: SF (BM + sacarose (3%) + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); S (BM +sacarose (3%)), MF (BM + maltose (3%) + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); M (BM + maltose (3%)); CF (BM + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); CMS (BM).....60

Figura 3. Efeito da fonte de carbono e fitorreguladores suplementados ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo de PAs em suspensões celulares de *A. angustifolia*. (A) PAs totais (B) Razão [Put.(Spd+Spm)]<sup>-1</sup>. Tratamentos: SF (BM + sacarose (3%) + 2,4-D (2 $\mu$ M),

BAP e Kin (0,5µM)); S (BM +sacarose (3%)), MF (BM +maltose (3%) + 2,4-D (2µM), BAP e Kin (0,5µM)); M (BM + maltose (3%)); CF (BM + 2,4-D (2µM), BAP e Kin (0,5µM)); CMS (BM).....61

Figura 4. Efeito da fonte de carbono e fitorreguladores suplementados ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo de proteínas e amido em suspensões celulares de *A. angustifolia*. (A) Proteína (B) Amido. Tratamentos: SF (BM + sacarose (3%) + 2,4-D (2µM), BAP e Kin (0,5µM)); S (BM + sacarose (3%)), MF (BM + maltose (3%) + 2,4-D (2µM), BAP e Kin (0,5µM)); M (BM + maltose (3%)); CF (BM + 2,4-D (2µM), BAP e Kin (0,5µM)); CMS (BM).....63

### CAPITULO III

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento de suspensões celulares de *A. angustifolia*.....67

Figura 1. Teores de proteínas (A) e amido (B) nos diferentes estágios de desenvolvimento embrião zigótico de *A. angustifolia*. 1- pró-embrião; 2- globular; 3- pré-cotiledonar; 4- cotiledonar; 5-maduro. Os dados estão representados pela média e desvio padrão.....71

Figura 2. Efeito dos diferentes tratamentos de maturação nas culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. a) cultura embriogênica em meio de cultura com sacarose (9%) e ABA (150µM) com aspecto granular e embriões somáticos com a superfície rugosa; b) cultura embriogênica em meio de cultura com maltose (9%) e ABA (150µM); c,d) embriões somáticos globulares na superfície da cultura embriogênica; e,f) embriões somáticos globulares, torpedo e cotiledonares na superfície da cultura embriogênica; g) embrião somático cotiledonar; f) embrião somático com cotilédones clorofilados em meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) suplementado com carvão ativado 1,5 g.L<sup>-1</sup>. (Barras =1mm).....75

Figura 3. Análise citoquímica e histológica durante a maturação das culturas embriogênicas *A. angustifolia*. a) padrão morfológico da cultura embriogênica antes de ser submetida aos

tratamentos de maturação b) embriões somáticos na superfície da cultura embriogênica em meio de cultura com maltose (9%) e ABA (150µM); c,d) embriões somáticos globulares na superfície da cultura embriogênica reativos ao carmim acético; e) embriões somáticos globulares na superfície da cultura embriogênica evidenciando a formação da protoderme. (Barras a,b=1mm; c=125µm; d=50µ; e e=25 µm).....76

Figura 4. (A) Multiplicação celular; (B) matéria seca (MS) das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas aos diferentes tratamentos de maturação. Os dados estão representados pela média e desvio padrão.....78

Figura 5. Efeito dos diferentes tratamentos de maturação no conteúdo endógeno de proteínas e amido em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* provenientes de dois tratamentos de multiplicação. (A, B) Proteínas e Amido nas culturas embriogênicas provenientes do meio de cultura isento de fitorreguladores; (C,D) Proteínas e Amido nas culturas embriogênicas provenientes do meio de cultura suplementado com 2,4-D (2µM), BAP e Kin (0,5µM). Os dados estão representados pela média e desvio padrão.....81

Tabela 2. Efeito dos tratamentos de maturação no conteúdo endógeno de AIA e ABA das culturas embriogênicas de *A. Angustifolia*.....83

Tabela 3. Efeito da suplementação de ABA no conteúdo endógeno de AIA e ABA durante a maturação das culturas embriogênicas de *A. Angustifolia*.....83

Tabela 4. Efeito da suplementação de sacarose e maltose (9%) no conteúdo endógeno de AIA e ABA durante a maturação das culturas embriogênicas de *A. Angustifolia*.....84

Tabela 5. Efeito da presença de fitorreguladores durante a multiplicação no conteúdo endógeno de AIA e ABA durante a maturação das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.....84

## CAPITULO IV

Figura 1. Efeito da adição de PAs e outros fitorreguladores ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) na multiplicação e MS das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. (A) Multiplicação celular; (B) MS%. BM0 (meio de cultura isento de fitorreguladores); BM2 (meio de cultura suplementado com 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)). Os dados foram representados pela média e desvio padrão.....93

Figura 2. Efeito da adição de PAs e outros fitorreguladores ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo endógeno de proteínas e amido das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. (A) Proteínas; (B) amido. BM0 (meio de cultura isento de fitorreguladores); BM2 (meio de cultura suplementado com 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)). Os dados foram representados pela média e desvio padrão.....95

Figura 3. Efeito da adição de PAs e outros fitorreguladores ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo endógeno de AIA e ABA das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. (A) AIA; (B) ABA. BM0 (meio de cultura isento de fitorreguladores); BM2 meio de cultura suplementado com 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)). Os dados foram representados pela média e desvio padrão.....97

Figura 4. Efeito da adição de PAs e outros fitorreguladores ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo endógeno de PAs das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. (A,B) PAs Livres das culturas embriogênicas em meio de cultura isento de outros fitorreguladores; (C,D) PAs Conjugadas nas culturas embriogênicas em meio de cultura suplementado com 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)). Os dados estão representados pela média e desvio padrão.....99

Figura 5. Efeito da adição de PAs e outros fitorreguladores ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo endógeno de PAs das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. (A)

PAs totais; (B)  $\text{Put}^*(\text{Spm}+\text{Spd})^{-1}$ . BM0 (meio de cultura isento de outros fitorreguladores); (BM2 meio de cultura suplementado com 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ )). Os dados estão representados pela média e desvio padrão.....101

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Figura 1. Resumo esquemático dos eventos morfogênicos e fisiológicos durante a embriogênese zigótica e somática de *A. angustifolia*. As setas e suas intensidades de coloração indicam flutuações dos teores endógenos de proteína, amido, AIA, ABA, Poliaminas (PAs), matéria fresca (MF) e matéria seca (MS); (→)Setas menores indicam a influência da poliamina específica para cada componentes endógeno; (-----) Não realizado.....108

Figura 2. Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática de *A.angustifolia*. A) Estabelece condições para a obtenção de ciclos repetitivos de divisão celular em meio de cultura BM suplementado ou não com 2,4- D ( $5\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $2\mu\text{M}$  cada); B) Estabelece condições para a progressão e maturação dos embriões somáticos em meio de cultura BM suplementado com PEG (7%), Maltose (9%) e ABA ( $150\mu\text{M}$ ). Adaptado de Durzan (1988) e Guerra *et al.*, (1999).....109

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- 2,4-D:** ácido 2,4-diclorofenóxiacético
- ABA:** ácido abscísico
- ACC:** ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
- AIA:** ácido indol -3- acético
- ANOVA:** análise de variância
- BAP:** 6-benzilaminopurina
- BM:** meio de cultura proposto por Gupta e Pullman, 1991
- CLAE:** cromatografia líquida de alta eficiência
- DAH :** 1,7-diaminoheptano
- GA:** ácido giberélico
- Kin:** cinetina
- LEA:** "Late embryogenesis abundant"
- MF:** matéria fresca
- MS:** matéria seca
- PAs:** poliaminas
- PCA:** ácido perclórico
- PEG:** polietileno glicol
- PMSF:** fluoreto de fenilmetilsulfonil
- Put:** putrescina
- SAM:** s-adenosilmetionina
- SDS:** dodecil sulfato de sódio
- Spd:** espermidina
- Spm:** espermina
- VCS:** volume celular sedimentado

## RESUMO

A embriogênese somática é uma técnica biotecnológica amplamente utilizada para propagação massal e conservação de genótipos superiores de diversas espécies de coníferas, como é o caso da *Araucaria angustifolia*. Além disso, esta técnica se configura como um modelo referência para estudos da biologia do desenvolvimento *in vitro*. A principal limitação da embriogênese somática em coníferas encontra-se associada a dificuldades durante a fase de maturação. No presente trabalho foram estudados aspectos da regulação fisiológica e bioquímica da embriogênese zigótica e somática de *A. angustifolia*, visando o estabelecimento de um protocolo *in vitro* para esta espécie. Foram estabelecidas as condições *in vitro* para a indução, multiplicação e obtenção de embriões somáticos cotiledonares, assim como determinados a variação de alguns componentes do metabolismo endógeno destas culturas em diferentes fases da embriogênese zigótica e somática. Embriões zigóticos pré-cotiledonares inoculados em meio de cultura BM suplementados com 2,4-D (5  $\mu\text{M}$ ), BAP e Kin (2  $\mu\text{M}$  cada), e maltose ou sacarose (3%) resultaram em uma taxa de indução de 66,7%. A indução, multiplicação e a morfologia das culturas embriogênicas foram significativamente influenciadas pela fonte de carbono. As culturas embriogênicas suplementadas com maltose apresentaram morfologia bipolar e também os maiores conteúdos de proteínas amido e ABA. O conteúdo de AIA durante a multiplicação foi incrementado pela presença de 2,4-D e sacarose no meio de cultura. Culturas embriogênicas mantidas em suspensões celulares em que o meio de cultura foi suplementado com sacarose e 2,4-D (5  $\mu\text{M}$ ), BAP e Kin (2  $\mu\text{M}$  cada) apresentaram um volume celular sedimentado de 50 mL após 42 dias de cultivo. A multiplicação das culturas embriogênicas em meio de cultura líquido foi observada tanto para suplementação com maltose ou sacarose. O conteúdo endógeno de poliaminas durante a multiplicação em meio líquido ou sólido foi correlacionado à multiplicação das culturas embriogênicas e os maiores valores foram observados em meio de cultura suplementados com sacarose e 2,4-D (5  $\mu\text{M}$ ), BAP e Kin (2  $\mu\text{M}$  cada). Embriões somáticos globulares e cotiledonares foram obtidos em meio de cultura BM suplementado com PEG (7%), maltose (9%) e ABA (150  $\mu\text{M}$ ) e este processo morfogenético foi associado a mudanças endógenas no conteúdo de AIA, ABA e proteínas. Contudo, os teores endógenos de proteínas e amido foram inferiores aqueles observados no embrião zigótico, o qual apresentou um acúmulo destas substâncias durante os estágios embriogênicos tardios. A suplementação exógena de poliaminas durante a multiplicação influenciou o metabolismo endógeno e a multiplicação das culturas embriogênicas. A Put foi relacionada à multiplicação das culturas embriogênicas, a Spd e a Spm promoveram o acúmulo de matéria seca e de substâncias de reserva. Foi possível identificar como alguns componentes do meio de cultura afetaram a morfogênese e alguns componentes do metabolismo endógeno das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. Os resultados aqui obtidos dão suporte a alternativas que permitirão o estabelecimento de um protocolo completo para embriogênese somática nesta espécie.

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a valuable biotechnological tool for the mass propagation and conservation of elite genotypes of several conifer species as is the case of *Araucaria angustifolia*. Moreover this technique comprises an efficient model reference for studies in *in vitro* development biology. The main limitations in conifer somatic embryogenesis are associated with some difficulties during the maturation phase. The present work aimed at to study aspects of the physiological and biochemical regulation of somatic and zygotic embryogenesis in *A. angustifolia* looking at the establishment of an *in vitro* protocol in this species. It was established the conditions for the induction, multiplication and development of cotyledonary somatic embryos and it was determined the changes in the components of the metabolism of embryogenetic cultures in different stages of somatic and zygotic embryogenesis. Pre-cotyledonary zygotic embryos inoculated in BM culture medium supplemented with 2,4- D (5  $\mu$ M), BAP e Kin (2  $\mu$ M each), and maltose or sucrose (3%) resulted in 66.7% embryogenic induction rate. The induction, multiplication and the morphology of embryogenic cultures were affected by the carbon source. Embryogenic cultures maintained in culture medium supplemented with com maltose showed bipolar morphology, as well as the highest concentration of protein, starch and ABA. The content of IAA during the multiplication phase was positively affected by the presence of 2,4-D and sucrose in the culture medium. The multiplication of embryogenic cultures was either observed in BM liquid culture medium supplemented with maltose or sucrose. Embryogenic cultures maintained in suspension in culture medium supplemented with sucrose and 2,4- D (5  $\mu$ M), BAP and Kin (2  $\mu$ M each) yielded a sedimented cell volume of 50 mL after 42 days in culture. The endogenous content of polyamines during the multiplication phase in gelled or liquid culture medium was correlated with the multiplication of embryogenic cultures, the highest values being observed in BM culture medium supplemented with sucrose and 2,4- D (5  $\mu$ M), BAP and Kin (2  $\mu$ M each). Globular and cotyledonary somatic embryos were obtained in BM culture medium supplemented with PEG (7%), Maltose (9%) and ABA (150  $\mu$ M) and this was associated with enhanced endogenous levels of IAA, ABA, and protein. However, these values were lower than those observed in zygotic embryos which showed accumulation of protein and starch in late embryogenic stages. The supplementation of exogenous polyamines to the culture medium during the multiplication phase affected the endogenous metabolism and the cell multiplication of the cultures. Put was associated to an enhanced multiplication of embryogenic cultures; Spd and Spm promoted the accumulation of dry mass and storage substances. It was possible to identify how some components of the culture medium affected the morphogenesis and the endogenous metabolism of *A. angustifolia* embryogenic cultures. The results here obtained give support to alternatives toward the establishment of a protocol for the somatic embryogenesis in this conifer species.

**INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES**

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze é uma conífera nativa do sul do Brasil que apresenta importância econômica (Mattos, 1994). 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. Recentemente esta espécie foi incluída como espécie vulnerável, na lista oficial das plantas brasileiras ameaçadas de extinção (Guerra *et al.*, 2002).

Técnicas biotecnológicas apresentam grande potencial de uso em programas de melhoramento genético e conservação. Estas técnicas permitem o desenvolvimento e a propagação massal de genótipos superiores, bem como o estabelecimento de bancos de germoplasma visando a manutenção da variabilidade genética das populações naturais (Guerra *et al.*, 2000; Park *et al.*, 1998; Phillips, 2004).

A embriogênese somática é a principal técnica de cultura *in vitro* empregada para a propagação de coníferas (Grossnickle & Sutton, 1999; Stasolla & Yeung, 2003). Esta técnica apresenta redução de custos e maior rendimento biológico, ou seja, maior números de propágulos, comparativamente as demais técnicas de micropropagação. Recentemente, foram estabelecidos avanços em protocolos de embriogênese somática para coníferas de interesse comercial, como *Pinus pinaster* (Ramarosandratana *et al.*, 2001) e *Pinus strobus* (Klimaszewska *et al.*, 2000), assim como para coníferas ameaçadas de extinção, como é o caso de *Cedrus libani* (Khuri *et al.*, 2000) e *Araucaria angustifolia* (Santos *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2004).

O emprego da embriogênese somática, além de permitir a propagação massal visando a conservação e o melhoramento genético das espécies, também pode ser utilizado como um modelo referência para estudos básicos da fisiologia do desenvolvimento. A embriogênese é uma rota de desenvolvimento complexa que inicia o ciclo de vida das plantas superiores e é um dos processos biológicos mais complexos e interessantes de serem estudados. Durante este processo, uma célula ou zigoto usa todo o seu potencial genético em divisões celulares

complexas e consecutivas que resultam no organismo pluricelular (von Arnold, 2002). O crescimento, a divisão e diferenciação celular, durante a embriogênese envolvem uma série de mudanças no metabolismo celular. Assim sendo, este processo representa um modelo biológico interessante para estudos fisiológicos como a organização, diferenciação celular e metabolismo vegetal.

Estudos básicos do metabolismo celular durante a embriogênese zigótica e somática de *A. angustifolia*, utilizando a reconstituição *in vitro* dos eventos fisiológicos e bioquímicos envolvidos permitem a elucidação de processos aplicados à propagação massal e a conservação desta espécie.

## 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 *Araucaria araucana* e *Araucaria angustifolia*, esta última também é 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 centímetros de diâmetro, os troncos são retos e quase cilíndricos (Carvalho, 1994), a casca é grossa e resinosa e a ramificação é racemosa apresentado 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 *A. angustifolia* ocorre naturalmente no Brasil e em pequenas manchas na Argentina e no Paraguai 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 km<sup>2</sup>. 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. Atualmente os remanescentes desta espécie estão estimados em 2% da área original (Guerra *et al.*, 2002).

### 1.2.2. Embriogênese zigótica em coníferas

A embriogênese zigótica em coníferas é caracterizada pela presença de poliembriões. A poliembria é um fenômeno comum nas coníferas, definida pela presença de mais de um embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento da semente, porém apenas um embrião permanece na semente madura. Existem dois tipos de poliembria, a poliembria polizigótica e a poliembria por clivagem. Em muitos gêneros de *Pinus* ocorrem os dois tipos de poliembria, onde primeiramente, por poliembria 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 poliembria por clivagem, onde se dividem por processo de clivagem em até oito pró-embriões. Em espécies do gênero *Araucaria* foi observada apenas a poliembria polizigótica (Gifford & Foster, 1989).

A embriogênese em coníferas pode ser dividida em duas fases: (1) fase pró-embriônica que vai desde a fertilização até o rompimento da arquegônia pelo proembrião e (2) fase embriônica: a partir do rompimento da arquegônia até a maturação do embrião (Haines & Prakash, 1980). Estudos morfológicos da fase pró-embriônica do desenvolvimento embriônico em *Araucaria sp* sugeriram que este gênero é um dos mais primitivos (Haines & Prakash, 1980). Estes autores assinalam (i) a fase de núcleo livre prolongada, (ii) a presença das células da capa e (iii) a ausência de clivagem do proembrião como as principais diferenças encontradas no desenvolvimento do pró-embrião nas espécies de *Araucaria*, se comparado com outras coníferas consideradas evolutivamente superiores, tais como Cupressaceae, Pinaceae e Taxodiaceae (Haines & Prakash, 1980).

### 1.2.3. Embriogênese somática em coníferas

A embriogênese somática é um processo pelo qual, células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas (Williams & Maheswaran, 1986).

Comparativamente às demais técnicas de micropropagação, a embriogênese somática apresenta uma série de vantagens: a) permite a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); b) o sistema permite um alto grau de automatização, reduzindo assim os custos por unidade produzida; c) os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e pureza genética; d) pode ser utilizada como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento florestal (Högberg *et al.*, 1998; Guerra *et al.*, 2000).

A embriogênese somática é composta de cinco etapas (von Arnold 2002): 1) iniciação de culturas embriogênicas em meios de cultura 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.

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 (Attree & Fowke, 1993). Um aspecto importante a ser mencionado refere-se à possibilidade do emprego da técnica de criopreservação como fator da viabilidade da integração da embriogênese somática em programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma (Park *et al.*, 1998).

Durante o estágio de maturação os embriões somáticos sofrem várias mudanças morfológicas e bioquímicas (von Arnold *et al.*, 2002). 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 é caracterizado pelo longo sistema de suspensor, elevando um ápice embrionário denso, proeminente e com coloração creme; 3) o embrião somático possui pequenos cotilédones emergentes; 4) plântula verde com cotilédones alongados com hipocótilo e radícula desenvolvidos.

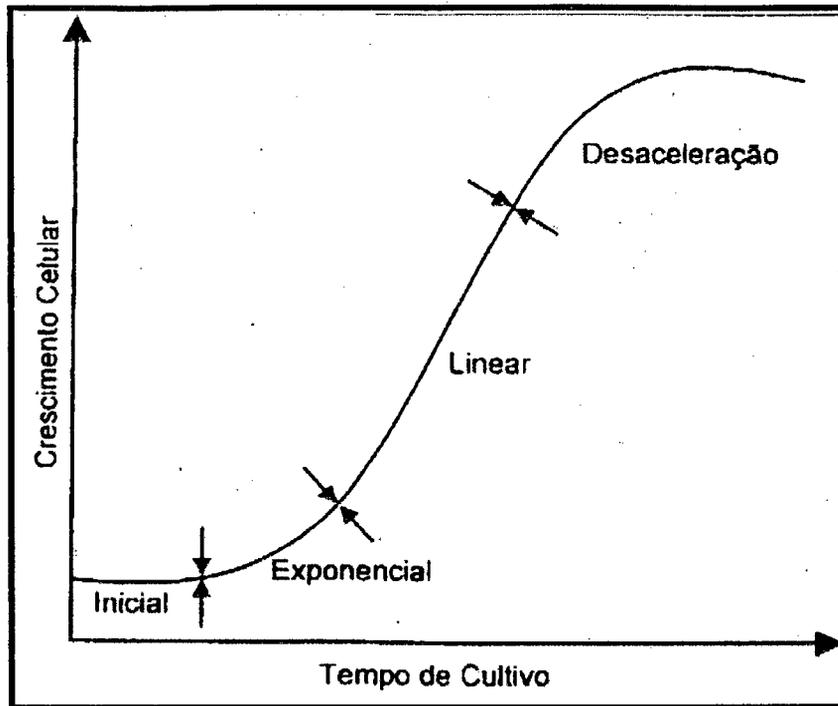
Durante a última década foram observados muitos avanços no conhecimento da embriogênese somática em coníferas (Jain *et al.*, 1995). Entretanto, a maturação de embriões somáticos e a regeneração de plantas ainda são problemas para muitas espécies. Em *A. angustifolia* foram estabelecidas as condições básicas para a indução de culturas embriogênicas a partir de embriões zigóticos imaturos, mas as fases finais do desenvolvimento dos embriões somáticos não foram alcançadas (Astarita & Guerra, 1998; Guerra *et al.*, 2000, Santos *et al.*, 2002).

#### **1.2.4. Suspensões celulares**

As suspensões celulares consistem de células livres e ou aglomerados celulares crescendo em um meio de cultura líquido sob agitação contínua (Szabados *et al.*, 1993). Suspensões celulares mantidas em biorreatores, agitadores rotatórios ou agitadores convencionais tem sido rotineiramente empregadas para a multiplicação e manutenção de culturas embriogênicas de coníferas (Tautorus *et al.*, 1991).

As suspensões celulares, cultivadas em meios de cultura definidos e condições ambientais controladas, representam um interessante sistema para estudos fisiológicos e bioquímicos *in vitro*. Outra vantagem é o baixo grau de diferenciação celular que geralmente não está presente na maioria dos tecidos e órgãos (Szabados *et al.*, 1993).

Suspensões celulares normalmente exibem um padrão de crescimento celular descrito por uma curva sigmóide (Krogstrup, 1990), apresentando uma fase de desenvolvimento inicial, seguida pelas fases exponencial linear e estacionária de crescimento (Figura 1). A fase inicial de desenvolvimento é caracterizada por um período de adaptação, durante o qual as células assimilam nutrientes disponíveis no meio de cultura, utilizando-os para sustentar uma intensa atividade de biossíntese celular. Esta atividade declina com o início da fase exponencial, a qual é caracterizada por um período de intensa divisão celular. Na fase linear, a taxa de crescimento celular declina uniformemente com o tempo, até alcançar a fase estacionária, onde já ocorreu o aumento máximo no número de células (Grey *et al.*, 1987; George, 1993). Vários parâmetros podem ser utilizados para avaliar o crescimento nas suspensões celulares, entre eles, volume celular, índice mitótico, peso fresco e peso seco (Lulsdorf *et al.*, 1992).



**Figura 1.** Curva de crescimento celular típica, na qual se relaciona o número de células nas diferentes fases (inicial, exponencial, linear, de desaceleração e estacionária) com o tempo de cultivo (Adaptado de Szabados *et al.*, 1993).

As plantas são organismos autotróficos, com um sistema radicular altamente especializado na absorção de nutrientes; ao contrário disto, às suspensões celulares são geralmente sistemas heterotróficos, onde o crescimento e o metabolismo dependem da disponibilidade de nutrientes e de fitorreguladores presentes no meio de cultura. Considerando que a disponibilidade de nutrientes durante o cultivo pode modificar a fisiologia das células, é importante conhecer os mecanismos que regulam a absorção dos mesmos. Por outro lado, as trocas de nutrientes entre os compartimentos da célula são alteradas durante o ciclo de cultivo (Szabados *et al.*, 1993).

Em muitos experimentos para várias espécies vegetais, entre elas coníferas, têm sido utilizadas suspensões celulares para estudos relacionados com o metabolismo de aminoácidos (Bonner *et al.*, 1997), de purinas (Ashihara *et al.*, 2001) de fitorreguladores (Jiménez, 2001) e igualmente para trabalhos com poliaminas (Kevers *et al.*, 2000). Porém, as informações

disponíveis sobre o metabolismo celular de culturas embriogênicas em coníferas são ainda limitadas.

### 1.2.5. Parâmetros do metabolismo associado a embriogênese zigótica e somática

#### 1.2.5.1. Poliaminas

As poliaminas são aminas alifáticas com carga positiva em pH neutro que têm importância fundamental na proliferação e diferenciação celular. Os perfis de poliaminas podem ser utilizados como marcadores das alterações metabólicas ocorridas durante a maturação das culturas embriogênicas (Bouchereau *et al.*, 1999). As principais poliaminas em plantas superiores são a putrescina (Put), a espermina (Spm) e a espermidina (Spd), que atuam em rotas essenciais do desenvolvimento embrionário, embora seus mecanismos de ação ainda não tenham sido elucidados (Minocha *et al.*, 1994). As poliaminas atuam em vários processos celulares importantes, como a divisão celular, síntese protéica, replicação do DNA e em resposta das plantas ao estresse hídrico (Bouchereau *et al.*, 1999). Segundo Bouchereau *et al.* (1999) é possível que as poliaminas realizem muitas de suas funções através de ligações com várias macromoléculas.

Um dos papéis das poliaminas *in vitro* se relaciona com a divisão celular e a morfogênese (Kong *et al.*, 1998). As poliaminas podem agir de diferentes formas nas culturas *in vitro*, promovendo ou inibindo a formação de gemas, alongamento celular, aumento da massa de calos e enraizamento de plântulas (Scholten, 1998). Em *Pinus strobus*, o aumento de Spd após a fertilização sugere que as poliaminas estão envolvidas no desenvolvimento dos óvulos e embriões (Feirer *et al.*, 1995). Altos teores de poliaminas foram quantificados em tecidos embriogênicos de *Picea glauca* (Amarasinghe & Carlom, 1996). Mudanças endógenas de poliaminas também foram analisadas durante a embriogênese somática de *Picea glauca* x *P. englemannii* (Amarasinghe *et al.*, 1996). Em *A. angustifolia* o conteúdo de poliaminas variou durante a embriogênese zigótica,

nas fases iniciais observou-se altos teores de Put e Spd, enquanto que, nos estádios tardios da embriogênese a Spm foi a poliamina mais abundante (Astarita *et al.*, 2004b). Estes resultados sugerem que as poliaminas podem estar envolvidas no desenvolvimento de embriões somáticos de coníferas.

### 1.2.5.2. Ácido abscísico (ABA) e ácido indol-3-acético (AIA)

O desenvolvimento vegetal representa o resultado de um complexo controle espacial e temporal, onde vários hormônios atuam na regulação da expressão de múltiplos genes (Dodeman *et al.*, 1997). A maturação das diversas espécies de coníferas em geral é estimulada pela presença de ABA (Stasolla & Yeung, 2003). A ação do ABA é atribuída à inibição da clivagem poliembriônica, permitindo o desenvolvimento do embrião e o acúmulo de substâncias de reserva (Gupta *et al.*, 1993; Dodeman *et al.*, 1997). Contudo, em *A. angustifolia* não foram observados efeitos positivos para a maturação de embriões somáticos (Guerra *et al.*, 2000).

O decréscimo no conteúdo de água é um evento natural que ocorre durante os estágios tardios de desenvolvimento das sementes e representa uma importante etapa antes de iniciar o processo de germinação (Stasolla & Yeung, 2003). O ABA e estresses osmóticos estão envolvidos neste processo durante o desenvolvimento e germinação dos embriões zigóticos (Klimaszewska *et al.*, 1997). Em *A. angustifolia* poucas são as informações sobre o conteúdo endógeno do ABA durante a embriogênese zigótica e somática. Diversas alterações no metabolismo do nitrogênio seguido pela deposição de substâncias de reserva e síntese de poliaminas podem ocorrer em resposta ao tratamento com ABA (Stasolla & Yeung, 2003). Contudo, aparentemente, a suplementação de ABA ao meio de cultura é necessária para o desenvolvimento dos embriões somáticos, porém parece não ser suficiente para o completo processo de maturação (von Arnold *et al.*, 2002).

As auxinas exercem uma forte influência nos processos de expansão, divisão celular, na definição de órgãos e promoção da diferenciação do sistema vascular (Liu *et al.*, 1993). A auxina

mais largamente encontrada é o AIA que ocorre nos tecidos vegetais na forma livre (ativa), ou conjugada. A manutenção das auxinas no estado conjugado representa o melhor mecanismo para armazenamento nas células, controlando os níveis de auxina livre através da metabolização do excesso presente. A auxina no estado conjugado está protegida contra os processos de oxidação, podendo ser enzimaticamente liberada quando necessário (Gaspar *et al.*, 1996; Normanly, 1997).

Na embriogênese zigótica as auxinas são importantes para o desenvolvimento do embrião, especialmente na regulação do padrão de formação embrionico (Fischer-Iglesias & Nauhaus, 2001). Durante a embriogênese somática as auxinas podem ser um fator determinante na histodiferenciação dos embriões especialmente durante a formação dos meristemas, melhorando a qualidade dos embriões somáticos formados (Bozhkov *et al.*, 2002). Nas fases tardias da embriogênese observa-se a diminuição dos níveis de ácido giberélico (GA) e do ácido indol-3-acético (AIA), concomitantemente com o progressivo aumento do ABA na semente, alcançando os valores máximos de concentração (Chiwocha & von Aderkas, 2002).

### 1.2.5.3. Proteínas e compostos de reserva

Dentre os aspectos bioquímicos relacionados com a poliembriogênese zigótica e somática em coníferas, atenção especial tem sido direcionada ao estudo do acúmulo e mobilização de proteínas e substâncias de reserva nas sementes (Hakman, 1993). As principais substâncias de reserva depositadas no megagametófito, durante a formação das sementes das coníferas, são as proteínas, carboidratos e lipídios (Bewley & Black, 1994). A síntese das proteínas de reserva pode ser estimulada pelo uso de ABA exógeno durante as fases finais da embriogênese somática em coníferas (Tautorius *et al.*, 1991). O ABA está envolvido na expressão dos genes *lea* que codificam as proteínas LEA "late embryogenesis abundant", que são um grupo de proteínas sintetizadas na semente após a histodiferenciação do embrião (Bewley & Black, 1994).

As proteínas nas sementes podem ser subdivididas em categorias, denominadas de proteínas de reserva, as quais compõem a maior parte das proteínas e que servem como fonte de

aminoácidos para uso durante a germinação e crescimento da planta (Higgins, 1984; Shewry *et al.*, 1995); proteínas estruturais, essenciais para o metabolismo celular normal (Higgins, 1984) e proteínas enzimáticas. Proteínas de reserva são consideradas marcadores do processo de maturação em embriões zigóticos de gimnospermas e angiospermas (Dunstan *et al.*, 1998). Nas coníferas, tanto embriões somáticos como embriões zigóticos acumulam proteínas de reserva em abundância, durante a fase de maturação dos embriões (Hakman *et al.*, 1990).

Estudos referentes ao controle do processo de maturação, tanto em sementes como em embriões somáticos, requerem um melhor entendimento das mudanças estruturais nos tecidos ativos na acumulação de substâncias de reserva, bem como o conhecimento das proteínas de reserva presentes na semente (Hakman, 1993).

A identificação de proteínas específicas das fases do desenvolvimento da embriogênese zigótica, com a finalidade de compreender e monitorar os eventos da embriogênese somática torna possível a identificação de proteínas marcadoras para situações específicas, tais como a diferenciação celular e respostas celulares a estímulos externos diversos (Wilkins *et al.*, 1997).

### 1.3. OBJETIVOS

#### 1.3.1. Objetivo geral

Estudar aspectos da regulação bioquímica e fisiológica da embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia*, visando o estabelecimento de um protocolo *in vitro* para propagação massal de genótipos superiores e para o estabelecimento de bancos de germoplasma.

#### 1.3.2. Objetivos específicos

- a) Estudar o efeito da fonte de carbono (maltose e sacarose) e fitorreguladores (2,4-D, BAP e Kin) na frequência de indução, no conteúdo endógeno de AIA, ABA, proteínas, amido e polímeros e

na morfologia das culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, buscando relacioná-los com a capacidade embriogênica;

- b) Estudar a influência da fonte de carbono (maltose e sacarose) e fitorreguladores (2,4-D, BAP e Kin) na multiplicação celular e conteúdo endógeno de proteína, amido e poliaminas durante a dinâmica de crescimento das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* em suspensões celulares;
- c) Avaliar o efeito da adição de ABA, PEG e fontes de carbono (maltose e sacarose) na formação dos embriões somáticos durante a maturação, assim como no conteúdo endógeno de AIA, ABA, proteína e amido destas culturas buscando uma análise comparativa do desenvolvimento do embrião zigótico, visando estabelecer a relação de similaridade entre os dois processos;
- d) Avaliar o efeito da suplementação exógena de poliaminas (Put, Spd e Spm) na multiplicação e conteúdo endógeno de proteínas, amido, AIA e ABA das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

Os resultados referentes a cada objetivo específico estão dispostos na forma de capítulos, os quais tem sua introdução reduzida. A introdução foi apresentada em um capítulo único, assim como as conclusões e perspectivas.

**CAPITULO I\***

**INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS**

**DE *Araucaria angustifolia***

\* Parte deste capítulo foi aceito para publicação no periódico "Brazilian Archives of Biology and Technology".

## 2.1. INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é um sistema ideal para investigar o processo de diferenciação em plantas, bem como a expressão dos mecanismos de totipotência da célula vegetal, expressos por Haberlandt em 1902. Este processo permite o estudo da competência celular que é definida como o potencial de reprogramação de uma célula em resposta a sinais específicos, por meio de processos de desdiferenciação e rediferenciação. A integração entre crescimento (divisão) e diferenciação (especialização) celular dá início à morfogênese e a embriogênese somática compreende uma seqüência de etapas incluindo a indução, multiplicação, maturação, germinação e finalmente a aclimatização *ex vitro* (Bozhkov *et al.*, 2002). A indução pode ser alcançada ao submeter um tecido gamético ou somático a condições específicas de cultura (Guerra *et al.*, 2000). A frequência de indução de culturas embriogênicas em coníferas é afetada por vários fatores, genótipo, estágio de desenvolvimento do explante, fonte de carboidratos (sacarose, maltose e lactose), composição e níveis de nitrogênio e fitorreguladores (Li *et al.*, 1998; Zoglauer *et al.*, 2002).

As coníferas apresentam poliembriogênese zigótica restrita aos primeiros estágios de desenvolvimento do embrião. Este mecanismo adaptativo e evolucionário pode ocorrer em resposta à fertilização de vários óvulos ou pela clivagem de um embrião resultando em múltiplos embriões geneticamente idênticos (Gifford & Foster, 1989). A reconstituição dos poliembriões *in vitro* pode ocorrer por meio da poliembriogênese somática (Gupta & Grob, 1995).

Para muitas espécies de coníferas incluindo *A. angustifolia*, o mecanismo que regula a formação do embrião não foi totalmente esclarecido. Os eventos iniciais da embriogênese são os mais críticos para a formação da planta, junto com a diferenciação da região apical e basal (morfogênese), na qual é estabelecida a polaridade, tecidos meristemáticos primários e a camada protodérmica são diferenciados (histogênese) (Bozhkov *et al.*, 2002). O estudo dos eventos morfogênicos *in vitro* é essencial para a elucidação dos pontos de controle associados à indução e controle da embriogênese somática em plantas.

No presente trabalho foram investigados aspectos associados à indução, multiplicação e morfogênese das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, com ênfase no efeito da fonte de carbono e fitorreguladores suplementados ao meio de cultura.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho todas as etapas de multiplicação celular, análise microscópica e determinação de proteínas e amido foram desenvolvidas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina. As análises bioquímicas de poliaminas, ABA e AIA foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

### 2.2.1. Material vegetal

Foram utilizados cones femininos imaturos de *A. angustifolia* provenientes de coletas realizadas no período 2002/2003, em plantas de polinização aberta, pertencentes a uma população natural no município de Bom Retiro - SC. As pinhas foram debulhadas individualmente e os pinhões foram submetidos à assepsia, realizada em câmara de fluxo laminar, sendo submersos em etanol 70% por dois minutos, e após em uma solução de hipoclorito de sódio 2%. Finalmente foram realizadas três lavagens com água destilada e autoclavada. Os embriões zigóticos imaturos foram excisados com o auxílio de pinças e bisturis sob estereomicroscópio.

### 2.2.2. Indução das culturas embriogênicas

O estágio de desenvolvimento do embrião zigótico utilizado como explante nas diferentes coletas foi avaliado por meio da coloração com carmim acético (1%) e azul de Evans (0.5%) de acordo com (Durzan, 1988). Em todos os experimentos foi utilizado o meio de cultura BM (Gupta e Pulman, 1991) suplementado com L-glutamina ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e caseína hidrolisada ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Os tratamentos de indução variaram na suplementação de fitorreguladores 2,4-D ( $5 \mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $2 \mu\text{M}$  cada) e fontes de carbono, sacarose (3%) ou maltose (3%) (Tabela 1). 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<sup>-1</sup>). 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 ± 2°C.

**Tabela 1.** Tratamentos utilizados no experimento de indução de *A. angustifolia*.

Formulação Salina BM (Gupta & Pullman, 1991)					
Denominação do Tratamento	Fonte de carbono (p/v)		Fitorreguladores		
	Maltose (3%)	Sacarose (3%)	2,4-D (5µM)	BAP (2µM)	KIN (2µM)
M2	X	-	X	X	X
S2	-	X	X	X	X
M0	X	-	-	-	-
S0	-	X	-	-	-

(x) = presença; (-) = ausência

### 2.2.3. Multiplicação das culturas embriogênicas

Após 30 dias, as culturas embriogênicas induzidas foram individualizadas do explante e subcultivadas para o mesmo meio de cultura utilizado na indução com redução de fitorreguladores para metade da concentração inicial. Foram realizados subcultivos em intervalos de 20 dias e após o terceiro subcultivo a cultura foi considerada estabilizada. A qualidade das culturas embriogênicas foi avaliada por meio da análise citoquímica com auxílio de microscópio OLYMPUS BX 40 baseado na coloração com carmin acético e azul de Evans (Durzan, 1988).

### 2.2.4. Extração e dosagem de amido

A extração do amido foi realizada através do método de McCready *et al.*, (1950). Os resíduos das amostras utilizadas para a extração de proteínas totais foram macerados com 2 mL

de ácido perclórico 30% e centrifugados a 2000 rpm, por 10 minutos. Foi realizada a segunda extração com 2 mL de ácido perclórico 30% e, após a centrifugação, os dois sobrenadantes foram unidos. A dosagem foi realizada pelo método de Umbreit & Burris (1964), utilizando-se a antrona (0,2%). Em seguida, as soluções foram agitadas e aquecidas em água fervente por 3 minutos. Após esfriar, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 620 nm. Os cálculos dos níveis de amido foram obtidos a partir da curva padrão, preparada com concentrações de 0 a 100 µg/mL de glucose, diluídas em ácido perclórico 30%.

### **2.2.5. Extração e dosagem de proteínas totais**

Amostras de 300mg de matéria fresca (MF) foram maceradas à temperatura de 4°C, com tampão de extração composto de 50 mM de fosfato de sódio dibásico (pH 7,0), 1,5% de β-mercapetanol (v/v), 0,5% de SDS (dodecil sulfato de sódio) (p/v) e 1 mM de PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil). Após, as amostras maceradas foram centrifugadas a 8000 rpm, por 20 minutos, a 0°C. O sobrenadante e o precipitado foram separados, sendo o último novamente armazenado a -20°C para posterior utilização. As proteínas totais, presentes no sobrenadante, foram precipitadas com a presença de dois volumes de álcool etílico absoluto, no mínimo, para cada volume de sobrenadante e, em seguida, as amostras foram armazenadas a 4°C, por 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm, por 20 minutos, a 0°C. O sobrenadante foi descartado e as proteínas totais, precipitadas, foram ressuspensas em solução de 50 mM de fosfato de sódio dibásico (pH7,0). Os teores de proteínas totais foram determinados pelo método de Bradford (1976) com as modificações de Read & Northcote (1981), e com a utilização de albumina de soro bovino como padrão.

### 2.2.6. Determinação de poliaminas

As poliaminas livres e conjugadas foram extraídas conforme a metodologia descrita por Minocha *et al.*, (1994) e Bajaj & Rajam (1995). As amostras foram maceradas com 1,5 mL de ácido perclórico (PCA) 5%. O material macerado foi mantido em gelo por 1 hora, sendo posteriormente centrifugado a 20.000 g, por 20 min, a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado com 1,5 mL de PCA 5%, e após centrifugação, os dois sobrenadantes foram homogeneizados. A fração sobrenadante contém as poliaminas livres e conjugadas solúveis em PCA 5%. O precipitado contendo as poliaminas insolúveis foi descartado. Aliquotas de 200 µL de sobrenadante em PCA foram misturadas em igual volume de HCl 12 N e hidrolisadas por 16 horas, a 110 °C, em tubos eppendorf. Após este período de tempo, as amostras foram secas a 40 °C sob jato de nitrogênio, e ressuspensionadas em 200 µL de PCA 5% (Tiburcio *et al.*, 1985). O material contendo as poliaminas livres e conjugadas solúveis em PCA foi armazenado para posterior derivatização, segundo a metodologia de Baraldi *et al.*, (1995). Para a derivatização, amostras de 40 µL das poliaminas livres e conjugadas foram dansiladas, usando-se 20 µL de diaminoheptano (0,05 mM), 100 µL de uma solução de cloreto de dansil (5 mg.mL<sup>-1</sup> em acetona ; 1,8 mM) e 50 µL de uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, sendo incubadas no escuro por 50 minutos, a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 µL de prolina (100 mg.mL<sup>-1</sup>) na amostra, a temperatura ambiente e por 30 minutos no escuro. Posteriormente, as poliaminas foram extraídas com 200 µL de tolueno. Foram coletados 175 µL da fase orgânica e secados em jato de nitrogênio, a 40 °C. Em seguida, a amostra foi ressuspensionada em 175 µL de acetonitrila para posterior quantificação. As poliaminas foram identificadas e quantificadas por CLAE, utilizando-se uma coluna C18, fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Foram utilizados como fases móveis a acetonitrila 100% e uma solução de água-acetonitrila 10%, com pH 3,5, ajustado com HCl 1 N. O gradiente foi ajustado para 65% – 67% (0,01–10 min), 67% - 70% (11–13 min) e 70% - 100% (13–20,5 min), com um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 340 nm e emissão de 510 nm. Foram injetados 20 µL

da solução de poliaminas, conforme descrito anteriormente. As áreas dos picos e os tempos de retenção de cada poliamina foram identificados comparando-se com as poliaminas padrões com concentrações conhecidas: putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm).

### 2.2.7. Determinação de AIA e ABA

Os níveis de AIA e ABA foram determinados de acordo com Kojima (1996), com modificações (Silveira et al., 2004a). As amostras foram maceradas em 5 mL de tampão de extração (etanol 80% + 1% de polivinilpirrolidona-40), sendo o extrato transferido para um tubo tipo "Falcon" (15 mL). Foram adicionados 100  $\mu$ L de [ $^3$ H] AIA radioativo e 100  $\mu$ L de [ $^3$ H] ABA como padrão interno, para a determinação das perdas do processo. O extrato foi agitado por 1:30 h, no escuro a 4°C. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 15,500, g por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi concentrado em centrifuga sob vácuo a 45 °C ( $\pm$  3:00 h), até atingir 20% do volume inicial ( $\leq$  1,0 mL). O volume da amostra foi ajustado para 3 mL (p/v) com água, e o pH foi ajustado para 2,5 com a adição de HCl (1N). As amostras foram particionadas duas vezes, usando-se éter etílico como solvente orgânico. A fase orgânica (éter), contendo o AIA e o ABA, foi coletada e seca em centrifuga sob vácuo a 45 °C. Em seguida, as amostras foram ressuspendidas em 300  $\mu$ L de metanol 100% e transferidas para tubos do tipo "eppendorf" e armazenadas a -20° C para análises posteriores em CLAE.

A quantificação do AIA e ABA foi realizada por CLAE em fase reversa, com coluna C18 (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Foram utilizados como fases móveis metanol 100% e uma solução de água-metanol 10% e ácido acético 0,5%. A mudança na proporção de metanol 100% em relação ao outro solvente, definiu o gradiente de corrida, sendo o gradiente de metanol 100% ajustado para 20% durante os primeiros 15 min, de 20% a 45% entre 15 e 22 min, de 45% a 54% entre 22 e 33 min, e de 54% a 100%, entre 33 e 34 min e 100% entre 34 e 50 min, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, a 40 °C. Para a detecção do AIA, o detector de fluorescência foi ajustado para excitação

em 280 nm e emissão em 350 nm e para a detecção do ABA, o detector de UV foi ajustado em 254 nm. Foram injetados 40 µL da amostra. Frações contendo AIA e ABA foram coletadas e analisadas por cintilação líquida (Packard® Tri-carb 2100 TR) para a estimativa de perdas. As áreas e tempos de retenção do AIA e do ABA foram avaliadas por comparação com concentrações conhecidas destes hormônios.

#### **2.2.8. Determinação da matéria seca**

Três amostras (200 mg de MF) de culturas embriogênicas de cada tratamento de multiplicação foram mantidas a 70 °C durante 72 horas para obtenção da matéria seca (MS). Os dados de MS foram expressos em porcentagem da MF inicial utilizando a equação  $MS\% = (MS/MF) * 100$ .

#### **2.2.9. Estratégia experimental e análise estatística**

Todos os experimentos foram conduzidos em blocos completamente casualizados. Todos os tratamentos foram representados em triplicata e os dados obtidos submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, ao teste de separação de médias SNK (SOKAL e ROHLF, 1995) com auxílio do programa Statgraphics® 7.0.

### **2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **2.3.1. Indução e multiplicação das culturas embriogênicas**

No presente estudo, a correlação entre a data de coleta e o estágio de desenvolvimento do embrião (Figura 1) foi difícil de ser estabelecida. Para uma mesma data de coleta, os embriões

utilizados como explantes e provenientes de três genótipos apresentavam diferentes estágios de desenvolvimento, i.e. enquanto proembriões eram encontrados no genótipo A, embriões no estágio globular e torpedo estavam presentes no genótipo C e B, respectivamente (Tabela 2). A diferença nos estágios 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 com eventos reprodutivos que apresentam uma amplitude os quais resultam nos diferentes estágios de desenvolvimento (Reitz, 1966).

Os diferentes estágios de desenvolvimento dos embriões foram diretamente correlacionados com a média de indução a embriogênese somática (Tabela 3). Em coníferas, a frequência de indução *in vitro* pode estar associada a diversos fatores incluindo meio de cultura, fonte de explante, genótipo e fitorreguladores (Zoglauer, 2002; Stasolla & Yeung, 2003).

**Tabela 2.** Estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos de *A. angustifolia* provenientes de três genótipos diferentes em três datas de coleta.

Genótipo	Data de coleta		
	15/12/02	04/01/03	26/01/03
A	Pró-embrião	Globular	Torpedo
B	Torpedo	Pré-cotiledonar	Cotiledonar
C	Globular	Torpedo	Pré-cotiledonar

A indução a embriogênese somática em *A. angustifolia* foi observada 30 dias após o início do cultivo. Este processo foi caracterizado pela extrusão de um grupo de células friáveis e translúcidas originadas a partir do ápice meristemático do embrião zigótico apresentando subsequente proliferação celular (Figura 1f). A competência embriogênica foi influenciada pelo estágio de desenvolvimento do explante (Tabela 3) e altas médias de indução (66,7%) foram observadas em embriões em estágio de desenvolvimento pré-cotiledonar. Pro-embriões e embriões globulares apresentaram média de indução de 13,3% e 31,3%, respectivamente. Embriões zigóticos em estágio de desenvolvimento cotiledonar apresentaram baixas taxas médias de indução e estas culturas não apresentavam competência embriogênica (Dados não apresentados). As médias de indução observadas no presente trabalho podem ser consideradas

altas comparativamente aquelas observadas em outras espécies de coníferas como *Pinus taeda*, onde a taxa média observada foi de 17,9% (Pullman *et al.*, 2003).

Os dados obtidos neste trabalho confirmam prévios resultados com *A. angustifolia* (Guerra *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002, Silveira *et al.*, 2002) nos quais o embrião em estágio de desenvolvimento pré-cotiledonar apresentou a melhor competência para indução embriogênica, contudo, não diferindo estatisticamente do estágio de desenvolvimento torpedo. Estes autores concluíram que a competência para indução das culturas embriogênicas é perdida após o desenvolvimento dos cotilédones. O requerimento restrito de explantes juvenis, freqüentemente de origem embriônica, indica que é difícil o redirecionamento do programa de desenvolvimento em coníferas para obtenção de culturas *in vitro* (Stasolla *et al.*, 2003).

O mecanismo de indução das culturas embriogênicas não está totalmente compreendido. De acordo com Zoglauer (2002), durante a fase de indução, a célula cessa seu programa de especialização e inicia um novo programa de desenvolvimento. O programa de especialização é negativamente afetado pela metilação do DNA na qual as auxinas desempenham um papel fundamental (LoSchiavo *et al.*, 1989).

**Tabela 3.** Taxa de indução das culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* a partir de embriões zigóticos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Estágio de desenvolvimento	Nº de dados	Média de Indução (%) <sup>1</sup>
Pró-embrião	180	13,3 c
Globular	360	31,3 b
Torpedo	540	52,8 a
Pré-cotiledonar	360	66,7 a
Média		41,09
C.V. (%) <sup>2</sup>		32,9

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $p < 0,05$ ). <sup>2</sup>Dados transformados para  $\log(x+2)$ .

A fonte de carbono e os fitorreguladores suplementados ao meio de cultura influenciaram significativamente as taxas de indução das culturas embriogênicas (Tabela 4 e 5). A sacarose

(56,6%) foi superior a maltose (35,4%) (Tabela 4). O meio de cultura suplementado com sacarose também apresentou uma alta proliferação celular (Figura 1g), especialmente quando combinado com 2,4-D (5 $\mu$ M), BAP e Kin (2 $\mu$ M cada). Contudo, a suplementação do meio de cultura com maltose (3%) mais 2,4-D (5 $\mu$ M), BAP e Kin (2 $\mu$ M cada) resultou em uma redução da proliferação celular, porém favorecendo o desenvolvimento de pro-embriões somáticos com morfologia bipolar e que apresentavam suas células reativas ao carmim acético (Figura 1d). Pró-embriões desenvolvidos em meio de cultura suplementado com sacarose eram menos organizados demonstrando distúrbio de polaridade e a morfologia difusa (Figura 1c). Padrões similares de desenvolvimento foram observados em culturas embriogênicas de *Picea abies* (Filonova *et al.*, 2000). Em *Hevea brasiliensis*, o efeito da maltose na morfologia e histodiferenciação das culturas embriogênicas pode ser atribuído ao baixo suprimento de hexoses (Blanc, 2002). Isto sugere que a hidrólise lenta da maltose é o sinal bioquímico que conduz a célula à formação de embriões somáticos. Ao contrário, a rápida hidrólise da sacarose pode incrementar o conteúdo de hexoses e compostos de reserva direcionando a célula para uma rápida proliferação celular, a qual é consistente com os resultados observados no presente trabalho. Nas culturas embriogênicas de *A. angustifolia* a suplementação do meio de cultura com sacarose foi um evento associado com alta taxa de multiplicação e pro-embriões desorganizados, enquanto a maltose é um possível fator para iniciar o desenvolvimento organizado das culturas embriogênicas.

**Tabela 4.** Efeito da fonte de carbono na taxa de indução de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

Fonte de carbono (p/v)	Nº de dados	Média de Indução (%) <sup>1</sup>
Sacarose 3%	720	56,6 a
Maltose 3%	720	35,4 b
Média		46,0
C.V. (%) <sup>2</sup>		33,4

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $p < 0,05$ ) <sup>2</sup> Dados transformados para  $\log(x+2)$ .

**Tabela 5.** Taxa média de indução de culturas embriogênicas em *A. angustifolia* em resposta a diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores.

Fitorreguladores ( $\mu\text{M}$ )	Número de Explantes	Média de Indução (%) <sup>1</sup>
	480	30,02b
2,4-D (5) + BAP (2) e Kin (2)	960	48,64a
Média		39,33
C.V. (%) <sup>2</sup>		18,90

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $p < 0,05$ ). <sup>2</sup> Dados transformados para  $\log(x+2)$ .

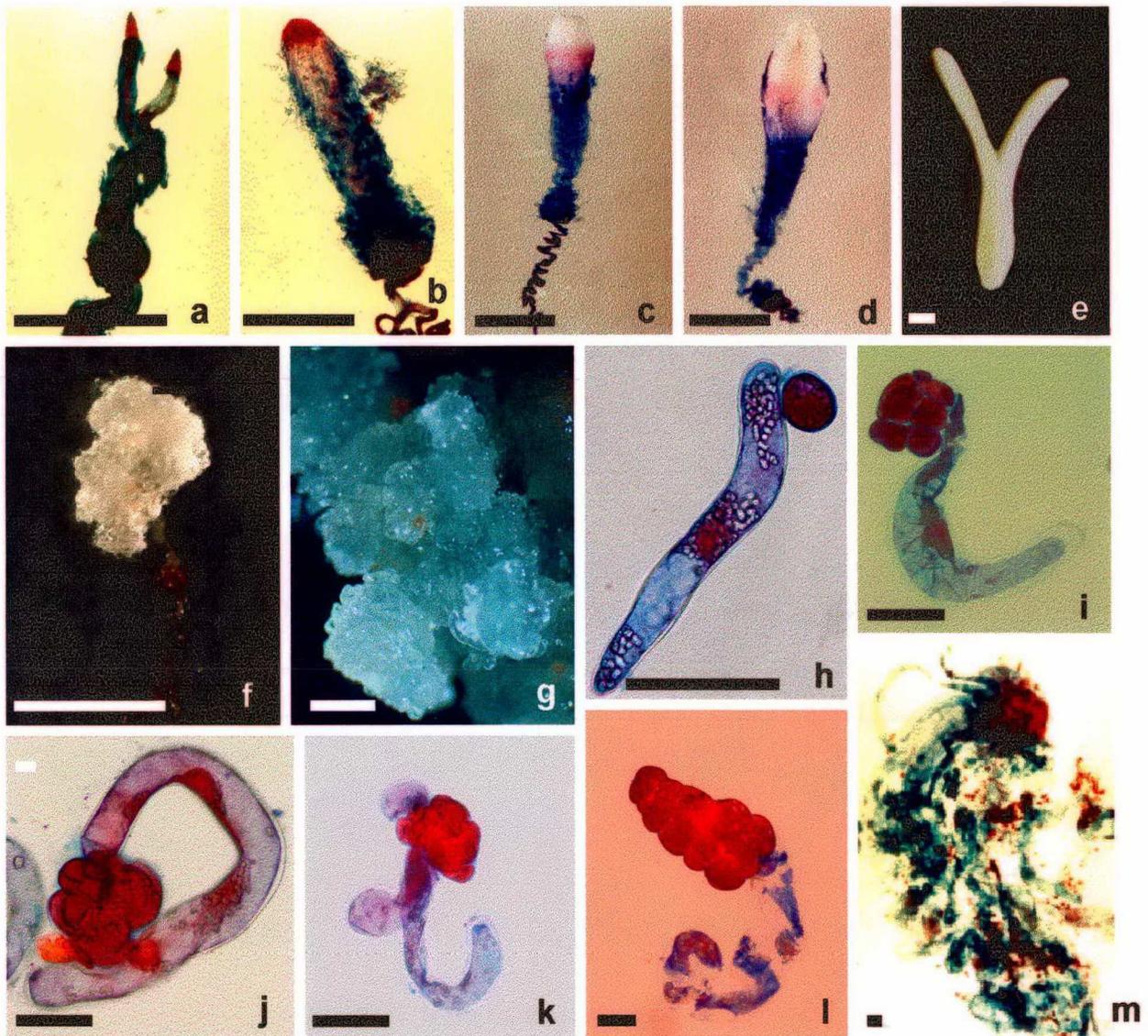
### 2.3.2. Morfologia celular e competência embriogênica

Foram observados dois principais tipos celulares nas culturas embriogênicas de *A. angustifolia*: Células alongadas, as quais eram altamente vacuoladas; e células isodiamétricas, que eram pequenas e com citoplasma denso (Figura 2). Estas células apresentavam-se agrupadas em agregados celulares presentes nas culturas embriogênicas durante a multiplicação. Os agregados celulares apresentavam variação no tamanho e morfologia revelando diferentes afinidades aos corantes durante a análise citoquímica. As células pequenas eram reativas ao carmim acético apresentando coloração vermelha intenso (Figura 2a) e as células alongadas eram permeáveis ao corante Azul de Evans (Figura 2b). A positiva reação ao carmim acético (Durzan, 1988) e a formação de pró-embriões somáticos com morfologia bipolar (von Arnold *et al.*, 1996) são características fortemente associadas com a competência da célula para o desenvolvimento completo de embriões somáticos quando submetida ao tratamento de maturação. Em nosso trabalho, diversos estágios de organização morfológica dos pró-embriões foram observados (Figura 1h,i,j,k,l,m).

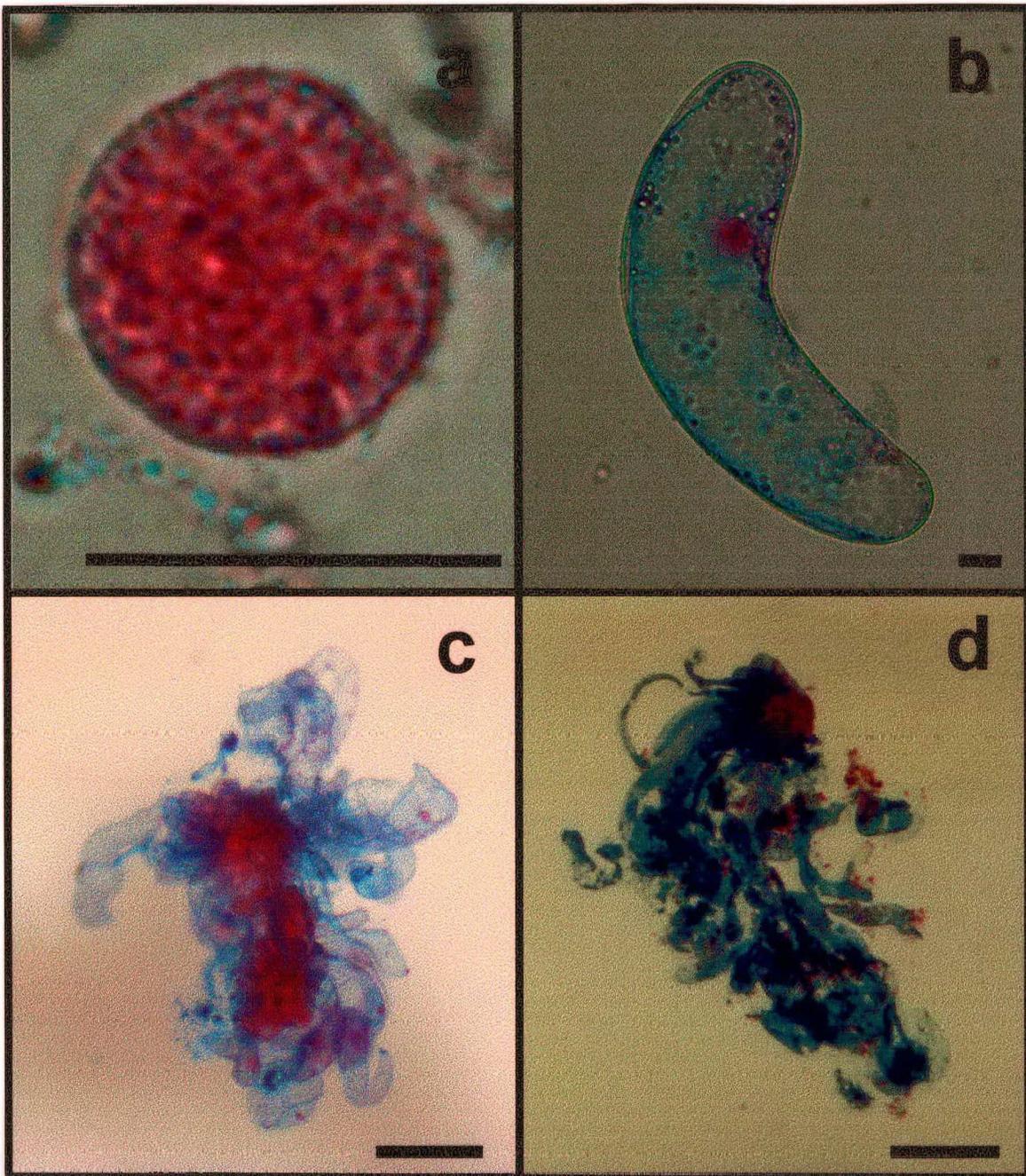
Em coníferas, vários sistemas embriogênicos *in vitro* associam a morfologia celular à competência embriogênica (Egertsdotter & von Arnold, 1998). As diferenças na morfologia celular podem ser influenciadas por diversos fatores como a fonte de explante e composição do meio de

cultura (Fehér *et al.*, 2003). No presente trabalho a fonte de carbono afetou significativamente as taxas de indução e a organização morfológica das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* (Figura 3). Ainda, outros estudos relatam sobre requerimento de um certo grau de organização morfológica das culturas embriogênicas antes de submeter aos tratamentos de maturação como pré-requisito para o desenvolvimento de embriões somáticos completos (Jalonen & von Arnold, 1991; Bozhkov *et al.*, 2002; Stasolla *et al.*, 2003).

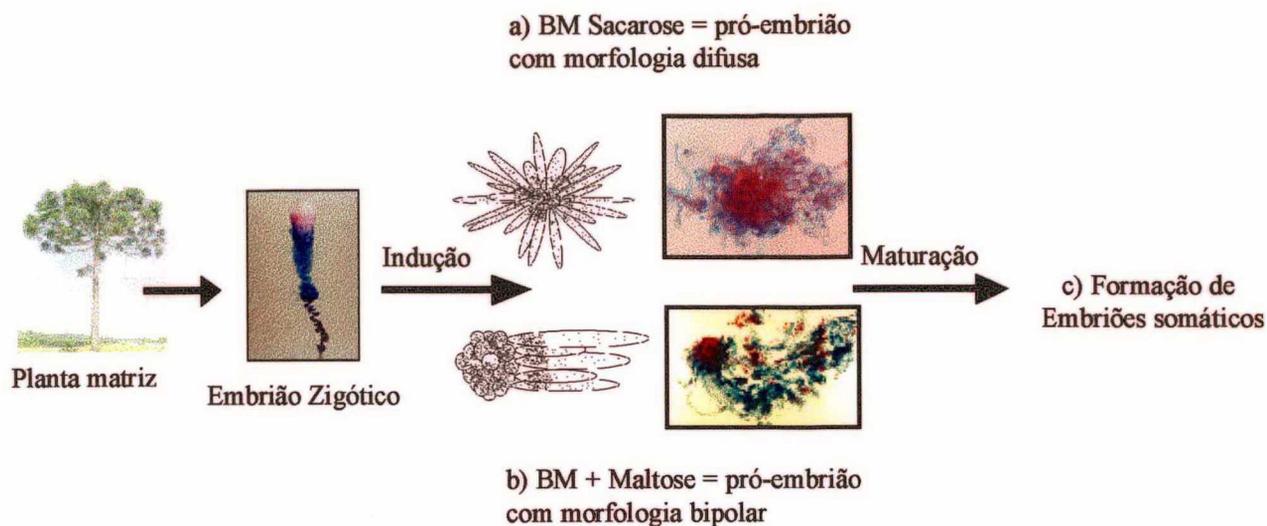
Em *Picea abies*, as culturas embriogênicas foram classificadas em dois grupos baseados na morfologia da célula (Mo *et al.*, 1996). Células do grupo A apresentavam um ápice embrionário largo e formavam embriões completos em resposta aos tratamentos de maturação. Já as células do grupo B apresentavam ápices embrionários pequenos e estruturalmente desorganizados resultando na formação de poucos e ou anormais embriões somáticos. De acordo com esta classificação, no presente trabalho foram observados dois grupos celulares distintos, baseados na morfologia bem como no padrão de desenvolvimento (Figura 3). As culturas embriogênicas induzidas e mantidas em meio de cultura suplementado com maltose apresentaram morfologia (tipo A), na qual os pro-embriões eram formados por agregado de células embriogênicas conectados a células do suspensor (Figura 2d). As culturas embriogênicas mantidas em meio de cultura com sacarose apresentavam morfologia difusa (tipo B) com distúrbio na polaridade, em que, os pró-embriões consistiam de um agregado de células embriogênicas circundado por células do suspensor (Figura 2 c). A transição do desenvolvimento das culturas pró-embriogênicas para embriões somáticos globulares é um ponto crítico na embriogênese somática de *A. angustifolia* e a presença de maltose no meio de cultura é um fator determinante para esta transição levando a histodiferenciação e o posterior estágio de desenvolvimento dos embriões somáticos.



**Figura 1.** Embriogênese zigótica e somática em *Araucaria angustifolia*. A) pró-embrião zigótico, b) embrião zigótico globular, c) embrião zigótico pré cotiledonar, d) embrião zigótico cotiledonar e ) embrião zigótico cotiledonar tardio, f) indução da cultura embriogênica a partir do ápice embrionário zigótico, g) multiplicação da cultura embriogênica, h) tipos celulares mais freqüentes em culturas embriogênicas na fase de multiplicação, i,j,k,l,m) sucessivos estágios de desenvolvimento de pró-embriões somáticos. (Barras a,b,c,d,e,f,g=1mm; h=12,5µm; i,j,k=25µm; l=50 µm e m=125 µm).



**Figura 2.** Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas à análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans. a) células pequenas isodiamétricas reativas ao carmim acético, b) células alongadas e vacuoladas permeáveis ao corante azul de Evans, c) culturas mantidas em meio de cultura BM suplementado com sacarose apresentando morfologia difusa, com distúrbio da polaridade. O pró-embrião consiste em um agregado de células embriogênicas circundado por células do suspensor, d) culturas embriogênicas com morfologia bipolar induzida e mantida em meio de cultura suplementado com maltose. O pró-embrião é formado por um agregado de células embriogênicas conectado a células do suspensor, (Barras a,b = 15 $\mu$ m e b,c = 1mm).



**Figura 3.** Diagrama dos eventos morfogênicos associados ao protocolo de embriogênese somática em *A. angustifolia*. a, b) efeito da fonte de carbono na morfologia das culturas embriogênicas e histodiferenciação dos embriões somáticos.

### 2.3.3. Proteína, amido, ABA e matéria seca

O conteúdo de proteína e ABA foi significativamente superior em culturas embriogênicas multiplicadas em meio de cultura com maltose, comparativamente aquelas multiplicadas com sacarose (Tabela 6 e 7). Na cultura de tecidos vegetais, a sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada como energia para o crescimento em plantas (George, 2003). Em diversas espécies, a sacarose tem sido suplementada ao meio de cultura na fase de multiplicação enquanto a maltose aparece com maior frequência na fase de maturação, sendo atribuída a esta última duas principais atividades: fonte de energia e ou agente osmótico (Blanc *et al.*, 2002; Zoglauer *et al.*, 2002; Stasolla & Yeung 2003; Lipavská & Konrádová, 2004). Durante a multiplicação a suplementação com maltose ao meio de cultura tem sido associada a mudanças na morfologia das culturas embriogênicas (Blanc *et al.*, 1999). Em coníferas, a dinâmica do conteúdo endógeno de carboidratos durante a embriogênese é caracterizada por um alto conteúdo de hexoses durante a fase de multiplicação enquanto que o conteúdo de amido e

proteína é maior nas fases de maturação, desidratação e germinação (Lipavska & Konradova, 2004).

A distribuição da sacarose é mediada por duas principais enzimas: invertases e sacarose sintase (SUSy), seguida da subsequente utilização das hexoses produzidas. As invertases desempenham um importante papel na regulação da composição de açúcares e na hidrólise da sacarose (Tang *et al.*, 1998) enquanto que a SuSy é correlacionada também com a síntese de amido (Winter & Huber, 2000). Durante a embriogênese somática de *Picea mariana* e *Picea glauca* foi observada alta atividade da invertase acompanhada de um acúmulo de hexoses nos estágios pró-embriônicos de desenvolvimento, enquanto que os estágios tardios eram marcados pela alta atividade da enzima SUSy e acúmulo de substâncias de reserva (Iraqi & Tremblay, 2001).

Apesar de que no presente trabalho não foi realizado o acompanhamento da atividade enzimática, o conteúdo de amido e proteínas observado sugere uma relação com a atividade enzimática envolvida na hidrólise da maltose e sacarose. No meio de cultura com sacarose, o conteúdo de amido foi maior, possivelmente devido ao alto conteúdo de hexoses resultante da hidrólise da sacarose, que por sua vez regulam a atividade da enzima SUSy (Iraqi & Tremblay, 2001) correlacionada com a síntese de amido (Winter & Huber, 2000). Neste tratamento além da atividade enzimática para a síntese de amido, outra hipótese que explicaria os valores observados, seria a alta demanda de energia para o metabolismo durante a divisão celular, já que este tratamento apresentou uma maior multiplicação celular em relação aos tratamentos suplementados com maltose (dados não mostrados). Em *Picea mariana* e *Picea glauca*, durante a multiplicação das culturas embriônicas em meio de cultura suplementado com sacarose, foi observado que a alta atividade de invertases gera hexoses necessárias para o crescimento das culturas embriônicas enquanto que a atividade das enzimas SuSy e da sacarose fosfato sintetase (SPS) esteve associada a níveis celulares estáveis de sacarose (Iraqi & Tremblay, 2001). Resultados similares também foram observados em *Picea abies*, em que culturas embriônicas multiplicadas com sacarose apresentavam alta atividade da invertase e baixa

atividade da SUSy, e o conteúdo endógeno de carboidratos era caracterizado pelo alto conteúdo de hexoses e baixo conteúdo de sacarose (Lipavska *et al.*, 2000; Konrádová *et al.*, 2002).

No presente trabalho, o menor conteúdo de amido observado no meio de cultura suplementado com maltose sugere que ocorreu um decréscimo na atividade das invertases resultando em um decréscimo na razão hexose/sacarose, ativando a enzima SUSy responsável pela deposição de amido neste tratamento. A atividade de invertase pode ter sido diminuída pela ausência de sacarose no meio de cultura e pelo baixo conteúdo de glucose resultante da lenta hidrólise da maltose (Blanc *et al.*, 2002). Contudo, outro estudo indica que a sacarose por si só não é suficiente para promover o acúmulo de reservas na ausência de um mecanismo adicional que pode ser sinalizado pela presença de ABA no meio de cultura (Finkelstein & Gibson, 2001).

Nas culturas embriogênicas suplementadas com maltose foram observados valores significativamente superiores de ABA comparativamente a sacarose (Tabela 6 e 7). Estudos moleculares indicam uma estreita relação entre a concentração de açúcar e a biossíntese de ABA (Sheen & Leon, 2003). Durante o desenvolvimento da semente em legumes foi observado que a glicose induz a ativação de genes responsáveis pela biossíntese de ABA (Winter & Huber, 2000). Isto sugere que os valores de ABA observados no presente estudo tiveram sua biossíntese sinalizada pela presença de glucose, proveniente da hidrólise da maltose suplementada neste meio de cultura. Em diversas espécies durante a embriogênese o acúmulo de amido e ABA é também acompanhado pela síntese de proteínas (Schuller *et al.*, 2000), o que confirma os resultados observados no presente trabalho. Além disso, os valores de proteína, amido e ABA corroboram com a análise morfológica destas culturas confirmando a relação dos componentes endógenos com a organização morfológica dos pró-embriões neste tratamento.

Os valores de matéria seca (MS) não foram influenciados significativamente pela fonte de carbono, indicando que o acúmulo de amido e proteínas observado no tratamento com maltose na concentração utilizada neste estudo não provocaram a vacuolização celular condizente com o processo de diferenciação celular observados nos estágios tardios de desenvolvimento da semente (Bewley & Black, 1994). Possivelmente, o efeito da maltose nas culturas embriogênicas

de *A. angustifolia* esteve relacionado com o estabelecimento da polaridade que é uma das primeiras etapas da organização morfológica dos pró-embriões somáticos.

#### 2.3.4. AIA

Valores significativamente superiores no conteúdo endógeno de AIA foram observados em culturas embriogênicas multiplicadas em meio de cultura suplementado com 2,4-D (5 $\mu$ M), BAP e Kin (2 $\mu$ M cada) (Tabela 8). Diversos estudos relatam que adição exógena de fitorreguladores ao meio de cultura estimula a produção endógena de hormônios (Pasternak *et al.*, 2002; Jiménez, 2001). Em culturas embriogênicas de cenoura foram observados resultados similares e os autores indicam que o aumento no conteúdo endógeno de AIA esteve relacionado à presença de 2,4-D no meio de cultura (Ribnicky *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2003).

As auxinas são conhecidas como mediadoras da transição das células somáticas para células embriogênicas (Jiménez, 2001). Além disso, as auxinas regulam diversos processos de desenvolvimento em plantas entre eles a divisão celular (Reed, 2001). Em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* o conteúdo endógeno de AIA foi diretamente relacionado com a multiplicação celular, uma vez que valores significativamente superiores de AIA foram observados quando meio de cultura foi suplementado com sacarose e fitorreguladores, que também resultou em maior multiplicação celular (Tabela 6). O conteúdo de ABA foi inversamente proporcional ao conteúdo de AIA. Os menores valores de AIA foram observados em culturas embriogênicas multiplicadas com maltose, as quais também apresentaram valores significativamente superiores de ABA (Tabela 7).

O aumento no conteúdo endógeno de AIA em diversos estudos é também associado a culturas celulares competentes, porém, a remoção dos reguladores exógenos é fundamental para o início da formação dos embriões somáticos (Li & Neumann, 1985; Sasaki *et al.*, 1994; Jiménez & Bangerth, 2001; Ribnicky *et al.*, 2002). Auxinas parecem ser essenciais na indução e multiplicação embriogênica, mas inibem a maturação (Neumann, 2000). Devido a isso, após a indução, as

culturas embriogênicas são geralmente subcultivadas para meios de cultura com redução de fitorreguladores ou até isento deles.

Em *A.angustifolia* foram obtidas culturas embriogênicas em meio de cultura sem a suplementação de fitorreguladores. Apesar disso, foram observados conteúdos de AIA endógeno nestas culturas, porém, significativamente inferiores àqueles observados em culturas multiplicadas com a presença de fitorreguladores. O conteúdo endógeno de AIA observado neste tratamento pode ser proveniente da liberação de AIA conjugado nestas células. O AIA ocorre nos tecidos vegetais na forma livre (ativa) ou conjugada (inativa), embora este último não tenha sido dosado nas culturas no presente trabalho. O AIA na forma conjugada encontra-se ligado a pequenas moléculas como a glucose, mio-inositol e ácido aspártico ou, ainda, com macromoléculas como as glicoproteínas e polipeptídeos (Sandberg *et al.*, 1987).

**Tabela 6.** Efeito dos tratamentos de multiplicação no conteúdo endógeno de AIA, ABA, proteína, amido e MS% das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. Maltose (M), sacarose (S), fitorreguladores 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0.5 $\mu$ M cada) (2) e ausência de fitorreguladores (0).

Tratamento	AIA ng.g <sup>-1</sup> MF	ABA ng.g <sup>-1</sup> MF	Proteína mg.g <sup>-1</sup> MF	Amido mg.g <sup>-1</sup> MF	MS%
S2	18,04 a	21,60 c	0,12 b	1,76 a	3,61 a
S0	8,54 c	44,23 b	0,13 b	1,42 b	4,42 a
M2	10,98 b	81,98 a	0,21 a	1,32 b	3,81 a
Média	15,52	49,27	0,15	1,50	3,95
C.V. (%) <sup>1</sup>	1,50	2,70	1,30	2,60	3,40

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>Dados transformados para log (x+2).

**Tabela 7.** Efeito da fonte de carbono no conteúdo endógeno de AIA, ABA, proteína, amido e MS durante a multiplicação das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

Fonte de Carbono (3% p/v)	AIA ng.g <sup>-1</sup> MF	ABA ng.g <sup>-1</sup> MF	Proteína mg.g <sup>-1</sup> MF	Amido mg.g <sup>-1</sup> MF	MS%
Sacarose	13,29 a	32,91 b	0,12 b	1,59 a	4,01 a
Maltose	10,98 b	81,97 a	0,20 a	1,32 a	3,81 a
Média	12,14	57,44	0,16	1,45	3,91
C.V. (%) <sup>1</sup>	11,50	8,23	1,30	4,10	4,60

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>Dados transformados para log (x+2).

**Tabela 8.** Efeito da presença e ausência de fitorreguladores no conteúdo endógeno de AIA, ABA, proteína, amido e MS durante a multiplicação das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

Fitorreguladores (μM)	AIA ng.g <sup>-1</sup> MF	ABA ng.g <sup>-1</sup> MF	Proteína mg.g <sup>-1</sup> MF	Amido mg.g <sup>-1</sup> MF	MS%
--	8,54 b	44,23 a	0,13 a	1,42 b	4,42 a
2,4-D (2) + BAP (0,5) e Kin (0,5)	14,51 a	49,27 a	0,15 a	1,54 a	3,72 b
Média	11,52	46,75	0,14	1,48	4,06
C.V. (%) <sup>1</sup>	8,10	15,73	2,60	4,90	3,20

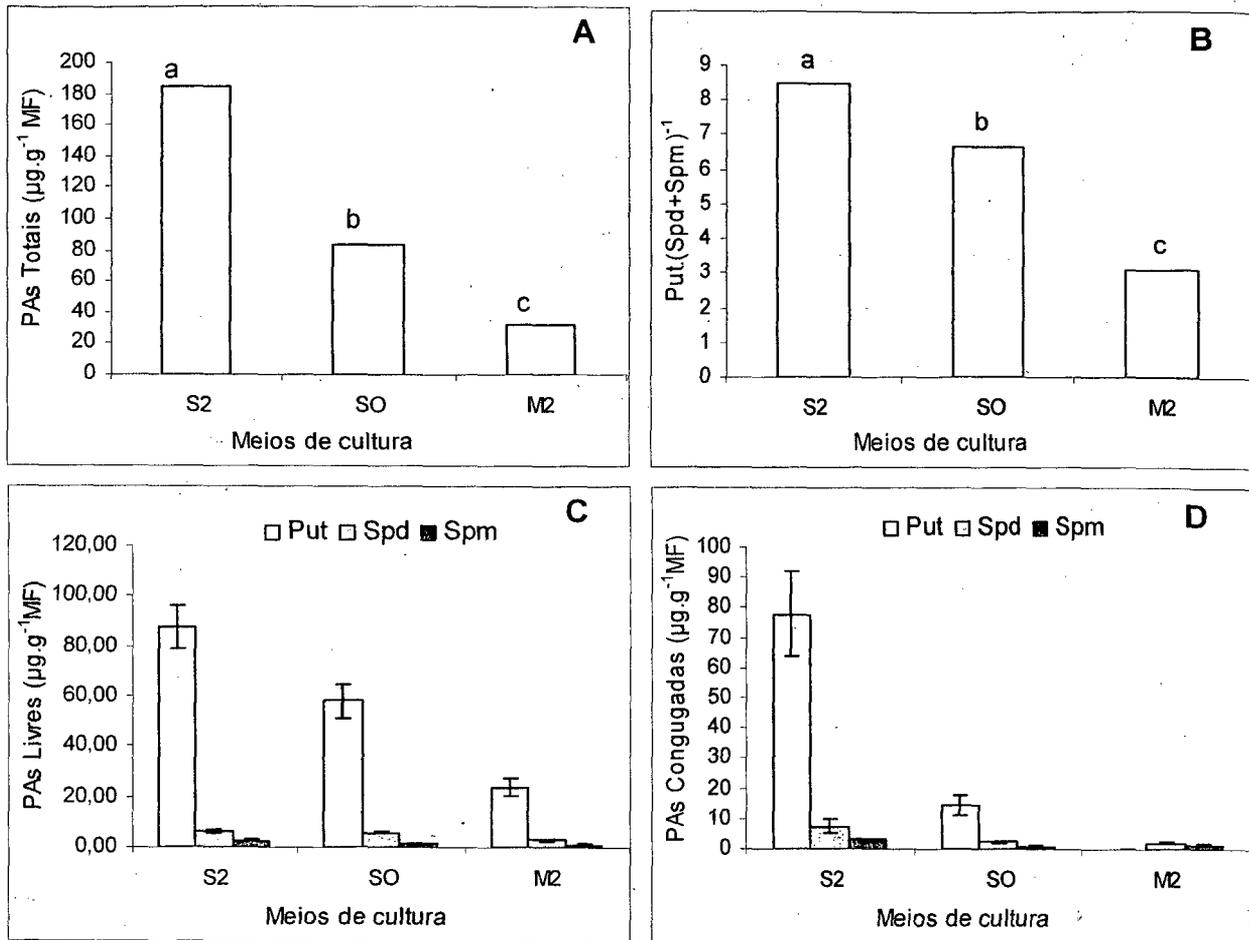
Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>Dados transformados para log (x+2).

### 2.3.5. Poliaminas

O conteúdo de poliaminas variou significativamente nas culturas embriogênicas provenientes dos diferentes tratamentos de multiplicação. O maior conteúdo de PAs totais e também de [Put\*(Spd+Spm)-1] foi observado no tratamento suplementado com sacarose (3%) e 2,4-D (2μM), BAP e Kin (0,5μM cada) (S2), seguido no tratamento isento de fitorreguladores (S0) (Figura 4). O tratamento com maltose 3% e 2,4-D (2μM), BAP e Kin (0,5μM cada) (M2) apresentou o menor conteúdo de PAs comparativamente aos demais tratamentos. Foi observada um maior conteúdo de PAs livres em relação a PAs conjugadas em todos os tratamentos, sendo a Put a

poliamina dominante tanto na forma livre quanto conjugada. O conteúdo Put foi diretamente relacionado à alta multiplicação celular nos tratamentos S2 e S0, comparativamente ao tratamento M2 com menor multiplicação celular.

O incremento da biossíntese de poliaminas em plantas tem sido correlacionado com incremento da divisão celular (Galston & Flores, 1991). Durante a embriogênese zigótica em diversa espécies de coníferas o conteúdo de PAs é maior durante os estágios iniciais da embriogênese diminuindo na formação dos cotilédones (Astarita *et al.*, 2003b; Silveira *et al.*, 2004a). Durante a indução de culturas embriogênicas de *Solanum melongena* foi observada intensa proliferação da cultura com incremento no conteúdo endógeno de PAs (Fracassini *et al.*, 1980; Maki *et al.*, 1991). Em culturas embriogênicas de *Pinus oocarpa* e *Pinus patula* a Put foi relacionada ao estímulo da divisão celular (Feirer, 1995). Outros resultados demonstram que o conteúdo endógeno de PAs está associado com diferenças na capacidade embriogênica das culturas (Sharma & Rajam, 1995; Yadav & Rajam, 1997). Contudo, em nosso trabalho os maiores conteúdos foram observados em tratamentos suplementados com sacarose.



**Figura 4.** (A) PAs Totais, (B) razão de PAs, (C) PAs Livres e (D) PAs conjugadas das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* nos diferentes tratamentos de multiplicação. Meio de cultura BM suplementado para maltose (M), sacarose (S), fitorreguladores 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0.5\mu\text{M}$  cada) (2) e isento de fitorreguladores (0). (A e B) Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de SNK ( $p < 0,05$ ) ( $C.V._A = 11,2\%$ ;  $C.V._B = 7,3\%$ ) (C e D) Dados representam a média  $\pm$  desvio padrão.

**CAPÍTULO II**

**DINÂMICA DE CRESCIMENTO E ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE  
SUSPENSÕES CELULARES EMBRIOGENÉTICAS DE *Araucaria angustifolia***

### 3.1. INTRODUÇÃO

Suspensões celulares são consideradas a forma mais apropriada para o cultivo massal de células vegetais (Wickremesinhe & Arteca, 1994), permitindo a redução dos custos da propagação clonal e a multiplicação de genótipos superiores ou ameaçados de extinção (Lipavska & Konrádová, 2004). Com o propósito de aumentar o potencial da embriogênese somática como sistema de propagação vegetativa é necessário o desenvolvimento de condições de cultura apropriadas para manutenção e multiplicação de culturas embriogênicas em suspensões celulares (Lulsdorf *et al.*, 1992).

Suspensões celulares são também um sistema experimental adequado para estudos fisiológicos e da dinâmica de crescimento de culturas embriogênicas *in vitro* (Lulsdorf *et al.*, 1992). Outra vantagem é o baixo grau de diferenciação celular proporcionado por este sistema e que geralmente não está presente na maioria dos tecidos e órgãos (Szabados *et al.*, 1993).

Diversos estudos mostraram um importante papel das poliaminas na proliferação celular, agindo em fases essenciais do desenvolvimento celular, e em resposta as condições de estresse biótico e abiótico (Königshofer *et al.*, 2002, Galston, *et al.*, 1997), embora ainda seus mecanismos de ação não estão completamente elucidados (Bouchereau *et al.*, 1999). O crescimento das culturas embriogênicas em geral é associado a mudanças na síntese e mobilização de proteínas, carboidratos e lipídios. O conteúdo destas substâncias é modificado nas diferentes fases de crescimento e em função do suprimento de energia para o crescimento celular (Nomura & Komamine, 1995).

O objetivo deste trabalho foi estudar parâmetros bioquímicos e fisiológicos associados à dinâmica de crescimento, assim como, a síntese e o acúmulo endógeno de proteínas, amido e poliaminas em suspensão celulares de *A. angustifolia*.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Material vegetal

Foram utilizadas culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, induzidas e estabilizadas no período 2002/2003, segundo Steiner *et al.*, (2004). As culturas foram mantidas em ciclos repetitivos de divisão celular, em meio de cultura BM (Gupta & Pulmann, 1991), suplementado ou não com 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP (0,5 $\mu$ M) e Kin (0,5 $\mu$ M).

### 3.2.2. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado baseou-se na formulação salina BM (Gupta & Pullman, 1991) acrescida de L-glutamina (1 g.L<sup>-1</sup>), mio-inositol (1 g.L<sup>-1</sup>) e caseína hidrolisada (0,5 g.L<sup>-1</sup>). Estes componentes foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem. Foram testados tratamentos, com variação para fonte de carbono maltose (3%) ou sacarose (3%) e para suplementação com os fitorreguladores: 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP (0,5 $\mu$ M) e Kin (0,5 $\mu$ M) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Tratamentos utilizados no experimento de suspensões celulares de *A. angustifolia*.

Formulação Salina BM (Gupta & Pullman, 1991)					
Denominação do Tratamento	Fonte de carbono (p/v)		Fitorreguladores		
	Maltose (3%)	Sacarose (3%)	2,4-D (2 $\mu$ M)	BAP (0,5 $\mu$ M)	KIN (0,5 $\mu$ M)
SF	-	X	X	X	X
S	-	X	-	-	-
MF	X	-	X	X	X
M	X	-	-	-	-
CF	-	-	X	X	X
CMS	-	-	-	-	-

\*(x) = presença; (-) = ausência

### 3.2.3. Condições de cultura *in vitro*

Para cada tratamento foram inoculados cinco frascos de Steward, sendo quatro frascos simples e um frasco adaptado com tubo de centrífuga graduado. Cada frasco de Steward com 100 mL de meio de cultura foi inoculado com culturas embriogênicas provenientes do meio semi-sólido. Após a inoculação, os frascos com as culturas foram incubados no escuro em um agitador orbital com rotação lenta (1 rpm), a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ .

Para avaliação da dinâmica de crescimento celular das culturas embriogênicas foram utilizados frascos de Steward adaptados a tubos de centrífuga graduados. Cada frasco continha 100 mL meio líquido, com uma alíquota inicial de 1g da cultura embriogênica em todos os tratamentos, obtendo-se um volume inicial de 2 mL. Avaliou-se o crescimento celular por meio de leituras do volume celular sedimentado de três em três dias, invertendo a posição dos frascos.

Para a análise bioquímica foram coletadas amostras celulares a cada 15 dias contemplando todas as fases de crescimento das suspensões celulares. Estas foram armazenadas em freezer ( $-20^\circ\text{C}$ ) para as posteriores análises bioquímicas. Em cada coleta foi avaliado também o pH do meio de cultura.

### 3.2.4. Determinação de proteínas e amido

Foram utilizadas amostras de 300 mg de culturas embriogênicas de todos os tratamentos aos 5, 20, 35 e 50 dias de cultivo. A metodologia para extração e dosagem de proteínas e amido encontra-se descrita nos itens 2.2.4 e 2.2.5 do capítulo I.

### 3.2.5. Determinação de poliaminas

Amostras de 300 mg de matéria fresca (MF) das culturas embriogênicas de todos os tratamentos aos 5, 20, 35 e 50 dias de cultivo foram analisadas. A metodologia para extração e determinação das poliaminas encontra-se descrita no item 2.2.6 do capítulo I.

### 3.2.6. Estratégia experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em blocos completamente casualizados. A análise bioquímica foi realizada em triplicata para cada tratamento. Os dados foram representados através das médias e desvio padrão.

## 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1. Dinâmica de crescimento e pH do meio de cultura

Suspensões celulares possuem um alto potencial para multiplicação massal de culturas embriogênicas de coníferas (Lulsdorf *et al.*, 1992). A presença de fitorreguladores no meio de cultura afetou a dinâmica de crescimento das suspensões celulares em *A. angustifolia in vitro*. Os tratamentos suplementados com sacarose (3%) ou maltose (3%) e fitorreguladores 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP (0,5 $\mu$ M) e Kin (0,5 $\mu$ M), sendo eles SF, MF e S, apresentaram um incremento no volume celular sedimentado (Figura 1A), indicando aptidão para a multiplicação massal das culturas embriogênicas.

O tratamento com sacarose e fitorreguladores (SF) apresentou o maior incremento, com volume celular sedimentado de 51 mL após 42 dias de cultivo. Já o tratamento suplementado com maltose e fitorreguladores (MF) apresentou 49 mL após 54 dias de cultivo, atingindo a fase

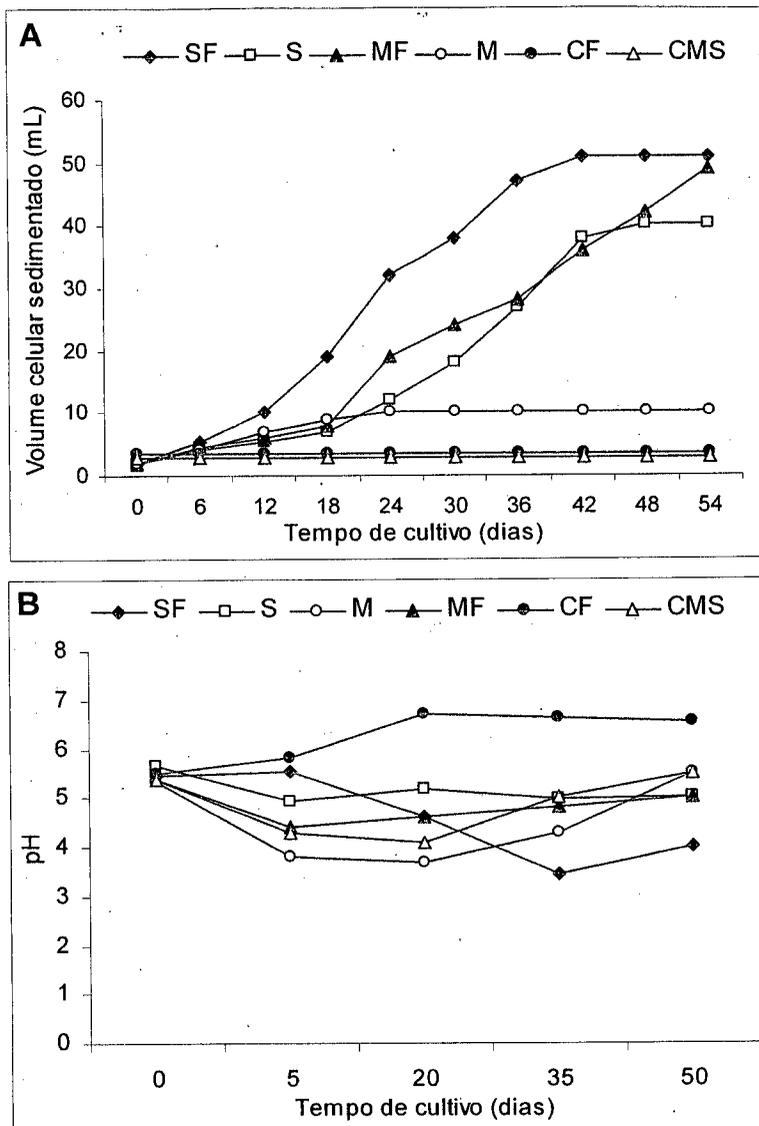
estacionária 12 dias após no tratamento SF. Em *Glycine* e *Acer sp*, observou-se que o crescimento dos tecidos em meio de cultura suplementado com maltose também foi lento comparado a outras fontes de carbono (George, 1993). Estes resultados possivelmente estão relacionados ao balanço de citocininas e auxinas presentes no meio de cultura. As citocininas agem diretamente no ciclo celular, provavelmente na regulação da síntese de proteínas envolvidas na formação e funções do fuso mitótico. Já as auxinas agem em duas rotas durante o crescimento celular; estimulam a acidificação da parede celular e induzem o processo de transcrição seletivo, codificando proteínas associadas com o crescimento celular (George, 1993). Comparativamente, Silveira *et al.*, 2004b observou a fase estacionária em suspensões celulares de *Pinus taeda* após 24 dias de cultivo. Já em *A. angustifolia* a fase estacionária foi alcançada após 54 dias de cultivo (Santos, 2000).

Culturas embriogênicas que crescem na ausência de fitorreguladores podem ser classificadas como habituadas. A habituação é geralmente reversível, tratando-se de um caráter epigenético que direciona para a autonomia hormonal (Jiménez, 2001). Culturas suplementadas apenas com sacarose e ausência de fitorreguladores (S) apresentaram um volume celular sedimentado de 40 mL, atingindo a fase estacionária aos 48 dias de cultivo. Ao contrário, as culturas suplementadas com maltose e sem a de fitorreguladores (M) apresentaram apenas um incremento inicial do volume e posterior estabilização até o final do período de cultivo, semelhante ao observado nos tratamentos controle (CF e CMS) (Figura 1A). O crescimento das culturas suplementadas apenas com sacarose (S) possivelmente se deve ao fato de que estas culturas apresentaram biossíntese endógena de hormônios conduzindo à multiplicação celular, enquanto que naquelas culturas suplementadas com maltose isto pode ter ocorrido de maneira reduzida. Segundo Sheen & Leon (2003), existe uma estreita conexão entre a presença do açúcar no meio de cultura e a biossíntese hormonal endógena. Neste caso a sinalização para biossíntese endógena hormonal pode ser atribuída ao tipo de açúcar presente no meio de cultura, a sacarose.

Em todos os tratamentos testados (SF, S, MF, M, CF e CMS) as mudanças de pH do meio de cultura, seguiram o padrão normal para culturas embriogênicas de coníferas, com redução

inicial seguido por um incremento de pH no final do período de cultivo (Figura 1B). Em suspensões celulares de *Araucaria angustifolia* (Astarita & Guerra, 2000), *Picea mariana* e *Picea glauca-engelmannii* (Lulsdorf *et al.*, 1992) também foi observado o mesmo padrão de variação de pH.

As mudanças de pH observadas podem refletir variações do metabolismo do nitrogênio. De acordo com Find *et al.* (1998), as mudanças de pH do meio de cultura são resultantes da preferência por absorção do amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) ao nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Assim, a redução de pH inicial parece refletir a absorção preferencial de amônio, e o aumento de pH subsequente poderia ser associado com absorção do nitrato depois do amônio ter esgotado (Lulsdorf *et al.*, 1992). Estes resultados podem ainda ser relacionados com a presença de auxina no meio de cultura nos tratamentos MF e SF. Auxinas promovem o crescimento celular e induzem a secreção do íon ( $\text{H}^+$ ) através da parede celular. A exportação de prótons acelera a acidificação do meio de cultura (George, 1993). Contudo, a gradual acidificação do meio de cultura não afetou o crescimento celular.



**Figura 1.** Efeito da fonte de carbono e dos fitorreguladores suplementados ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) em suspensões celulares de *A. angustifolia*. (A) Dinâmica de crescimento (B) pH do meio de cultura. Tratamentos: **SF** (BM + sacarose (3%) + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); **S** (BM +sacarose (3%)), **MF** (BM +maltose (3%) + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); **M** (BM + maltose (3%)); **CF** (BM + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); **CMS** (BM).

### 3.3.2. Poliaminas

Diversos estudos têm demonstrado que a competência para a formação de embriões somáticos, seu desenvolvimento e conversão em plantas são afetados pelos níveis de poliaminas presentes nas culturas (Faure *et al.*, 1991; Galston & Flores, 1991). Recentes estudos indicam que o conteúdo endógeno de poliaminas está relacionado à capacidade embriogênica das células principalmente durante os estágios iniciais da embriogênese somática em *Solanum melongena*, *Medicago sativa*, *Oryza sativa* e *Panax ginseng* (Yadav & Rajam, 1998; Huang *et al.*, 2001; Shoeb *et al.*, 2001; Monteiro *et al.*, 2002).

As culturas embriogênicas *A. angustifolia* apresentaram um conteúdo consideravelmente maior para as poliaminas Put, Spd e Spm na forma livre (Figura 2 A, B e C) quando comparado com estas poliaminas na forma conjugada (Figura 2 D, E, F). Dentre as poliaminas, tanto na forma livre, quanto na forma conjugada, o conteúdo de Put foi maior nas culturas embriogênicas, seguido de valores intermediários para Spd e inferiores para Spm (Figura 2). Resultados semelhantes também foram observados por Yadav & Rajam (1998), durante o cultivo *in vitro* de culturas embriogênicas de *Solanum melongena*.

Nas culturas embriogênicas de *A. angustifolia* a Put livre foi a poliamina observada em maiores valores principalmente nos tratamentos suplementados somente com sacarose (3%) (S) e também naqueles com adição da sacarose (3%) e fitorreguladores 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP (0,5 $\mu$ M) e Kin (0,5 $\mu$ M) (SF). Os níveis e as taxas de síntese de poliaminas são muito mais altos durante a divisão celular do que em tecidos em senescência (Minocha *et al.*, 1991). Isso foi confirmado em nosso experimento onde os tratamentos com maior incremento celular (S e SF) apresentaram os maiores valores de PAs. O conteúdo de Put livre observado ao final do período de cultivo foi menor do que o conteúdo de Put inicial em todos os tratamentos, indicando um possível consumo desta poliamina durante o crescimento celular ou a conversão entre poliaminas livres e conjugadas.

As poliaminas são consideradas por alguns autores como uma nova classe de hormônios vegetais implicando na regulação da embriogênese somática e zigótica (Bagni & Torrigiani, 1992; Kong *et al.*, 1998). O papel da Put no crescimento celular não está totalmente elucidado. De acordo com Feirer, (1995) a Put estimula a divisão celular em culturas embriogênicas de *Pinus oocarpa* e *Pinus patula*. Contudo, o crescimento de calos de *Nicotiana tabacum* em meio de cultura contendo baixos níveis de auxina apresentou um incremento significativo nos níveis de Put, indicando que altos níveis desta estão associados com a redução do crescimento celular em meio de cultura com baixos níveis de auxinas (Rastogi & Davies, 2000). Em nosso trabalho, o meio de cultura suplementado somente com sacarose (S) apresentou um incremento celular menor comparativamente aos tratamentos SF e MF suplementados com fitorreguladores, sendo observado que os conteúdos de Put neste tratamento tanto na forma livre como na forma conjugada foram elevados (Figura 2 A e D).

No tratamento suplementado com maltose e fitorreguladores (MF), foi observado acréscimo de Put livre até o 35º dia, seguido de decréscimo até o 50º dia de cultivo, porém com valores significativamente inferiores aqueles tratamentos suplementados com sacarose e que também apresentaram incremento celular. Alguns trabalhos têm mostrado que as poliaminas interagem de alguma forma com os hormônios vegetais, sugerindo que auxinas e giberelinas podem induzir a síntese de poliaminas (Bagni & Serafini-Fracassini, 1985; Smith *et al.*, 1985). Nos tratamentos MF suplementado com maltose e fitorreguladores, o conteúdo de Put observado nas culturas embriogênicas foi relacionado com a promoção da divisão celular destas culturas. Havelange *et al.* (1996), confirmam essa hipótese propondo que a Put em *Sinapis alba* possa estar relacionada ao estímulo da divisão celular, sendo que, em culturas celulares de *Catharantus roseus* quando a síntese de Put foi bloqueada, ocorreu uma inibição da divisão celular (Minocha *et al.*, 1991).

O tratamento suplementado somente com maltose (M) apresentou ao longo do cultivo um padrão de variação semelhante aos tratamentos controle, sem fonte de carbono e fitorreguladores (CMS), e somente com fitorreguladores (CF), sendo observado um incremento nos níveis de Put

livre até o 20º dia de cultivo e um posterior decréscimo até o 50º dia de cultivo (Figura 2). Estes resultados sugerem que a síntese de Put nestes tratamentos pode ter sido bloqueada por dois caminhos (i) pela ausência da fonte de carbono para a síntese de aminoácidos e subsequente síntese de poliaminas, no tratamento CF e CMS; ii) desvio para produção de etileno *in vitro* a partir do mesmo precursor das poliaminas (via S-adenosil metionina). Ainda, reforçando esta hipótese, foram também observadas reduções nos níveis de Spd e Spm livres nestes tratamentos, no final do período de cultivo (Figura 2 B,C). Segundo Bisbis *et al.* (1998), o aumento nos níveis de poliaminas nas culturas celulares inibe diretamente a produção do etileno por competição por SAM (s-adenosilmetionina), bem como pelo efeito de seqüestrar radicais livres, necessários para a conversão do ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano) em etileno. O uso do SAM pelos tecidos vegetais para a síntese de poliaminas ou etileno depende do tipo de tecido, estágio de desenvolvimento e condições de crescimento (Kushad & Dumbroff, 1991). De maneira geral o estresse nas condições de cultivo é geralmente acompanhado por altos níveis de poliaminas e ou etileno, e em contraste, os níveis de Spm e Spd se mantêm estáveis durante estas mudanças (Benson, 2000).

A produção de etileno em cultura de tecidos vegetais recebeu atenção considerável como um possível fator de recalcitrância. A cultura de tecidos pode promover efeitos interativos inibitórios entre hormônios endógenos e exógenos e a recalcitrância pode estar associada com a alta produção e acumulação de etileno *in vitro*. O etileno está envolvido em muitas respostas morfogênicas como promover e inibir a morfogênese *in vitro*. As interações do etileno com outros fitorreguladores é altamente complexa e é ainda pouco compreendida (Benson, 2000). Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o etileno poderia ter implicado em mecanismos que levaram ao decréscimo da proliferação celular (Kumar *et al.*, 1997) nos tratamentos M, CMS e CF.

Apesar da Put ser importante para a manutenção da proliferação celular, a presença das poliaminas Spd e Spm é necessária para que ocorra a diferenciação celular de células especializadas em leveduras e em culturas de *D. carota* (Galston & Kaur-Sawhney, 1990). No

presente trabalho, foi observado um incremento nos valores de Spd livre nas culturas embriogênicas ao longo do período de cultivo apenas para no tratamento MF. Entretanto, nos demais tratamentos com incremento celular SF e S foram observadas oscilações durante o período de cultivo, porém o conteúdo de Spd no final do período de cultivo foi inferior ao conteúdo de Spd observado no início do período de cultivo (Figura 2 B, E). Isto, provavelmente, ocorreu devido à redução nos níveis de Put livre nestes tratamentos. Em *Panax ginseng* o conteúdo de Spd foi indicador da capacidade embriogênica de células cultivadas em meio líquido sendo observado um incremento de Spd especialmente no início do período de cultivo (Monteiro *et al.*, 2002).

A Spm livre nas culturas embriogênicas foi observada em pequenas concentrações. O tratamento suplementado somente com sacarose (3%) apresentou a maior concentração de Spm livre quando comparado com os demais tratamentos. Foi observado um decréscimo de Spm livre ao longo do período de cultivo, exceto para o tratamento MF que apresentou pequenas oscilações. O tipo de açúcar suplementado ao meio de cultura influenciou o conteúdo desta poliaminas, sendo que os meios de cultura suplementados com sacarose apresentaram os maiores conteúdos e também o maior incremento celular.

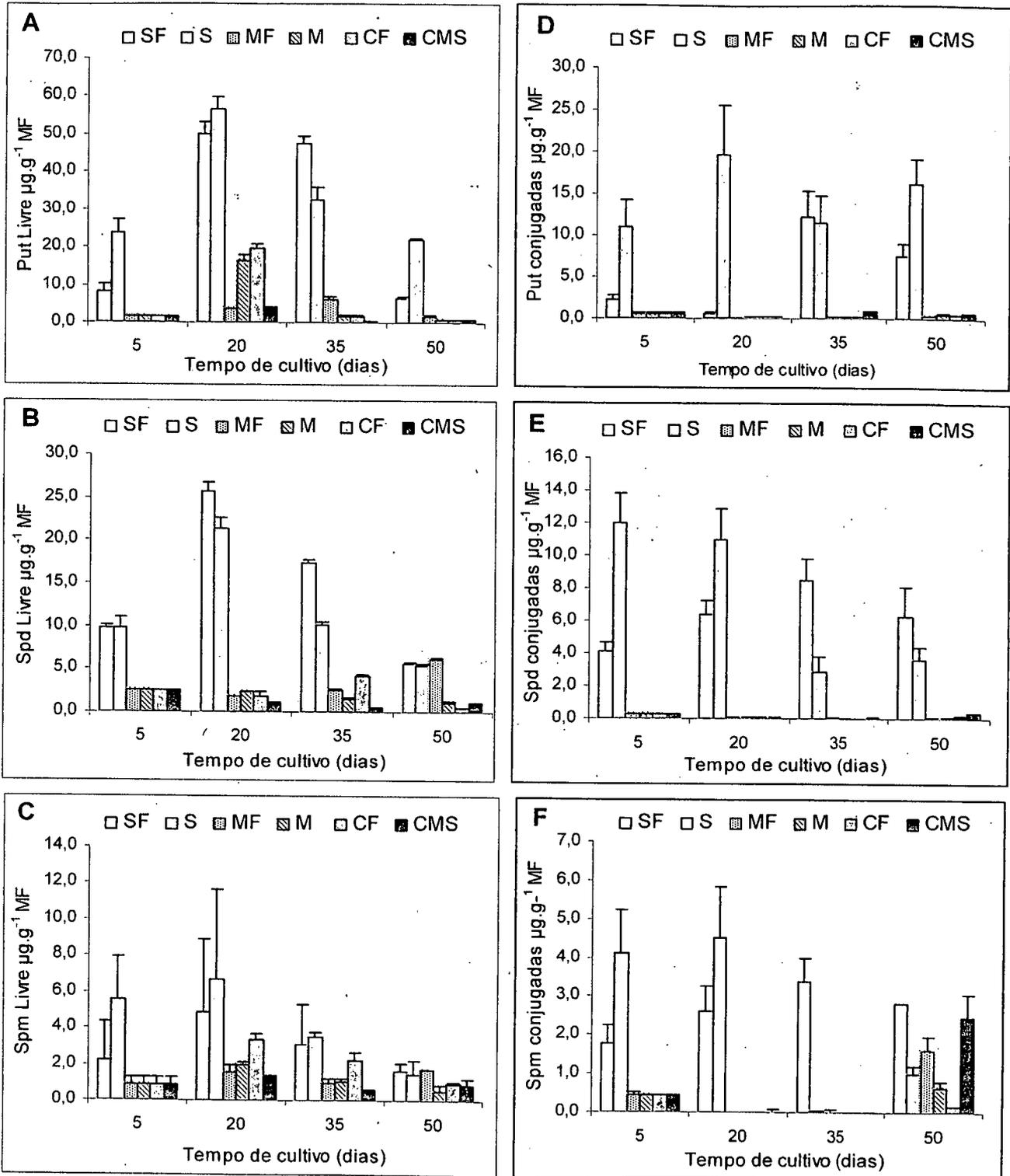
Em relação as PAs conjugadas foram observados os maiores conteúdos nos tratamentos SF e S, ambos suplementados com sacarose. Foi observado um incremento de Spm conjugada no final do período de cultivo, principalmente naqueles tratamentos suplementados com maltose. A Spm age na estabilização de membrana celular e possui ação de antioxidante (Bouchereau *et al.*, 1999). O conteúdo de Spm no final do período de cultivo sugere que a estabilização da membrana celular e atividade antioxidante de Spm tem papel fundamental na manutenção da integridade da célula quando o meio de cultura é esgotado.

Embora o conteúdo de poliaminas conjugadas solúveis em PCA possa variar durante o ciclo celular, seu significado fisiológico nos vegetais ainda não é bem conhecido (Altamura *et al.*, 1993). Salienta-se que os primeiros estudos realizados com poliaminas não fazem menção às formas conjugadas (Minocha & Minocha, 1995), estudando somente poliaminas na forma livre. A análise das poliaminas na forma conjugada e ligada é importante para a compreensão dos

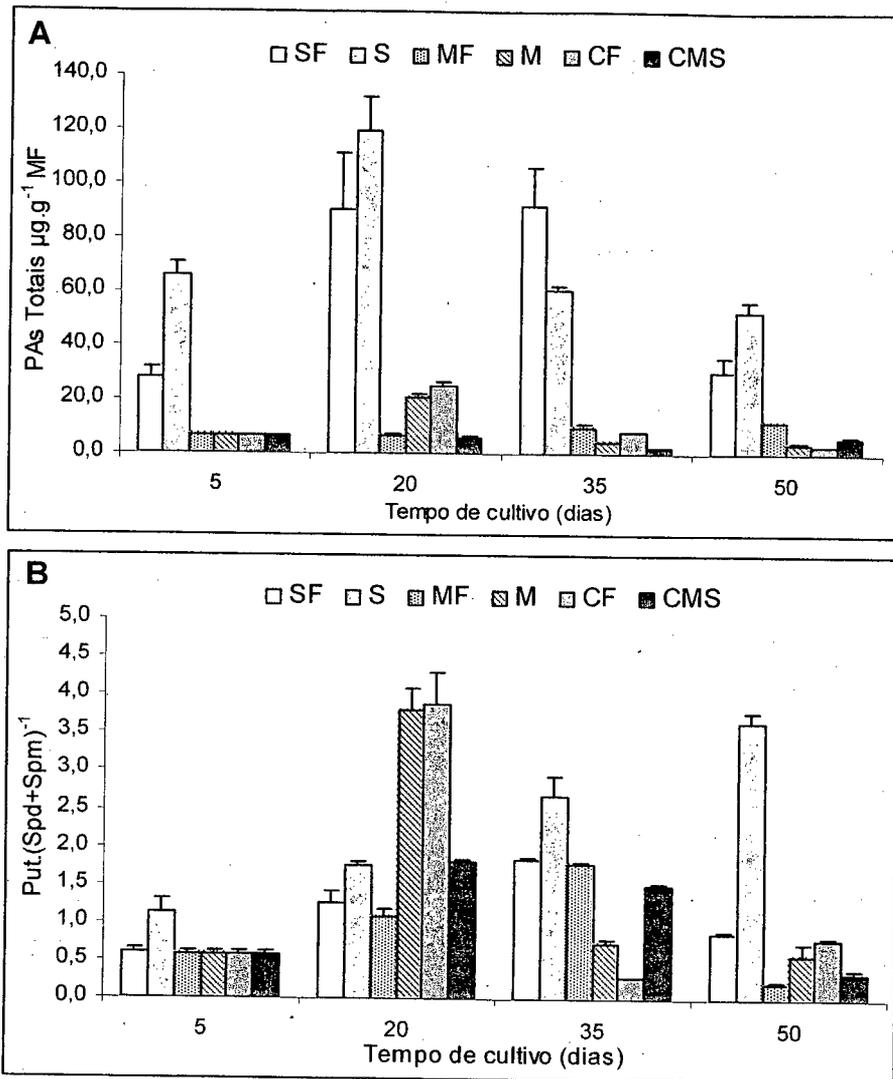
processos de desenvolvimento vegetal (Kaur-Sawhney & Applewite, 1993), uma vez que podem ocorrer interconversões entre as duas formas, mantendo níveis adequados destas substâncias (Torrighiani *et al.*, 1989). Alguns autores sugerem que a conjugação de poliaminas pode ser uma forma de regulação do "pool" de poliaminas livres na célula (Mader & Hanke, 1997; Bais & Ravishankar, 2002).

O conteúdo de PAs totais e a razão [Put.(Spd+Spm)<sup>-1</sup>] variaram entre os tratamentos testados nas suspensões celulares. Incremento na biossíntese de PAs totais é normalmente correlacionado com altas taxas de divisão e multiplicação celular (Bagni, 1996; Cvikrová *et al.*, 1999). O maior conteúdo de PAs totais foi observado nos tratamentos SF e S que apresentaram baixo conteúdo no início e final do cultivo, e acúmulo nas fase intermediárias de cultivo. As fases intermediárias correspondem à fase exponencial e linear da curva de crescimento, as quais apresentam intensa atividade mitótica (Ludсорf *et al.*, 1992).

Alto conteúdo de PAs totais tem sido relacionado com tecidos em crescimento (Yadav & Rajam, 1998). Também alto conteúdo de PAs induziram a atividade mitótica em bulbos dormentes de *Helianthus* (Bagni, 1996). Assim, em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* o conteúdo de PAs totais foi associado ao maior incremento celular. A razão de poliaminas foi maior nos tratamentos M e CF principalmente no 20º dia de cultivo e também no tratamento S no final do período de cultivo, indicando que neste período não ocorreu a síntese da Spd e Spm. Contudo, em cenoura foi observado alto conteúdo de Spd e principalmente Spm na parede celular de tecido em divisão (Pistochi *et al.*, 1987).



**Figura 2.** Efeito da fonte de carbono e fitorreguladores suplementados ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) em suspensões celulares de *A. angustifolia*. (A,B,C) Put, Spd e Spm Livre, (D,E,F) Put, Spd e Spm Conjugada. Tratamentos: **SF** (BM + sacarose (3%) + 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ )); **S** (BM +sacarose (3%)), **MF** (BM + maltose (3%) + 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ )); **M** (BM + maltose (3%)); **CF** (BM + 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ )); **CMS** (BM).



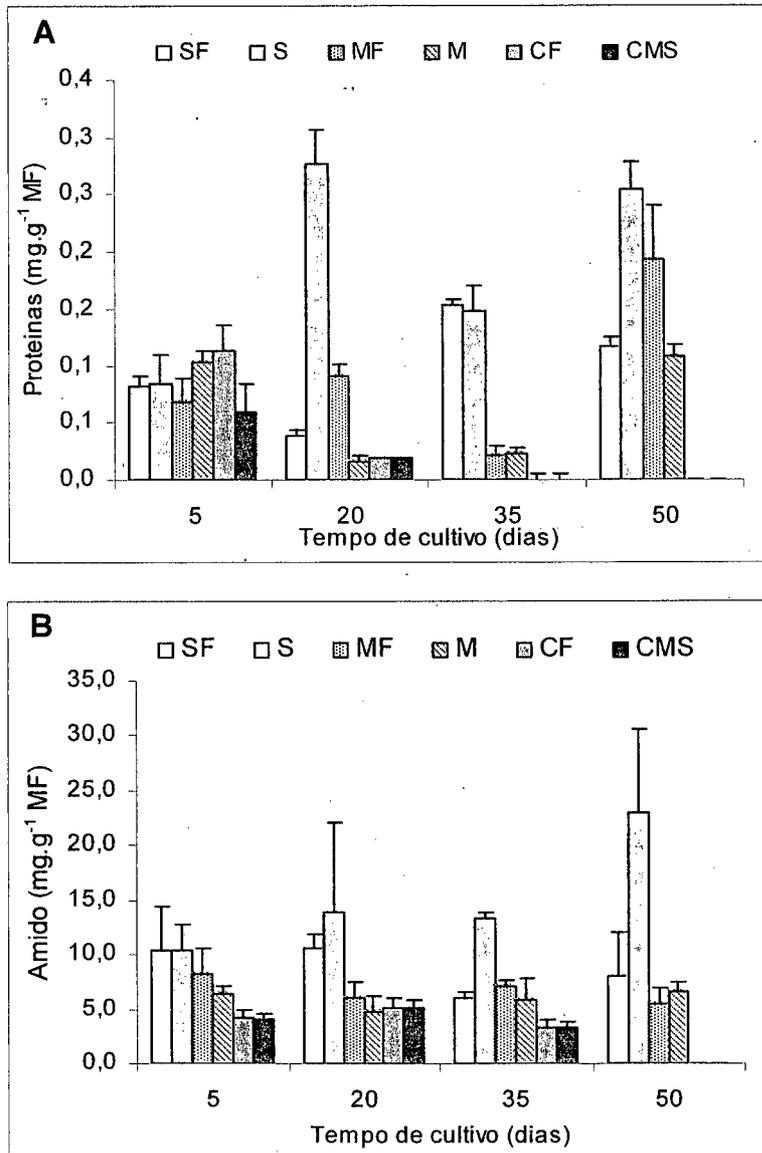
**Figura 3.** Efeito da fonte de carbono e fitorreguladores suplementados ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo de PAs em suspensões celulares de *A. angustifolia*. (A) PAs totais (B) Razão  $[\text{Put.}(\text{Spd}+\text{Spm})]^{-1}$ . Tratamentos: **SF** (BM + sacarose (3%) + 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ )); **S** (BM +sacarose (3%)), **MF** (BM +maltose (3%) + 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ )); **M** (BM + maltose (3%)); **CF** (BM + 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ )); **CMS** (BM).

### 3.3.3. Proteínas e Amido

As culturas suplementadas com sacarose (S) com adição de fitorreguladores (SF) e com maltose e fitorreguladores (MF) apresentaram os maiores conteúdos de amido e proteínas durante todo o período de cultivo (Figura 4 A e B). O conteúdo de proteínas e amido destas culturas podem ser relacionados coma alta atividade mitótica, já que estes tratamentos apresentaram o maior incremento de volume celular sedimentado. Prévios estudos relacionando a atividade mitótica de suspensões celulares de *A. angustifolia* relataram que as culturas embriogênicas em meio líquido apresentam uma curva de crescimento típica, constituída pela fase inicial, exponencial, linear e estacionária, sendo observado o maior valor de índice mitótico (12,2%) na fase de crescimento exponencial (Steiner et al., 1999). Segundo Neumann, (2000), a intensa divisão celular é associada à síntese de proteínas. Em suspensões celulares de cenoura, culturas embriogênicas com e sem suplementação de fitorreguladores apresentaram incremento no conteúdo de proteínas no final fase lag e especialmente durante a fase exponencial que corresponde à fase de ativa divisão celular.

Em *Larix leptoeuropaea* foi observado um incremento no conteúdo de proteínas nos primeiros dias de cultivo seguido por um decréscimo nas semanas seguintes (Gutmann et al., 1996). O ciclo celular é acompanhado pela síntese de proteínas que são acompanhadas de mudanças bioquímicas e morfológicas na célula durante a atividade mitótica. No meio de cultura isento de fitorreguladores (S) os conteúdos de proteínas e amido foram incrementados no inicio do cultivo com posterior decréscimo, seguido de aumento no final do cultivo (Figura 4). Suspensões celulares de *Pinus taeda* cultivadas em meio isento de fitorreguladores (Silveira et al., 2004b) apresentaram padrões de acúmulo de amido e proteínas similares àqueles observados no presente trabalho. É bem estabelecido que o processo de divisão celular demanda alto conteúdo de carbono como suprimento de ATP necessário para o metabolismo celular (Martin et al., 2000). As culturas dos tratamentos M e CMS, os quais não apresentaram incremento celular (Figura 1A)

tiveram o conteúdo de amido reduzido ao longo do período de cultivo, indicando o consumo de reservas celulares endógenas e posterior degradação celular.



**Figura 4.** Efeito da fonte de carbono e fitoreguladores suplementados ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo de proteínas e amido em suspensões celulares de *A. angustifolia*. (A) Proteína (B) Amido. Tratamentos: **SF** (BM + sacarose (3%) + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); **S** (BM + sacarose (3%)), **MF** (BM + maltose (3%) + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); **M** (BM + maltose (3%)); **CF** (BM + 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)); **CMS** (BM).

**CAPITULO III**

**PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIQUÍMICOS DURANTE A EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA E  
MATURAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia***

#### 4.1. INTRODUÇÃO

O processo de maturação das culturas embriogênicas inicia com o desenvolvimento dos embriões e termina com a dessecação antes da germinação. Para que ocorra completa maturação é necessário que tanto a maturidade morfológica quanto a fisiológica sejam estabelecidas. O desenvolvimento morfológico dos embriões somáticos não garante um satisfatório desenvolvimento pós-embriogênico sem que as condições fisiológicas sejam alcançadas (von Arnold, 2002).

Durante a última década, foram observados muitos avanços no conhecimento da embriogênese somática em coníferas. Entretanto, a maturação de embriões somáticos e a regeneração de plantas ainda são problemas para muitas espécies (Stasolla & Yeung, 2003). Nos últimos anos, a otimização do meio de cultura de maturação está baseada em reproduzir as condições que operam durante a embriogênese zigótica. Recentemente, muitos trabalhos têm sido conduzidos envolvendo a seleção do tipo e a concentração de fitorreguladores, especialmente o ácido abscísico, e componentes relacionados ao ajustamento do potencial osmótico do meio de cultura (Lipavska & Konrádová, 2004).

No presente trabalho foram determinados o efeito do ABA e fontes de carbono adicionadas ao meio de cultura, na morfologia, multiplicação e conteúdo endógeno de proteínas, amido, AIA e ABA durante a maturação das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. Além disso, foram analisados os conteúdos de proteína e amido durante diferentes estágios do desenvolvimento do embrião zigótico desta espécie, visando estabelecer padrões de similaridade para a otimização de meios de cultura.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Material vegetal

Foram utilizadas culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, induzidas e estabilizadas no período 2002/2003, segundo Steiner *et al.* (2004). As culturas foram mantidas em ciclos repetitivos de divisão celular, em meio de cultura BM (Gupta & Pulmann, 1991) suplementado ou não com 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP (0,5 $\mu$ M) e Kin (0,5 $\mu$ M).

### 4.2.2. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado baseou-se na formulação salina BM (Gupta & Pullman, 1991) acrescida de PEG 4000 (7%), carvão ativado 1,5 g.L<sup>-1</sup> e phytigel® (2,0 g.L<sup>-1</sup>). A L-glutamina (1 g.L<sup>-1</sup>), mio-inositol (1 g.L<sup>-1</sup>), caseína hidrolisada (0,5 g.L<sup>-1</sup>) e o ABA foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7. Foram testados tratamentos, com variação para fonte de carbono maltose (6 e 9 %) ou sacarose (6 e 9%) e para suplementação com ABA (0, 150 e 200 $\mu$ M) (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento de suspensões celulares de *A. angustifolia*.

Formulação Salina BM (Gupta & Pullman, 1991)							
Denominação do Tratamento	PEG (7%) + carvão ativado (1,5 g.L <sup>-1</sup> )						
	Fonte de carbono				ABA		
	Maltose 6%	Maltose 9%	Sacarose 6%	Sacarose 9%	0µM	150µM	200µM
M6A0	X	-	-	-	X	-	-
M6A150	X	-	-	-	-	X	-
M6A200	X	-	-	-	-	-	X
S6A0	-	-	X	-	X	-	-
S6A150	-	-	X	-	-	X	-
S6A200	-	-	X	-	-	-	X
M9A0	-	X	-	-	X	-	-
M9A150	-	X	-	-	-	X	-
M9A200	-	X	-	-	-	-	X
S9A0	-	-	-	X	X	-	-
S9A150	-	-	-	X	-	X	-
S9A200	-	-	-	X	-	-	X

\*(x) = presença; (-) = ausência

#### 4.2.3. Condições de cultura *in vitro*

Para cada tratamento foram inoculadas duas placas de petri contendo 20 mL de meio de cultura com três colônias de 500 mg de matéria fresca. Após a inoculação, os frascos com as culturas foram incubados no escuro com temperatura de 25±2°C. Para a análise bioquímica foram coletadas amostras celulares de todos os tratamentos no final do período de cultivo aos 60 dias. Estas foram armazenadas em freezer (-20°C) para as posteriores análises bioquímicas.

#### 4.2.4. Análise histológica e citoquímica

A análise citoquímica foi realizada utilizando a dupla coloração com carmim acético e azul de Evans (Durzan, 1988). Para 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 horas, à temperatura de 4 °C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, duas vezes, por

quinze minutos (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 horas; 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 horas (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, foram colocados diretamente nas lâminas sobre gotas de água destilada e desidratados em placa aquecedora a 37 °C, por trinta minutos. 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 anilina (AA). As lâminas semipermanentes foram coradas em solução aquosa a 0,1% de AA, acidificada com HCL 1N (Bouzon, 1993).

#### **4.2.5. Determinação de AIA e ABA**

Amostras de 500 mg de matéria fresca (MF) das culturas embriogênicas de todos os tratamentos foram analisadas. A metodologia para extração e determinação do AIA e ABA encontra-se descrita no item 2.2.7 do capítulo I.

#### **4.2.6. Determinação de proteínas e amido**

Foram utilizadas amostras de 200 mg de culturas embriogênicas de todos os tratamentos. A metodologia para extração e dosagem de amido e proteínas encontra-se descrita no item 2.2.4 e 2.2.5 no capítulo I.

#### **4.2.7. Incremento da matéria fresca (MF) e determinação da matéria seca (MS)**

O dados de multiplicação celular foram analisados por comparação entre a MF inicial de 500 mg por colônia, e a MF ao final do período de cultivo. As culturas embriogênicas foram pesadas após o termino do experimento de maturação. Antes da pesagem as colônias foram submetidas à análise morfológica. Os dados foram representados pela média do peso de três colônias de cada repetição.

Para obtenção da MS, três amostras (200 mg de MF) de culturas embriogênicas de cada tratamento de multiplicação foram mantidas a 70 °C, durante 72 horas. Os dados de MS foram expressos em porcentagem da MF inicial utilizando a equação  $MS\% = (MS/MF) * 100$ .

#### **4.2.8. Estratégia experimental e análise estatística**

O experimento foi conduzido em blocos completamente casualizados. A análise bioquímica foi realizada em duplicata para cada tratamento. Os dados estão representados através das médias e desvio padrão. Para o conteúdo de AIA e ABA os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de separação de médias SNK (SOKAL e ROHLF, 1995) com auxílio do programa Statgraphics® 7.0.

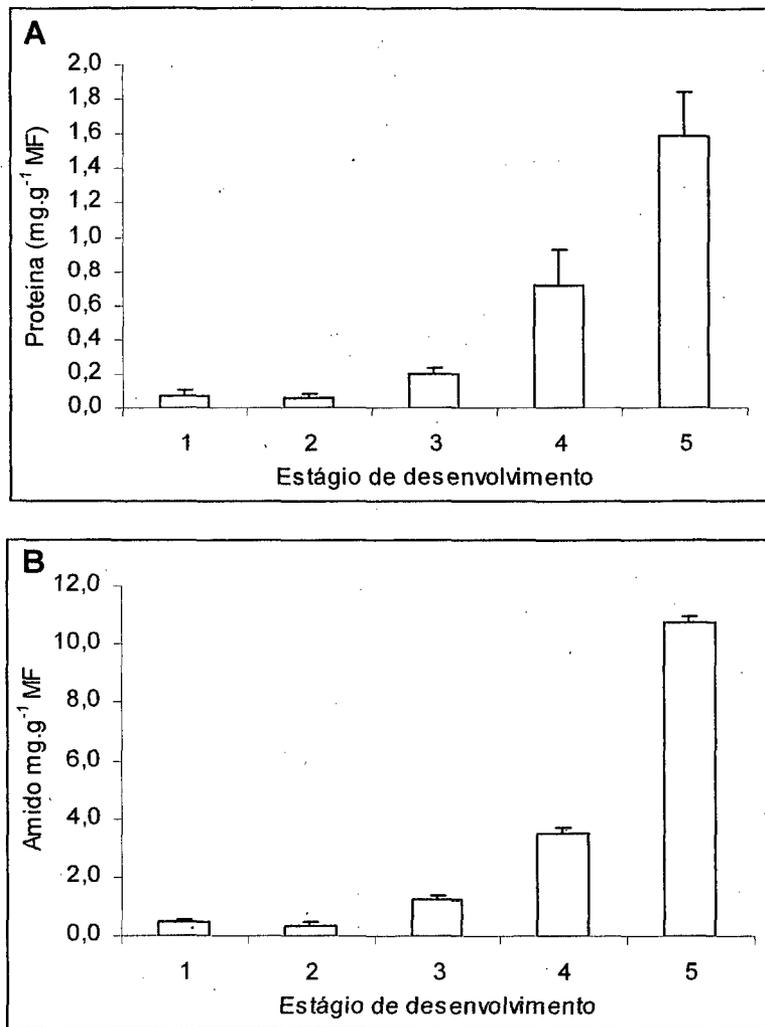
### **4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.3.1. Proteínas e amido durante a embriogênese zigótica**

O objetivo de estudar o desenvolvimento do embrião zigótico foi obter referências do acúmulo de proteínas e amido durante o desenvolvimento para promover a embriogênese somática baseado no grau de similaridade entre os dois processos. Os conteúdos de proteína e amido apresentaram o mesmo padrão de variação durante os diferentes estágios de

desenvolvimento dos embriões zigóticos de *A. angustifolia*. Foram observados, os menores conteúdos de proteínas e amido nos estágios iniciais do desenvolvimento com posterior incremento até o estágio maduro (Figura 1). Segundo von Arnold (2002), o início da embriogênese é caracterizado por intensa atividade mitótica e o final pelo processo de diferenciação e acúmulo de substâncias de reserva.

No presente trabalho, o conteúdo de proteínas foi maior nos estágios cotiledonar e maduro com 0,71 e 1,59 mg.g<sup>-1</sup>MF, respectivamente. O incremento de proteínas foi acompanhado pelo incremento de amido com 3,59 mg.g<sup>-1</sup> MF no estágio cotiledonar e 10,77 mg.g<sup>-1</sup> MF no estágio maduro (Figura 1). Variações no conteúdo de amido e proteínas correlacionados aos diferentes estágios de desenvolvimento podem constituir marcadores que caracterizam as diferentes fases embriogênicas. A análise comparativa durante a embriogênese zigótica e somática de *Persea americana* (Mill.) revelou que durante as fases iniciais da embriogênese o conteúdo de hexoses foi alto declinando com o avanço no desenvolvimento. Já os conteúdos de sacarose e amido apresentavam o padrão de acúmulo oposto, com baixo conteúdo no início do desenvolvimento e progressivo incremento durante a maturação do embrião. Assim, estes autores caracterizaram a fase de maturação nesta espécie como a transição da alta razão hexose/sacarose para a baixa razão hexose/sacarose. Ainda, foi observado o acúmulo do conteúdo de proteína durante a maturação representando 83% do conteúdo de proteínas totais (Sánchez-Romero *et al.*, 2002). Assim, o acúmulo de proteínas ocorre de maneira seqüencial e específica e pode ser um indicador referencial do desenvolvimento do embrião (Pullman *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Teores de proteínas (A) e amido (B) nos diferentes estágios de desenvolvimento embrião zigótico de *A. angustifolia*. 1- pró-embrião; 2- globular; 3- pré-cotiledonar; 4- cotiledonar; 5-maduro. Os dados estão representados pela média e desvio padrão.

#### 4.3.2. Desenvolvimento dos embriões somáticos

Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* originadas em meio de cultura indutivo suplementado ou não com 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ ) foram responsivas aos tratamentos de maturação (Figura 3a). Aos 60 dias de cultivo foram observadas diferenças significativas na morfologia das culturas embriogênicas em diferentes tratamentos de maturação (Figura 2).

A concentração e o tipo da fonte de carbono, assim como as concentrações de ABA influenciaram significativamente o desenvolvimento dos embriões somáticos em *A. angustifolia*.

meio de germinação foi observada a gradativa necrose dos tecidos sem que os posteriores estágios de desenvolvimento fossem observados.

Existem muitos fatores envolvidos na maturação de embriões somáticos, como potencial osmótico do meio de cultura, presença de ABA, fonte de carbono e reguladores de crescimento (Jain & Ishii, 1998). Nogard (1997) relatou a superioridade da maltose sobre a sacarose como fonte de carbono na maturação de embriões somáticos em *Abies normandia*, que segundo Blanc (2002), deve-se ao metabolismo envolvido na hidrólise da maltose comparativamente as demais fontes de carbono. Em culturas embriogênicas de *Hevea brasiliensis* a maltose, comparativamente aos demais açúcares, estimulou a formação de embriões somáticos (Blanc *et al.*, 1999; Blanc *et al.*, 2002).

Além disso, a combinação de maltose e PEG também promoveram a progressão para estágios tardios da embriogênese em *Pinus taeda* (Li *et al.*, 1998) e *Pinus pinaster* (Ramarosandratana *et al.*, 2001). O PEG provoca estresse na célula com conseqüente perda de água (Svobodová *et al.*, 1999). O estresse osmótico induzido pelo PEG *in vitro* é o que mais se aproxima do estresse observado nas células do embrião durante o desenvolvimento da semente em condições naturais (Rains, 1989). Isto porque o PEG é constituído de moléculas grandes, que não atravessam a parede celular aumentando o potencial osmótico do meio de cultura (von Arnold, 2002; Stasolla *et al.*, 2003). Find (1997), observou que este composto provocou redução no tamanho e no espaço intercelular dos embriões somáticos de *Picea abies*.

Alguns estudos propõem que carboidratos suplementados ao meio de cultura podem ativar múltiplas rotas incluindo a histodiferenciação dos embriões somáticos por meio da regulação direta da expressão gênica (von Arnold, 1995; Lipavska *et al.*, 2000). Outros autores (Finkelstein & Gibson, 2001; Sheen & Leon, 2003) sugeriram que alguns açúcares podem ativar rotas metabólicas de síntese de ABA, contudo esta rota pode ser inibida pela síntese de etileno (Gazzarrini & McCourt, 2001). A suplementação do meio de cultura de maturação com ABA foi relatada para várias espécies de coníferas incluindo os gêneros *Picea*, *Larix* e *Pinus* (Stassola &

meio de germinação foi observada a gradativa necrose dos tecidos sem que os posteriores estágios de desenvolvimento fossem observados.

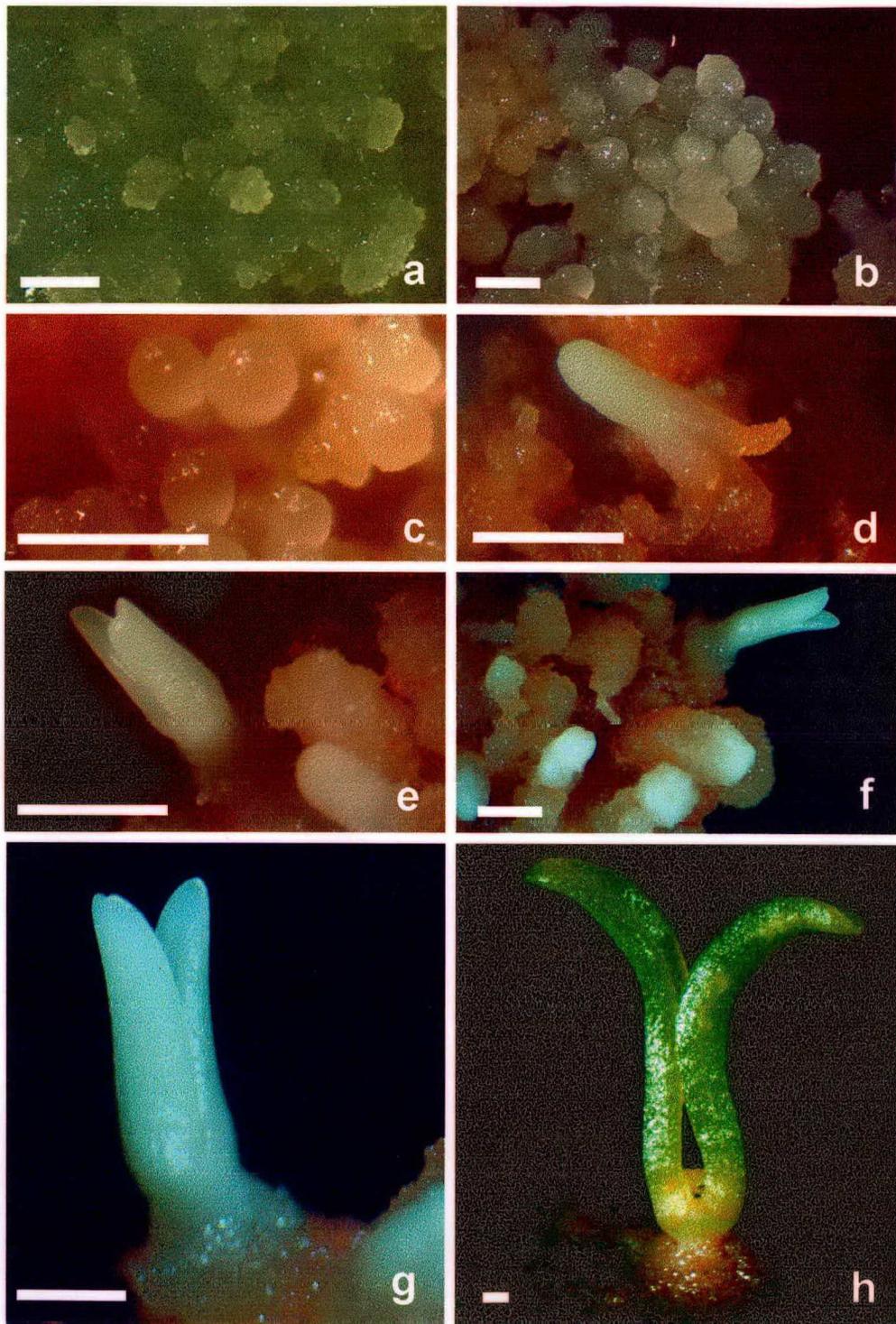
Existem muitos fatores envolvidos na maturação de embriões somáticos, como potencial osmótico do meio de cultura, presença de ABA, fonte de carbono e reguladores de crescimento (Jain & Ishii, 1998). Nogard (1997) relatou a superioridade da maltose sobre a sacarose como fonte de carbono na maturação de embriões somáticos em *Abies normandia*, que segundo Blanc (2002), deve-se ao metabolismo envolvido na hidrólise da maltose comparativamente as demais fontes de carbono. Em culturas embriogênicas de *Hevea brasiliensis* a maltose, comparativamente aos demais açúcares, estimulou a formação de embriões somáticos (Blanc *et al.*, 1999; Blanc *et al.*, 2002).

Além disso, a combinação de maltose e PEG também promoveram a progressão para estágios tardios da embriogênese em *Pinus taeda* (Li *et al.*, 1998) e *Pinus pinaster* (Ramarosandratana *et al.*, 2001). O PEG provoca estresse na célula com conseqüente perda de água (Svobodová *et al.*, 1999). O estresse osmótico induzido pelo PEG *in vitro* é o que mais se aproxima do estresse observado nas células do embrião durante o desenvolvimento da semente em condições naturais (Rains, 1989). Isto porque o PEG é constituído de moléculas grandes, que não atravessam a parede celular aumentando o potencial osmótico do meio de cultura (von Arnold, 2002; Stasolla *et al.*, 2003). Find (1997), observou que este composto provocou redução no tamanho e no espaço intercelular dos embriões somáticos de *Picea abies*.

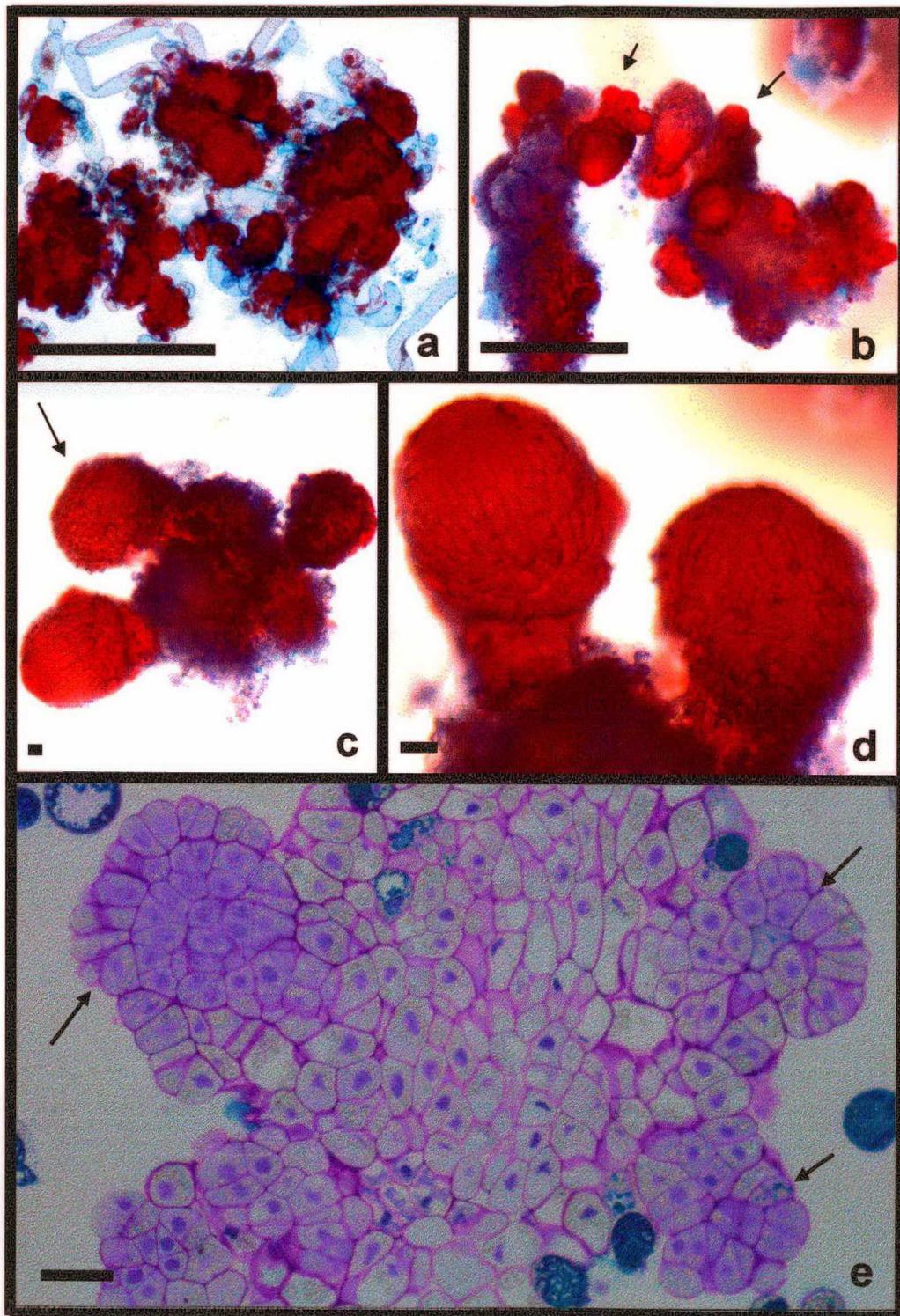
Alguns estudos propõem que carboidratos suplementados ao meio de cultura podem ativar múltiplas rotas incluindo a histodiferenciação dos embriões somáticos por meio da regulação direta da expressão gênica (von Arnold, 1995; Lipavska *et al.*, 2000). Outros autores (Finkelstein & Gibson, 2001; Sheen & Leon, 2003) sugeriram que alguns açúcares podem ativar rotas metabólicas de síntese de ABA, contudo esta rota pode ser inibida pela síntese de etileno (Gazzarrini & McCourt, 2001). A suplementação do meio de cultura de maturação com ABA foi relatada para várias espécies de coníferas incluindo os gêneros *Picea*, *Larix* e *Pinus* (Stassola &

Young, 2003). Alguns autores propõem que o suprimento exógeno de ABA restringe a proliferação dos tecidos e inicia o crescimento do embrião através da biossíntese de nucleotídeos (Ashihara *et al.*, 2001).

Os estágios iniciais da embriogênese somática são cruciais para que as demais etapas do desenvolvimento sejam estabelecidas. Em *Picea abies*, o processo de transição das culturas embriogênicas com diferentes graus de organização morfológica para embriões completos apresentou diferenças no número e a qualidade dos embriões somáticos formados (Filonova *et al.*, 2000). Contudo, no presente trabalho observou-se o desenvolvimento de embriões somáticos a partir de culturas embriogênicas com diferentes graus de organização morfológica. Observou-se também que a suplementação do meio de cultura com maltose foi fundamental para a reorganização morfológica e histodiferenciação das culturas embriogênicas. Além disso, a combinação da maltose e ABA conduziram as células embriogênicas competentes ao desenvolvimento de embriões somáticos cotiledonares.



**Figura 2.** Efeito dos diferentes tratamentos de maturação nas culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. a) cultura embriogênica em meio de cultura com sacarose (9%) e ABA ( $150\mu\text{M}$ ) com aspecto granular e embriões somáticos com a superfície rugosa; b) cultura embriogênica em meio de cultura com maltose (9%) e ABA ( $150\mu\text{M}$ ); c,d) embriões somáticos globulares na superfície da cultura embriogênica; e,f) embriões somáticos globulares, torpedo e cotiledonares na superfície da cultura embriogênica; g) embrião somático cotiledonar; h) embrião somático com cotilédones clorofilados em meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) suplementado com carvão ativado  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ . (Barras = 1mm).



**Figura 3.** Análise citoquímica e histológica durante a maturação das culturas embriogênicas *A. angustifolia*. a) padrão morfológico da cultura embriogênica antes de ser submetida aos tratamentos de maturação b) embriões somáticos na superfície da cultura embriogênica em meio de cultura com maltose (9%) e ABA (150 $\mu$ M); c,d) embriões somáticos globulares na superfície da cultura embriogênica reativos ao carmim acético; e) embriões somáticos globulares na superfície da cultura embriogênica evidenciando a formação da protoderme. (Barras a,b=1mm; c=125 $\mu$ m; d=50 $\mu$ m; e=25  $\mu$ m).

#### 4.3.3. Incremento da Matéria Fresca (MF) e Matéria seca (MS)

Durante o estágio de maturação, os embriões somáticos sofrem várias mudanças morfológicas e bioquímicas (von Arnold, 2002). Quando os embriões são submetidos a este processo, a proliferação celular diminui, iniciando-se o processo de diferenciação e acúmulo de materiais de reserva como açúcares, proteínas e lipídios (Stassola & Yeung, 2003).

No presente trabalho, independente da concentração de ABA utilizada a concentração da fonte de carbono influenciou diretamente o incremento da MF das culturas embriogênicas. A suplementação do meio de cultura com sacarose (6%) ou maltose (6%) promoveu uma maior multiplicação celular e um menor acúmulo de matéria seca. Ao contrário, aqueles tratamentos suplementados com sacarose (9%) ou maltose (9%), apresentaram uma redução da proliferação das culturas um maior incremento de matéria seca (Figura 4).

A redução do crescimento em experimentos de maturação é uma característica associada à formação de embriões somáticos. Isto porque ocorre uma redução na proliferação celular e o processo de diferenciação é iniciado. Isto foi confirmado com o incremento no conteúdo de MS observado principalmente nos tratamentos suplementados com sacarose (9%) ou maltose (9%), os quais apresentavam os maiores graus de diferenciação. Tem sido apontado que a diferenciação é acompanhada pelo acúmulo de substâncias de reserva que são de vital importância para suprir as necessidades do embrião durante a germinação e crescimento inicial da planta (Bewley & Black, 1994).

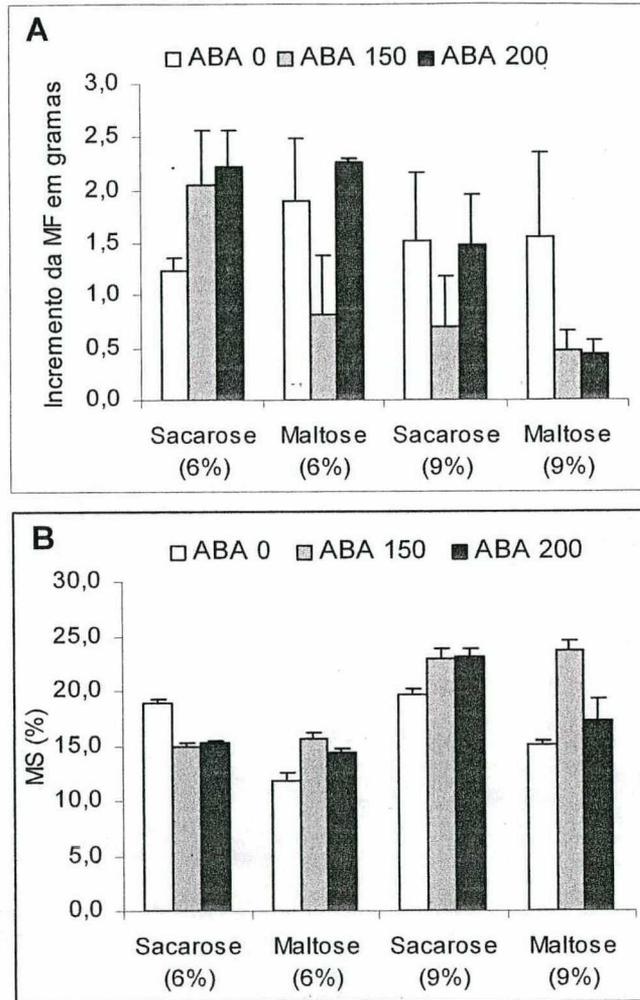


Figura 4. (A) Incremento da MF em grammas; (B) matéria seca (MS) das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas aos diferentes tratamentos de maturação. Os dados estão representados pela média e desvio padrão.

#### 4.3.4. Proteínas e amido

Os maiores conteúdos de proteínas foram observados quando o meio de cultura foi suplementado com maltose (9%), independente da concentração de ABA. Nas culturas provenientes do meio de cultura isento de fitorreguladores o conteúdo de proteínas foi maior quando o meio de cultura foi suplementado com maltose (9%) e ABA (0 e 150  $\mu\text{M}$ ) (Figura 5A). Contudo, naquelas culturas provenientes do meio de cultura suplementado com fitorreguladores, os maiores conteúdos de proteína foram observados no meio de cultura suplementado com

maltose (9%) e ABA (200 $\mu$ M) (Figura 5C). Apesar do conteúdo de proteínas ser similar nestes três tratamentos, o tratamento que apresentou as melhores respostas morfogênicas foi aquele constituído por maltose (9%) e ABA (150  $\mu$ M), no qual embriões somáticos cotiledonares foram observados.

Em relação ao conteúdo de amido foram observados os maiores valores em resposta aos meios de cultura suplementados com maltose e sacarose (9%) comparativamente aos valores observados em resposta à concentração de 6% (Figura 5B,D). Culturas proveniente dos meios de cultura isentos de fitorreguladores apresentaram conteúdos de amido similares, em resposta aos meios de cultura suplementados com maltose (9%) ou sacarose (9%) combinados com ABA (150 e 200 $\mu$ M). Iraqui & Tremblay (2001), trabalhando com *Picea mariana* e *Picea glauca* observaram um incremento de amido superior em meio de cultura suplementados com sacarose em relação aos meios de cultura suplementados diretamente com frutose ou glucose. Estes autores concluíram que, comparativamente à glucose e à frutose a adição de sacarose no meio de cultura é rapidamente hidrolisada e convertida em amido, conforme observado também no presente trabalho. Apesar disso, a suplementação do meio de cultura com sacarose (9%) não promoveu a síntese de proteínas. Isto pode estar relacionado à ausência de embriões somáticos em estágios tardios de desenvolvimento em resposta a estes tratamentos.

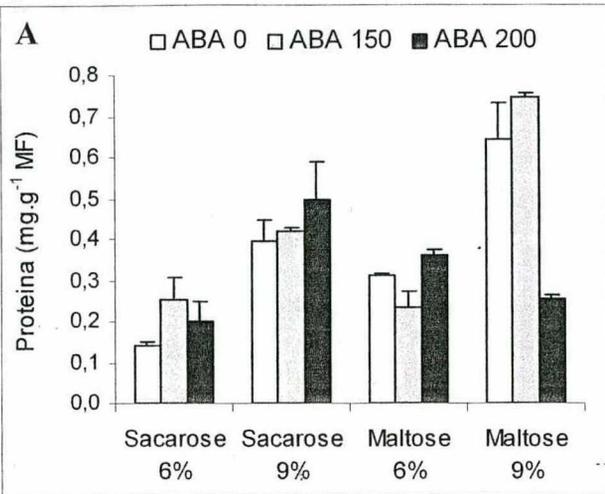
Em *Picea abies*, durante o desenvolvimento de embriões somáticos, foi observado o acúmulo paralelo de amido e proteínas nos estágios tardios de desenvolvimento (Lipasvská *et al.*, 2000) sendo este padrão similar aquele observado nos embriões zigóticos desta espécie (Gosslová *et al.*, 2001). De acordo com Cyr *et al.* (1987), o conteúdo de proteínas dos pró-embriões e embriões em estágio globular é similar. A transição do estágio globular para torpedo é completada com a polarização do embrião e a diferenciação do procâmbio; já a transição do estágio torpedo para embrião maduro é acompanhada de intensivo crescimento, incremento no tamanho das células e formação dos elementos vasculares (Cyr *et al.*, 1987). Em cenoura, o conteúdo de proteínas no estágio torpedo foi duas vezes superior aos valores observados no

estágio globular e o padrão de proteínas solúveis foi associado ao incremento no conteúdo de amido das células (Zee & Wu, 1979).

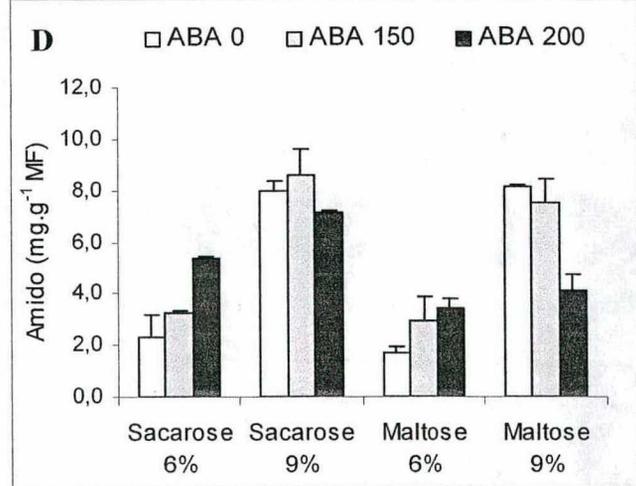
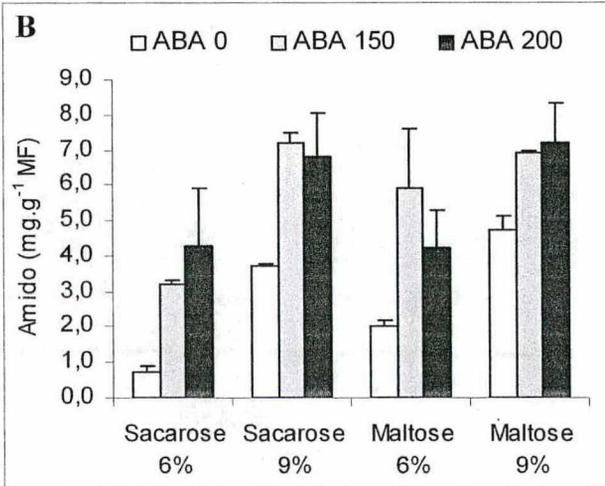
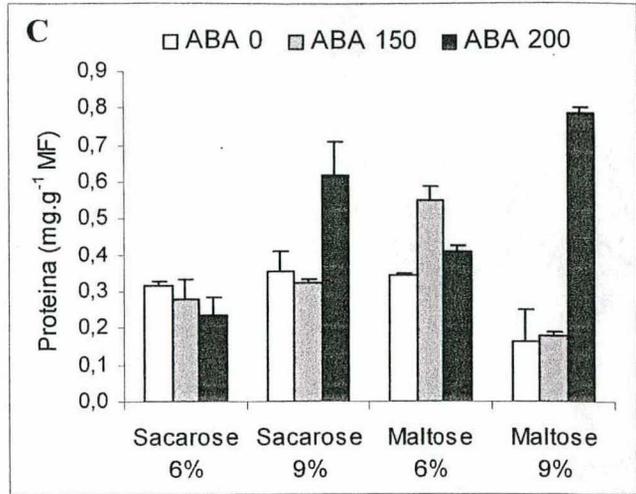
Para embriões somáticos de coníferas, substâncias de reserva como lipídios e proteínas desempenham um importante papel durante o desenvolvimento e, a sua síntese e acúmulo pode ser dependente do genótipo, assim como, das condições de cultivo (Lipasvská & Konrádová, 2004). No presente trabalho, a combinação da maltose (9%) com o ABA (150) foi específica para o desenvolvimento dos embriões somáticos e altos conteúdos de amido e proteínas foram observados paralelamente (Figura 5A).

O metabolismo da maltose é o sinal bioquímico que pode levar a célula à formação de embriões somáticos (Blanc 2002). A lenta hidrólise da maltose seria responsável pela queda no conteúdo de açúcar na célula sinalizando para a síntese de proteínas. Isto explicaria os resultados observados no presente trabalho. Além disso, segundo Yu *et al.* (1991), um dos efeitos conhecidos do baixo conteúdo de hexoses é a síntese de alfa-amilase e o estímulo do catabolismo de amido, o qual parece ser um pré-requisito para a formação de órgãos e o desenvolvimento de embriões somáticos (Wurtele *et al.*, 1988). Os carboidratos fornecem os esqueletos carbônicos necessários para a biossíntese de proteínas (Weber *et al.*, 1997), deixando claro a conexão existente entre metabolismo de carboidratos e síntese de proteínas. Sugerem-se a existência de genes chaves envolvidos na distribuição do carbono para a síntese de proteínas e amido (Motto *et al.*, 1997).

## Ausência de fitorreguladores



## Presença de fitorreguladores



**Figura 5.** Efeito dos diferentes tratamentos de maturação no conteúdo endógeno de proteínas e amido em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* provenientes de dois tratamentos de multiplicação. (A, B) Proteínas e Amido nas culturas embriogênicas provenientes do meio de cultura isento de fitorreguladores; (C,D) Proteínas e Amido nas culturas embriogênicas provenientes do meio de cultura suplementado com 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M). Os dados estão representados pela média e desvio padrão.

#### 4.3.5. AIA E ABA

O conteúdo endógeno de AIA e ABA foi analisado somente nas culturas suplementadas com maltose e sacarose (9%) combinada com ABA (0, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ), as quais fenotipicamente apresentaram as melhores respostas morfogênicas. O conteúdo endógeno de AIA e ABA foi influenciado significativamente pelos diferentes tratamentos de maturação (Tabela 2). A suplementação exógena de ABA ao meio de cultura promoveu um incremento do conteúdo endógeno de ABA, e o maior conteúdo de AIA foi observado quando o meio de cultura foi suplementado com ABA (150  $\mu\text{M}$ ) e maltose (9%) (Tabela 2).

Estudos conduzidos por Kong *et al.*, (1997), em *Picea glauca* revelaram que comparado ao embrião somático o desenvolvimento da semente apresentava altos conteúdos endógenos de ABA. A principal diferença era atribuída à presença do megagametófito na semente, a qual era a maior fonte de ABA para o desenvolvimento dos embriões zigóticos (Kong *et al.*, 1999). Assim, o suprimento exógeno de ABA para o desenvolvimento normal do embrião deve levar em conta a espécie e/ou genótipo.

O processo de maturação de embriões somáticos em coníferas em geral é estimulado pela presença de ABA, ao qual é atribuída a inibição da clivagem poliembrionária, permitindo então a individualização do embrião, posterior desenvolvimento e maturação (Gupta *et al.*, 1993). Também é atribuído a este fitorregulador a regulação da síntese e deposição de substâncias de reserva (Dodeman *et al.*, 1997) controle da expansão celular (Gutmann *et al.*, 1996) e biossíntese de triacilgliceróis (Tautorius *et al.*, 1991).

**Tabela 2.** Efeito dos tratamentos de maturação no conteúdo endógeno de AIA e ABA das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*

Tratamentos					Hormônios	
Sacarose (9% p/v)	Maltose (9% p/v)	ABA ( $\mu\text{M}$ )			AIA $\text{ng.g}^{-1}$ MF	ABA $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF
		0	150	200		
X	-	X	-	-	86,60 b	0,16 c
-	X	X	-	-	43,70 cb	0,18 c
X	-	-	X	-	74,18 b	143,51 b
-	X	-	X	-	274,85 a	203,38 a
X	-	-	-	X	25,44 c	181,81 a
-	X	-	-	X	164,36 a	199,69 a
Média					111,52	121,50
C.V. (%) <sup>1</sup>					9,30	2,80

(x) presença; (-) ausência. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>Dados transformados para  $\log(x+2)$ .

**Tabela 3.** Efeito da suplementação de ABA no conteúdo endógeno de AIA e ABA durante a maturação das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

ABA ( $\mu\text{M}$ )	AIA $\text{ng.g}^{-1}$ MF	ABA $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF
0	65,15 b	0,17 b
150	174,52 a	173,44 a
200	94,90 ab	190,75 a
Média	111,52	121,50
C.V. (%) <sup>1</sup>	18,40	4,03

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>Dados transformados para  $\log(x+2)$ .

**Tabela 4.** Efeito da suplementação de sacarose e maltose (9%) no conteúdo endógeno de AIA e ABA durante a maturação das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*

Fonte de carbono	AIA ng.g <sup>-1</sup> MF	ABA µg.g <sup>-1</sup> MF
Sacarose (9%)	62,7 b	108,49 a
Maltose (9%)	160,97 a	134,42 a
Média	111,52	121,50
C.V. (%) <sup>1</sup>	17,40	4,35

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>Dados transformados para log (x+2).

**Tabela 5.** Efeito da presença de fitorreguladores durante a multiplicação no conteúdo endógeno de AIA e ABA durante a maturação das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

Origem	AIA ng.g <sup>-1</sup> MF	ABA µg.g <sup>-1</sup> MF
-	131,07 a	113,63 a
2µM 2,4-D +0,5µM de BAP e Kin	91,98 a	129,28 a
Média	111,52	121,50
C.V. (%) <sup>1</sup>	19,80	58,70

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>Dados transformados para log (x+2).

Analisando separadamente os efeitos da adição de ABA (tabela 3), fonte de carbono (Tabela 4) e origem da cultura (Tabela 5) observou-se que estas substâncias apresentaram efeito significativo no conteúdo endógeno de AIA e ABA. Maior conteúdo de ABA e AIA foi observado em culturas embriogênicas suplementadas com maltose comparativamente aquelas suplementadas com sacarose (Tabela 4). A suplementação de ABA (150 µM) ao meio de cultura promoveu acúmulo significativo de AIA endógeno. Já o conteúdo endógeno de ABA apresentou uma menor variação, porém foi observado que no meio de cultura isento da adição exógena de ABA conteúdos endógenos de ABA foram observados (Tabela 3). León & Sheen (2003), sugeriram que a biossíntese de ABA pode ser estimulada pelo metabolismo de açúcares durante

o desenvolvimento de embriões de *Arabidopsis*. Em coníferas, o ABA foi o principal regulador de crescimento, contudo, para muitas espécies a resposta de maturação foi otimizada combinando ABA com suplementos osmóticos como o PEG (Attree *et al.*, 1991; Etienne *et al.*, 1993) e ou elevadas concentrações de açúcares (Roberts *et al.*, 1990).

Em *A. angustifolia* embriões somáticos pré-cotiledonares foram obtidos em meio de cultura suplementados com PEG e Maltose (9%) na ausência de ABA (Santos *et al.*, 2002). Contudo, no presente trabalho, a suplementação do meio de cultura com PEG (7%) maltose (9%) e ABA (150  $\mu$ M) permitiu a formação de embriões somáticos cotiledonares, porém em baixa frequência. Neste caso o ABA permitiu a progressão dos embriões somáticos para o estágio cotiledonar de desenvolvimento. Os altos valores endógenos de AIA observados nestas culturas podem ser um fator limitante para o normal desenvolvimento dos embriões em estágios posteriores. Adicionalmente mesmo aquelas culturas embriogênicas multiplicadas em meio de cultura isento de fitorreguladores não apresentaram um conteúdo significativamente menor de AIA (Tabela 6).

As auxinas são essenciais para a indução do crescimento embriogênico, porém, podem inibir o processo de maturação (Neumann, 2000). Valores elevados no conteúdo de AIA foram observados em estágios iniciais da embriogênese de *D. carota* (Ribnicky *et al.*, 2002) e *A. angustifolia* (Astarita *et al.*, 2003a). O transporte polar de auxinas é importante para formação inicial dos embriões somáticos que é também um período em que ocorre uma intensa divisão celular. As células ricas em citoplasma em divisão celular resultam em intensiva síntese de proteínas (Nomura & Komamine, 1995; Grieb *et al.*, 1997), resultando na polarização das células embriogênicas competentes (Halperin & Jensen, 1967). Porém, os estágios tardios da embriogênese somática em *D. carota* foram inibidos pela presença de 2,4-D no meio de cultura. A maturação dos embriões ocorreu quando os embriões foram removidos para o meio de cultura livre de auxinas (Fujimura & Komamine, 1979).

Segundo Fehér *et al.* (2003), em muitos casos o processo de desdiferenciação é ativado por algum tipo de estresse no meio de cultura no qual as auxinas estão incluídas. Assim as auxinas estariam associadas à capacidade embriogênica das culturas. Este autor também sugere

que a resposta morfogênica de células competentes à suplementação exógena de ABA só é observado quando o conteúdo endógeno de AIA é alto. Isto foi verificado em cenoura, quando embriões somáticos foram induzidos pela aplicação exógena de ABA somente quando a fonte de explante utilizada eram plântulas contendo ápices meristemáticos, que eram a principal fonte de auxinas (Nishiwaki *et al.*, 2000).

No presente trabalho a suplementação exógena de ABA (150  $\mu\text{M}$ ) combinado com maltose (9%), PEG (7%) resultou nos maiores conteúdos de AIA e ABA permitindo o desenvolvimento de embriões somáticos. Aparentemente, nestas culturas, a combinação de ABA (150  $\mu\text{M}$ ), maltose (9%) e PEG (7%) suplementadas ao meio de cultura ativou a síntese endógena de AIA, favorecendo o desenvolvimento de embriões somáticos cotiledonares.

**CAPITULO IV**

**EFEITO DAS POLIÂMINAS EXÓGENAS DURANTE A MULTIPLICAÇÃO DE CULTURAS  
EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia***

## 5.1. INTRODUÇÃO

Poliaminas (PAs) são um importante e interessante grupo de moléculas de baixo peso molecular presente nas células vegetais (Bais & Ravishankar, 2002). Elas têm sido associadas a vários processos celulares, tais como a divisão celular, síntese de proteínas, replicação de DNA e respostas a estresses abióticos (van Broesk *et al.*, 1994). PAs existem na forma livre e conjugada (Evans & Malmberg, 1989). Têm sido sugerido que as poliaminas são um tipo de regulador de crescimento ou mensageiro hormonal secundário (Galston, 1983).

Durante a embriogênese, as poliaminas estão envolvidas em vários processos morfogênicos (Cvikrová *et al.*, 1999). O conteúdo endógeno de poliaminas é relacionado com a capacidade embriogênica das culturas em diversas espécies (Yadav & Rajam, 1998; Bais & Ravishankar, 2002). A adição de poliaminas ao meio de cultura é relacionada com o aperfeiçoamento dos protocolos de embriogênese somática (Kevers *et al.*, 2000). A aplicação exógena têm sido um método simples para elevar o conteúdo de PAs, porém, o efeito exógeno das poliaminas não é o mesmo para as diferentes espécies (Takeda *et al.*, 2002).

No presente trabalho avaliou-se o efeito da aplicação exógena de poliaminas na multiplicação celular e conteúdo endógeno de proteínas, amido, AIA, ABA e PAs em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1. Material vegetal

Foram utilizadas culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, induzidas e estabilizadas no período 2002/2003, segundo Steiner *et al.* (2004). As culturas foram mantidas em ciclos repetitivos de divisão celular, em meio de cultura BM (Gupta & Pullmann, 1991) suplementados ou não com 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP ( $0,5\mu\text{M}$ ) e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ ).

### 5.2.2. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado baseou-se na formulação salina BM (Gupta & Pullman, 1991) acrescida de L-glutamina ( $1\text{ g.L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $1\text{ g.L}^{-1}$ ), caseína hidrolisada ( $0,5\text{ g.L}^{-1}$ ) os quais foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da adição de phytigel® ( $2,0\text{ g.L}^{-1}$ ). Foram testados tratamentos com variação de poliaminas e fitorreguladores. Foram adicionadas Put (0,01, 0,1 e 1mM), Spd (0,01, 0,1 e 1mM) e Spm (0,01, 0,1 e 1mM) combinadas ao meio de cultura suplementado com 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP ( $0,5\mu\text{M}$ ) e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ ) denominado BM2 e ao meio de cultura isento de fitorreguladores denominado BM0.

### 5.2.3. Condições de cultura *in vitro*

Para cada tratamento foram inoculadas três placas de petri contendo 20 mL de meio de cultura com três colônias de 500 mg de matéria fresca. Após a inoculação as culturas foram incubadas no escuro com temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ . Para a análise bioquímica foram coletadas

amostras celulares de todos os tratamentos no final do período de cultivo aos 30 dias. Estas foram armazenadas em freezer (-20°C) para as posteriores análises.

#### **5.2.4. Incremento da matéria fresca (MF) e determinação da matéria seca (MS)**

O dados de multiplicação celular foram analisados por comparação entre a MF inicial de 500 mg por colônia, e a MF ao final do período de cultivo. As culturas embriogênicas foram pesadas após o término do experimento de multiplicação aos 30 dias. Os dados foram representados pela média do peso da três colônias de cada repetição.

Para obtenção da MS, três amostras (200 mg de MF) de culturas embriogênicas de cada tratamento de multiplicação foram mantidas a 70 °C durante 72 horas. Os dados de MS foram expressos em porcentagem da MF inicial utilizando a equação  $MS\% = (MS/MF) * 100$ .

#### **5.2.5. Determinação de proteínas e amido**

Foram utilizadas amostras de 200 mg de culturas embriogênicas de todos os tratamentos. A metodologia para extração e dosagem de amido e proteínas está descrita detalhadamente no item 2.2.4 e 2.2.5 no capítulo I.

#### **5.2.6. Determinação de AIA e ABA**

Amostras de 500 mg de matéria fresca (MF) das culturas embriogênicas de todos os tratamentos foram analisadas. A metodologia para extração e determinação de AIA e ABA encontra-se descrita no item 2.2.7 do capítulo I.

### 5.2.7. Determinação de poliaminas

Amostras de 300 mg de matéria fresca (MF) das culturas embriogênicas de todos os tratamentos no final do período de cultivo foram analisadas. A metodologia para extração e determinação das poliaminas encontra-se descrita no item 2.2.6 do capítulo I.

### 5.2.8. Estratégia experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em blocos completamente casualizados. A análise bioquímica foi realizada em triplicata para cada tratamento. Os dados foram representados através das médias e desvio padrão.

## 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

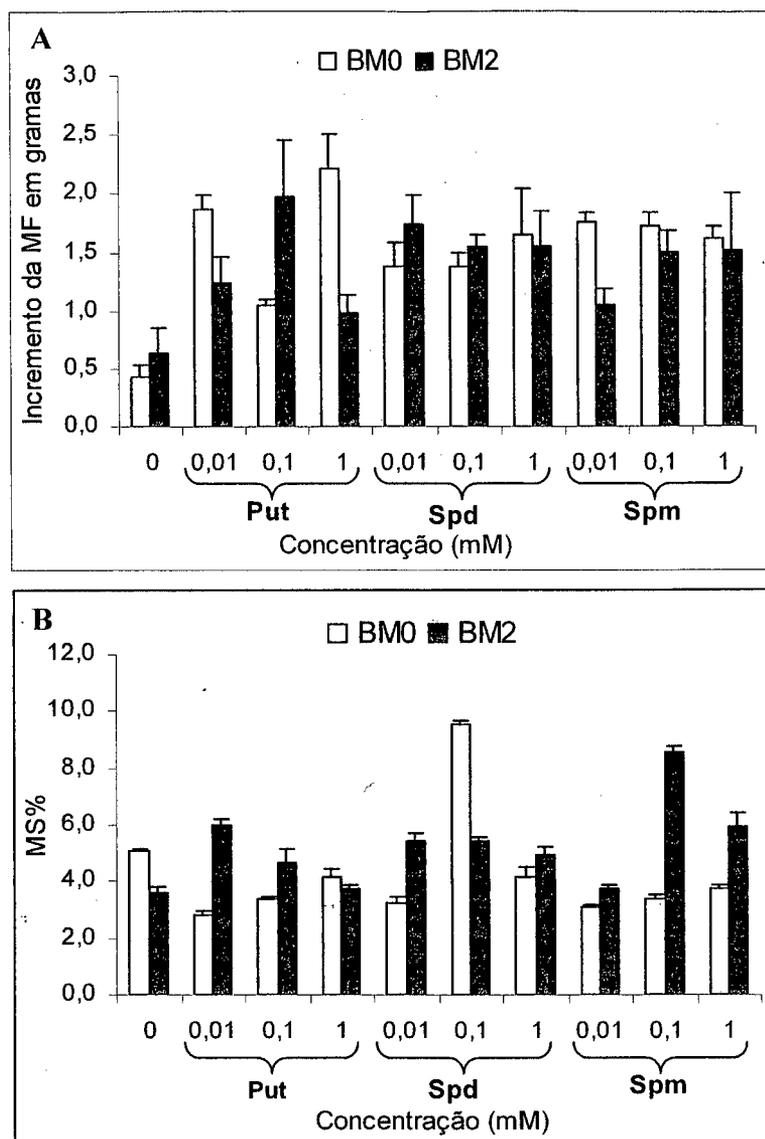
### 5.3.1. Incremento da matéria e fresca (MF) e matéria seca (MS)

O incremento de MF das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* foi observado na presença de poliaminas no meio de cultura (Figura 1A). O maior incremento celular foi observado quando o meio de cultura foi suplementado com Put (1mM) na ausência de outros fitorreguladores (BM0), contudo a Put (0,1 mM) combinada com 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M) (BM2) também promoveu o incremento celular em relação ao tratamento controle.

Resultados similares também foram observados em protoplastos de aveia onde a aplicação de Put, Spd e Spm estimulou a síntese de DNA. A Put foi a poliamina mais efetiva na multiplicação celular, contudo não foi observada uma relação direta entre dose e resposta (Wu & Kuniyuki, 1997). Feirer *et al.* (1984), relacionou a adição de Put com a restauração do potencial

embriogênico em culturas embriogênicas de cenoura na fase de multiplicação. Em nosso trabalho a adição de Put ao meio de cultura manteve a friabilidade e o aspecto translúcido das culturas, evidenciando a manutenção das características embriogênicas destas células.

Em *Pinus sylvestris* foi observado um decréscimo do conteúdo de água em culturas embriogênicas na presença de Put e Spd (Laukkanen & Sarjala, 1997). Em nosso trabalho, o conteúdo de MS apresentou maior incremento quando a Spd e Spm foram adicionadas ao meio de cultura independente da combinação com outros fitorreguladores (Figura 1B). Na ausência de outros fitorreguladores (BM0) a suplementação de Spm (0,1 mM) no meio de cultura foi o único tratamento que promoveu acúmulo de MS em relação ao tratamento controle. Já, quando as poliaminas foram combinadas com outros fitorreguladores (BM2) no meio de cultura o conteúdo de MS oscilou, porém foi observado sempre um incremento em relação ao tratamento controle (Figura 1B). Em geral, o incremento no conteúdo de MS encontra-se relacionado com a diferenciação celular, em que ocorre a vacuolização das células e deposição de substâncias de reserva (Bewley & Black, 1994). Em nosso trabalho, a adição exógena da Spm e Spd ocasionou uma maior deposição de substâncias de reserva (Figura 1B) que sugere o maior acúmulo de MS.



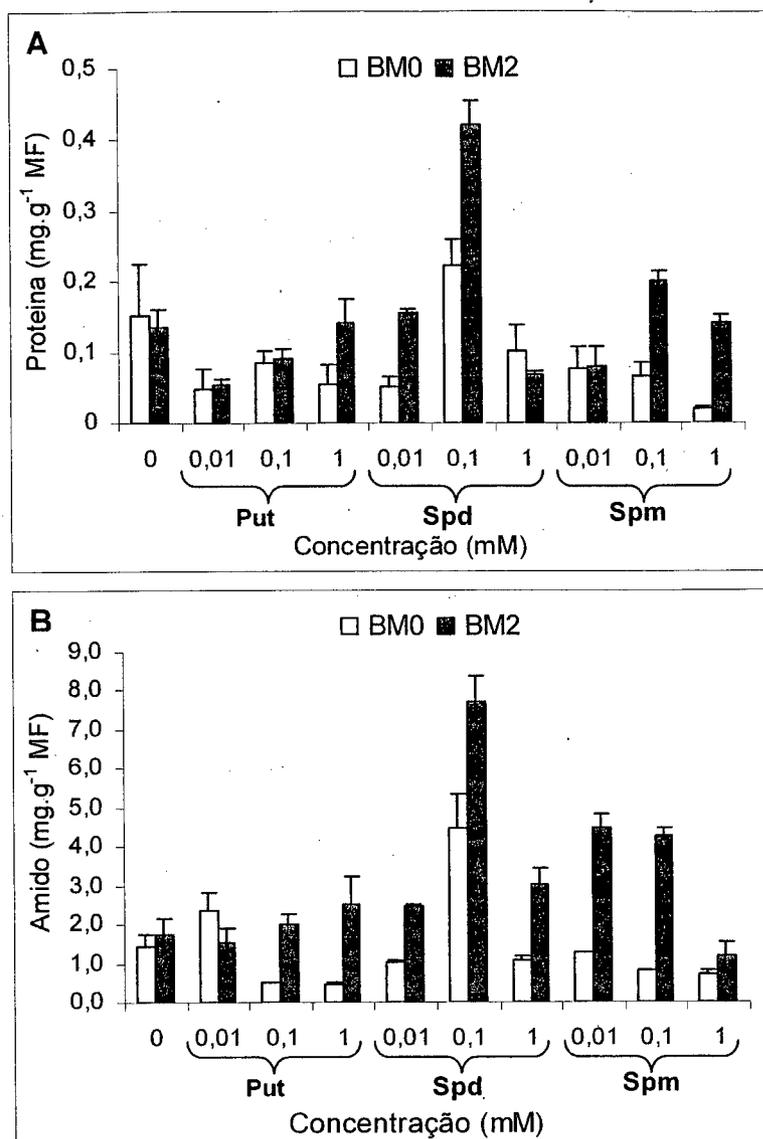
**Figura 1.** Efeito da adição de PAs e outros fitorreguladores ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no incremento de MF e MS das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. (A) Incremento de MF em gramas; (B) MS%. BM0 (meio de cultura isento de fitorreguladores); BM2 (meio de cultura suplementado com 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)). Os dados foram representados pela média e desvio padrão.

### 5.3.2. Proteínas e Amido

A combinação de outros fitorreguladores (BM2) e Spm (0,1mM) promoveu o maior acúmulo endógeno de proteínas e amido (Figura 2AB). Em relação ao tratamento controle foi observado também um incremento de proteínas na combinação de BM2 com Put (1mM) e Spd (0,1mM) (Figura 2A). Na ausência de outros fitorreguladores, as poliaminas promoveram a biossíntese de proteínas somente em resposta a Spd (0,1mM). Nos demais tratamentos foram observados decréscimos no conteúdo de proteínas em relação ao tratamento controle. O incremento no conteúdo de amido foi observado especialmente na presença de Spm (0,01 e 0,1 mM) combinado com outros fitorreguladores (BM2) (Figura 2B).

Em culturas embriogênicas de cenoura a adição de Spm (0,3 mM) promoveu a supressão de proteínas extracelulares (Takeda *et al.*, 2002), o que foi atribuído a um declínio na fluidez da membrana, já que a Spm é um composto policatiônico que pode ligar-se aos fosfolípidios da membrana plasmática (Tassoni *et al.*, 1996) diminuindo a fluidez (Roberts *et al.*, 1986). Apesar de que em nosso estudo não foi avaliado o conteúdo de proteínas extracelulares, o aumento no conteúdo endógeno de proteínas foi observado.

Durante a maturação de culturas embriogênicas de *Picea glauca* x *Picea engelmannii* o conteúdo de Put e Spd foi aumentado, assim como a síntese de proteínas (Amarasinghe *et al.*, 1996). Como mencionado anteriormente, a aplicação de poliaminas exógenas, especialmente a Spd e Spm reflete na rigidez e estabilização da membrana celular (Roberts *et al.*, 1986) e na inibição da síntese de etileno (Grime *et al.*, 1986), as quais podem ser características importantes para posteriores etapas da embriogênese. Em *Panax ginseng* o pré-tratamento de culturas embriogênicas com Spd promoveu o incremento no número de embriões somáticos formados durante o experimento de maturação (Kevers *et al.*, 2000). No presente estudo, também a síntese de proteínas e amido foi promovida por estas duas PAs, sugerindo que a adição destas ao meio de cultura pode ser importante durante a multiplicação, melhorando, assim, a condição fisiológica e bioquímica das culturas antes de serem submetidas aos tratamentos de maturação.



**Figura 2.** Efeito da adição de PAs e outros fitorreguladores ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo endógeno de proteínas e amido das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. (A) Proteínas; (B) amido. BM0 (meio de cultura isento de fitorreguladores); BM2 (meio de cultura suplementado com 2,4-D (2 $\mu$ M), BAP e Kin (0,5 $\mu$ M)). Os dados foram representados pela média e desvio padrão.

### 5.3.3. AIA e ABA

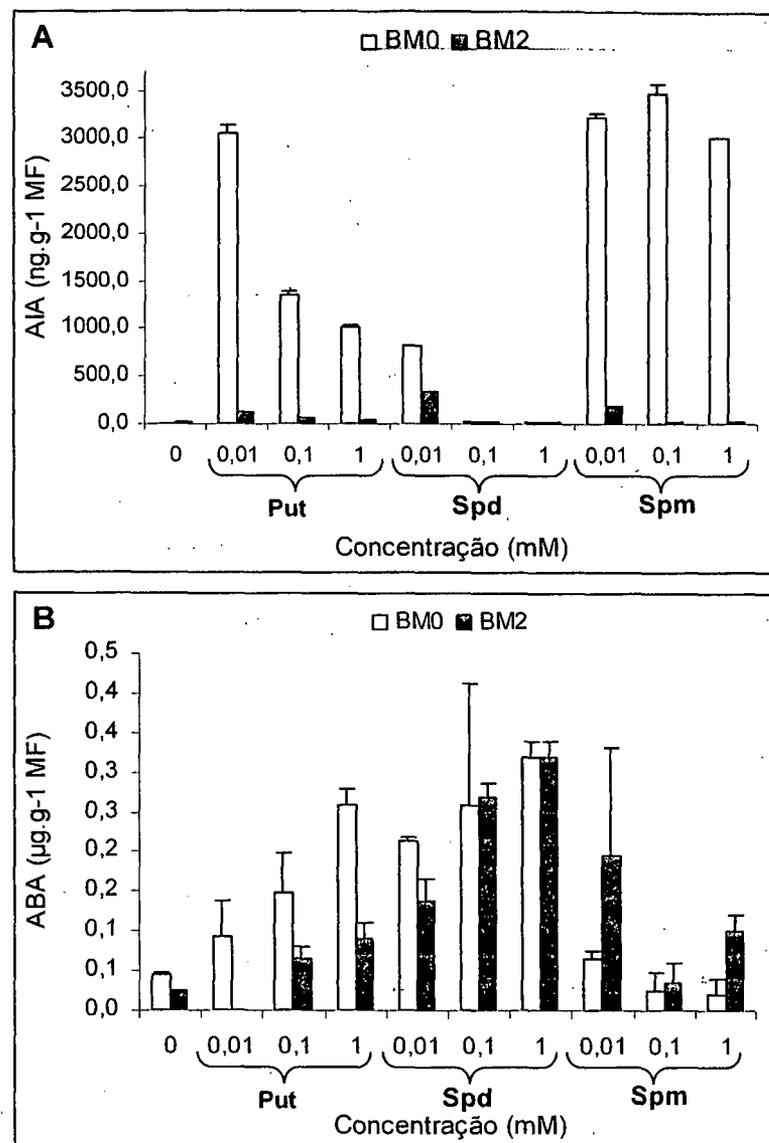
A adição de poliaminas ao meio de cultura sem suplementação de outros fitorreguladores (BM0) promoveu um acúmulo endógeno de AIA, comparativamente ao meio de cultura suplementado com outros fitorreguladores (BM2) (Figura 3A). As poliaminas podem substituir em

parte as respostas das auxinas, sugerindo que as mesmas podem ser mediadoras das respostas hormonais (Bagni *et al.*, 1978). Em tubérculos dormentes de *Helianthus tuberosus*, o baixo conteúdo endógeno de poliaminas foi relacionado com a limitação do crescimento e a aplicação exógena de auxinas (2,4-D), ativou a síntese de poliaminas e o crescimento (Bagni *et al.*, 1978). Em arroz, o AIA estimulou a alongação dos cotilédones acompanhado do acúmulo de Put (Lee & Lin, 1996).

Para *A. angustifolia*, a adição de poliaminas nas culturas embriogênicas isentas de fitorreguladores (BM0) pode ser uma estratégia interessante para que ocorra o acúmulo endógeno de AIA, sem submeter à cultura aos efeitos do 2,4-D. Isto porque, o 2,4-D também promove a síntese endógena de AIA que é correlacionado positivamente com a capacidade embriogênica da cultura. Contudo, durante a maturação, os efeitos residuais de 2,4-D podem inibir o desenvolvimento normal do embrião (Neumann, 2000). Assim, no presente trabalho, a substituição do 2,4-D pela suplementação com poliaminas poderia aumentar a capacidade das culturas embriogênicas em responder aos tratamentos de maturação.

A biossíntese endógena de ABA foi estimulada gradativamente pela adição de Put e Spd, sendo observada uma relação direta entre a concentração destas PAs exógenas e a biossíntese de ABA. Ao contrário, foi observado que o aumento da concentração de Spm no meio de cultura foi inversamente proporcional ao acúmulo de ABA (Figura 3B). Segundo Gaspar *et al.* (1996), o metabolismo hormonal opera de maneira integrada com o metabolismo primário. Em *Panax ginseng* a aplicação exógena de poliaminas combinada com auxinas incrementou a indução das culturas embriogênicas e o número de embriões somáticos produzidos. Entre as poliaminas testadas, a Spd apresentou o melhor efeito (Kevers *et al.*, 2000). No presente trabalho, o incremento no conteúdo endógeno de ABA foi promovido pela adição exógena de PAs, especialmente a Spd.

Estes resultados sugerem que a suplementação de poliaminas durante a maturação nesta espécie pode ser promissora, considerando que em *A. angustifolia* a formação de embriões somáticos cotiledonares foi acompanhada pelo acúmulo endógeno de ABA e AIA (Capítulo III).



**Figura 3.** Efeito da adição de PAs e outros fitorreguladores ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo endógeno de AIA e ABA das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. (A) AIA; (B) ABA. BM0 (meio de cultura isento de fitorreguladores); BM2 meio de cultura suplementado com 2,4-D (2µM), BAP e Kin (0,5µM). Os dados foram representados pela média e desvio padrão.

#### 5.3.4. Poliaminas

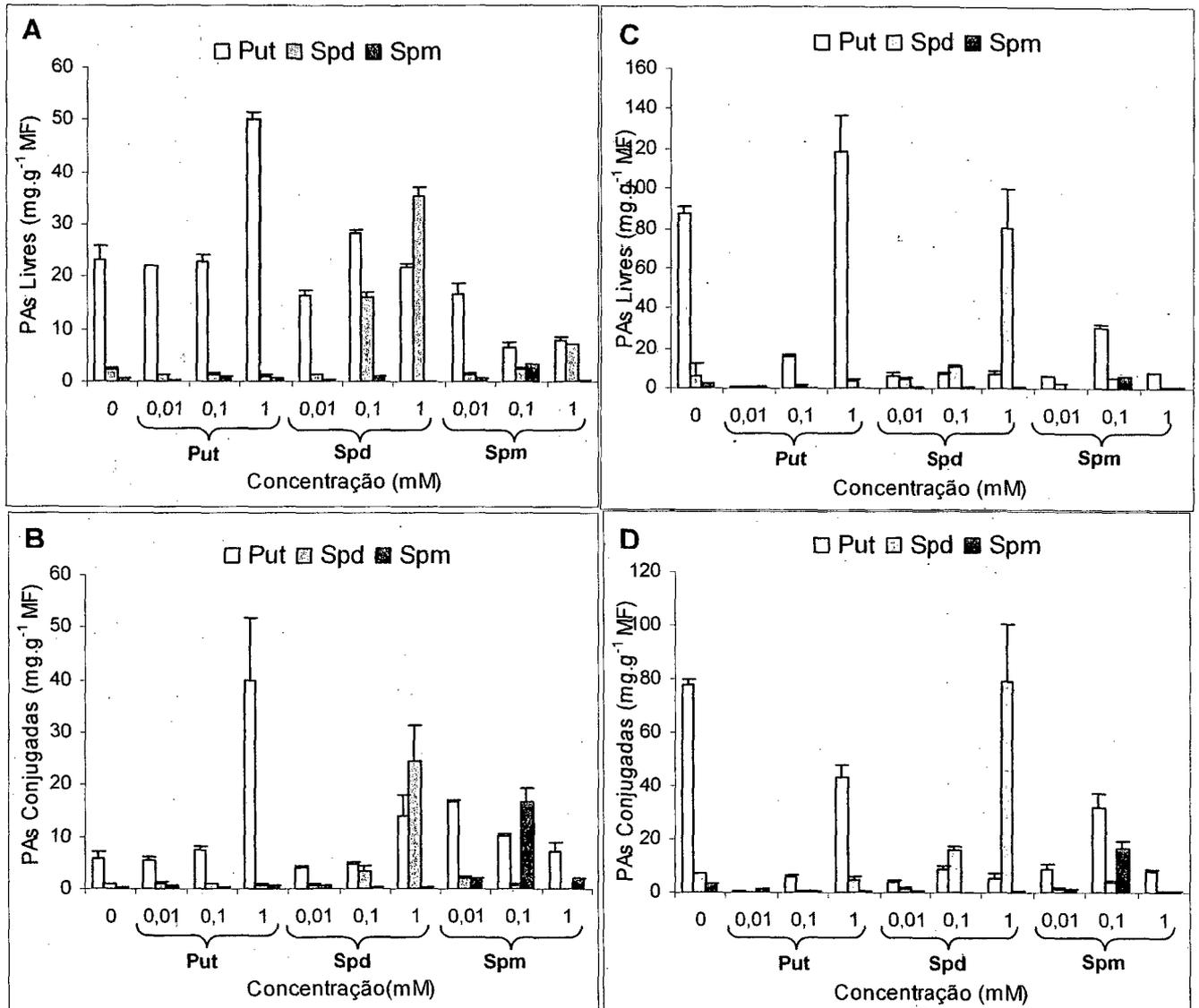
De maneira geral, no presente estudo as culturas embriogênicas cultivadas em meio de cultura contendo outros fitorreguladores (BM2) apresentaram maiores conteúdos de poliaminas livres (Figura 4C) e conjugadas (Figura 4D) quando comparadas com as poliaminas livres (Figura 4A) e conjugadas (Figura 4B) das culturas embriogênicas cultivadas em meio de cultura isento de outros fitorreguladores (BM0). Independentemente da suplementação de outros fitorreguladores ao meio de cultura as culturas embriogênicas suplementadas com Put apresentaram incremento celular de Put, porém não um incremento de SPd e Spm (Figura 4AC). Isto indica que o suprimento exógeno de Put não foi convertido para Spd e Spm (Kumar & Thorpe, 1989), indicando a ausência das enzimas envolvidas na conversão de Put em Spd e Spm (Bastola & Minocha, 1995). Em culturas embriogênicas de *Solanum melongena* a adição ao meio de cultura de inibidores da síntese de Put resultou em uma redução endógena do conteúdo de Put sem modificar o conteúdo de Spd e Spm (Yadav & Rajam, 1998). Estes autores sugerem que esta pode ser uma estratégia interessante para a regulação do "pool" endógeno de poliaminas para algumas espécies, especialmente nos estágios tardios da embriogênese.

A aplicação exógena de poliaminas têm sido um método simples para elevar o conteúdo de PAs, o que é positivamente correlacionado com a capacidade de regeneração de diversas espécies vegetais. Porém, o efeito exógeno das poliaminas não está totalmente elucidado e aparentemente não é o mesmo para as diferentes espécies (Takeda *et al.*, 2002). Em culturas embriogênicas de *Oryza sativa* o conteúdo endógeno de poliaminas livres, comparativamente ao conteúdo de poliaminas conjugadas, foi proporcional ao potencial da cultura para regenerar plantas (Hausman *et al.*, 1997). No entanto, a conjugação de poliaminas pode ser uma forma de regulação do "pool" de poliamina livre na célula. Entretanto, o significado fisiológico das poliaminas conjugadas ainda não é bem conhecido (Mader & Hanke, 1997). Vários estudos têm demonstrado a correlação entre o incremento do conteúdo de poliaminas e a divisão celular, ao

contrário, a queda de poliaminas é observada durante a redução da atividade mitótica (Bais & Ravishankar, 2002).

## Ausência de fitorreguladores (BM0)

## Presença de fitorreguladores (BM2)

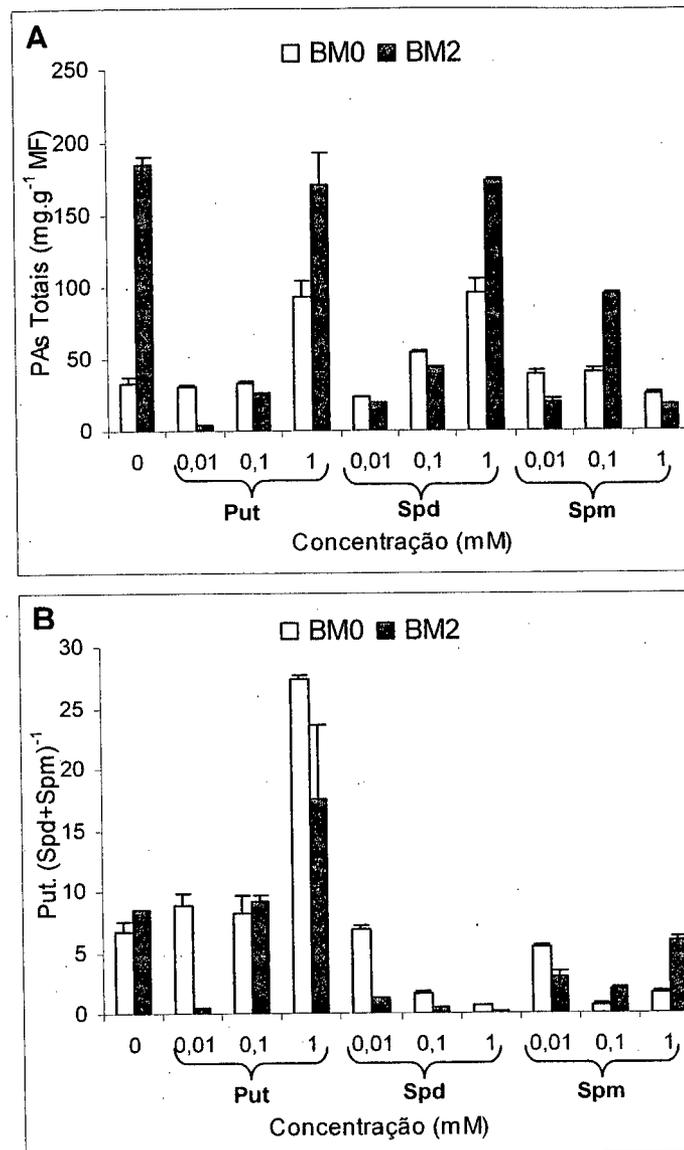


**Figura 4.** Efeito da adição de PAs e outros fitorreguladores ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo endógeno de PAs das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. (A,B) PAs Livres das culturas embriogênicas em meio de cultura isento de outros fitorreguladores; (C,D) PAs Conjugadas nas culturas embriogênicas em meio de cultura suplementado com 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ ). Os dados estão representados pela média e desvio padrão.

De maneira geral, neste estudo o conteúdo endógeno de poliaminas totais foi maior nas culturas embriogênicas cultivadas em meio de cultura suplementado com outros fitorreguladores (BM2). Na ausência de outros fitorreguladores o conteúdo de PAs totais foi maior em relação ao tratamento controle somente quando o meio foi suplementado com Put e Spd (1mM) (Figura 5A). Alguns trabalhos têm mostrado que as poliaminas interagem de alguma forma com os hormônios vegetais, sugerindo-se que auxinas e giberelinas podem induzir a síntese de poliaminas (Bagni & Serafini-Fracassini, 1985; Smith *et al.*, 1985). A biossíntese de poliaminas é provavelmente um dos primeiros eventos metabólicos promovidos pela ativação com 2,4-D (Serafini-Fracassini, 1991). A Spd e Spm se originam a partir da Put, pela adição de grupos aminopropil (Antognoni *et al.*, 1998). No presente trabalho, a presença de outros fitorreguladores no meio de cultura pode ter estimulado a síntese e o acúmulo de poliaminas promovendo o acúmulo de PAs totais no meio de cultura contendo este fitorregulador (BM2).

A razão de poliaminas apresentou padrões diferentes daqueles observados para as PAs totais indicando que nem sempre o acúmulo de Put foi maior em relação à Spd e Spm. A maior razão de PAs foi observada nos tratamentos suplementados com Put, indicando que quando estas foram suplementadas ao meio de cultura ocorreu um incremento no conteúdo endógeno de Put. Do mesmo modo, a menor razão de PAs observada nos tratamentos com adição de Spd e Spm se deve a incorporação destas poliaminas resultando em um incremento endógeno (Figura 5B).

Em relação ao tratamento controle, a razão de PAs foi modificada drasticamente nos tratamentos suplementados com Spd e Spm que apresentaram o maiores valores de MS (Figura 1B), assim como a Put (1mM), as quais também resultaram nos maiores valores de multiplicação celular (Figura 1A). Assim, considerando estes resultados pode-se inferir no presente trabalho que altas razões de poliaminas podem ser correlacionadas com incremento celular, enquanto que a baixa razão de poliaminas é correlacionada com o acúmulo de MS.



**Figura 5.** Efeito da adição de PAs e outros fitorreguladores ao meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) no conteúdo endógeno de PAs das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. (A) PAs totais; (B)  $\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}$ . BM0 (meio de cultura isento de outros fitorreguladores); (BM2 meio de cultura suplementado com 2,4-D ( $2\mu\text{M}$ ), BAP e Kin ( $0,5\mu\text{M}$ )). Os dados estão representados pela média e desvio padrão.

**CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

No presente estudo foram obtidos resultados inéditos sobre a embriogênese somática de *A. angustifolia*. Aspectos relevantes do metabolismo durante a fase de indução, multiplicação e maturação foram identificados e elucidados. Foram também caracterizadas as diferentes etapas morfogênicas das culturas embriogênicas durante a embriogênese somática. Os tratamentos de maturação utilizados permitiram o desenvolvimento de embriões somáticos cotiledonares e a análise do metabolismo endógeno indicou algumas alternativas para o estabelecimento de protocolo completo de embriogênese somática para esta espécie.

No capítulo I "Indução e multiplicação de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*" relatou-se a obtenção de altas taxas de indução e multiplicação das culturas embriogênicas em meio de cultura suplementado e isento de fitorreguladores. **Além disso, foi possível a indução de culturas embriogênicas em meio de cultura suplementado com maltose, o que até este momento não tinha sido obtido para esta espécie. Foi observado que esta fonte de carbono tem efeito fundamental na organização morfológica das culturas embriogênicas, favorecendo a formação de pró-embriões bipolares que, segundo diversos autores estão aptos ao processo de maturação (Blanc, 2002; Bozhkov et al., 2002).** Apesar disso, a multiplicação neste meio de cultura ainda é mais lenta do que em meio de cultura com sacarose. Os resultados do capítulo IV indicam uma alternativa que será comentada adiante.

Na análise do metabolismo endógeno foi observado que o conteúdo endógeno de AIA é incrementado quando as culturas embriogênicas são cultivadas em meio de cultura contendo 2,4-D, principalmente, no meio de cultura suplementado com sacarose. Ao contrário disso, a maltose inibiu a síntese endógena de AIA mesmo com a adição de 2,4-D. Alguns autores sugerem que o conteúdo endógeno de AIA está relacionado à capacidade embriogênica da cultura e é essencial durante o desenvolvimento inicial dos embriões somáticos (Jimenez, 2001; Fehér et al., 2003). Assim, é necessário que em culturas embriogênicas suplementadas com maltose, as quais apresentam morfologia bipolar, tenham o conteúdo endógeno de AIA elevado pela aplicação exógena, ou através de um mediador hormonal, função sugerida para as poliaminas (Bais et al., 2002) e confirmada pelos resultados apresentados no Capítulo IV.

As poliaminas foram observadas em concentrações significativamente superiores em culturas embriogênicas suplementadas com sacarose comparativamente a maltose, indicando a relação direta do conteúdo endógeno de poliaminas com multiplicação celular das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

O conteúdo endógeno de proteínas destas culturas também foi superior em meio de cultura suplementado com maltose comparativamente a sacarose, indicando uma melhor condição das culturas para estágios posteriores da embriogênese. Contudo, as culturas embriogênicas suplementadas com sacarose também parecem estar aptas ao processo de maturação (capítulo III).

A adição de maltose ao meio de cultura promoveu a síntese endógena de ABA com conteúdos significativamente superiores aqueles observados em cultura embriogênicas provenientes do meio de cultura suplementado com sacarose. Apesar de que o ABA não é comumente suplementado aos meios de cultura nesta etapa da embriogênese em coníferas a síntese endógena pode promover a melhor qualidade das culturas submetidas aos tratamentos de maturação. No presente trabalho foram obtidos resultados inéditos para coníferas, relacionando o metabolismo do carbono e a síntese endógena de ABA. Até o momento, os dados de literatura levantam esta hipótese somente em estudos realizados em angiospermas (Nambara & Marion-Poll, 2003). **Os resultados aqui obtidos sugerem que a adição de maltose ao meio de cultura é uma das bases do metabolismo que leva a síntese de ABA e a organização dos pró-embriões somáticos de *A. angustifolia*.**

Alternativamente, estas culturas poderiam ser submetidas a tratamentos com balanço entre maltose e sacarose uma vez que o metabolismo hormonal está interligado com o catabolismo dos carboidratos (Finkelstein & Gibson, 2001), assim como com a formação de embriões somáticos em coníferas (Iraqui & Tremblay, 2001; Stasolla & Yeung, 2003).

No capítulo II "Dinâmica de crescimento e aspectos fisiológicos e bioquímicos de suspensões celulares embriogênicas de *A. angustifolia*", foram determinados meios de cultura

aptos à multiplicação massal das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*. Foi possível a multiplicação das culturas em meio suplementado com maltose ou sacarose.

Os meios de cultura suplementados com sacarose apresentaram multiplicação celular na presença e ausência de fitorreguladores. Contudo, aqueles meios de cultura suplementados com maltose só apresentaram multiplicação celular com suplementação exógena de fitorreguladores. Possivelmente isto se deve ao decréscimo da síntese endógena de AIA, como comentado no capítulo anterior (capítulo I). No capítulo I, a maltose inibiu a síntese endógena de AIA chegando a apresentar valores similares aos tratamentos isentos de fitorreguladores. E, provavelmente, isto também ocorreu nas culturas embriogênicas em suspensões celulares. Isto sugere que a maltose (3%) por si só tem efeito inibitório ao acúmulo endógeno de AIA livre.

De maneira geral o conteúdo endógeno de poliaminas, especialmente na forma livre, foi maior nos tratamentos suplementados com sacarose comparativamente ao tratamento com maltose. **Pode-se concluir que o crescimento celular das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* em suspensões celulares está associado a um incremento no conteúdo endógeno de poliaminas.** Meios de cultura suplementados com maltose apresentaram um crescimento celular mais lento comparativamente aquele observado em meios de cultura suplementados com sacarose. Além disso, o incremento celular das culturas em meio com sacarose foi acompanhado pela maior síntese de proteínas e amido condizente com a demanda de energia para o processo de multiplicação celular.

No capítulo III "Parâmetros bioquímicos e fisiológicos durante a embriogênese zigótica e maturação de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*", foram determinadas as condições de cultivo para obtenção de embriões somáticos em estágio de desenvolvimento cotiledonar. Foram ainda determinados parâmetros do metabolismo endógeno dos embriões somáticos comparativamente aos embriões zigóticos desta espécie.

Algumas especificidades de condições de cultivo promoveram o desenvolvimento dos embriões cotiledonares. Maltose (9%), ABA (150 $\mu$ M) e PEG(7%) promoveram o maior acúmulo de proteínas, amido, ABA e AIA endógeno, a histodiferenciação e o desenvolvimento dos embriões

somáticos. Ao contrário, quando a maltose foi substituída pela sacarose não foi observada a síntese de proteínas e o conteúdo de AIA endógeno foi significativamente inferior. No presente trabalho, o acúmulo endógeno de AIA e proteínas pareceu ser determinante para a progressão dos embriões somáticos à estágios tardios do desenvolvimento. Foi sugerido que as rotas de transporte de auxinas durante a embriogênese são responsáveis pelo normal estabelecimento da polaridade do embrião nos estágios iniciais do desenvolvimento. Este mesmo autor sugere também que o efluxo polar e a produção local de auxina são responsáveis pela formação do eixo apical basal do embrião e da planta adulta (Friml *et al.*, 2003).

No presente estudo, pode-se inferir que a combinação de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150  $\mu$ M) suplementados ao meio de cultura de maturação promoveram o acúmulo endógeno de AIA. No capítulo I, foi observado que, quando as culturas foram multiplicadas somente com maltose (3%), sem a presença de ABA e PEG, a síntese endógena significativamente superior de AIA não foi observada. Além disso, os tratamentos de maturação que combinaram a suplementação de PEG (7%) e maltose (9%) na ausência de ABA não apresentaram valores significativamente superiores de AIA e também não apresentaram a formação de embriões somáticos. **Conclui-se que a suplementação do meio de cultura com ABA ativa a síntese endógena de AIA permitindo o desenvolvimento dos embriões somáticos.**

Resultados similares também foram observados por Thomas *et al.* (2002), em que a imunolocalização de AIA endógeno em embriões zigóticos de girassol antes, durante e depois da indução à embriogênese, indicou que o conteúdo de auxinas endógenas pode ser um dos primeiros sinais que conduzem a embriogênese somática. Nesta mesma espécie, o conteúdo endógeno de AIA também foi influenciado pela aplicação exógena de ABA, que resultou na formação de embriões somáticos em meio de cultura suplementado com alta concentração de sacarose, sendo que na ausência destes componentes, somente ocorreu o crescimento desorganizado da cultura (Charrière *et al.*, 1999).

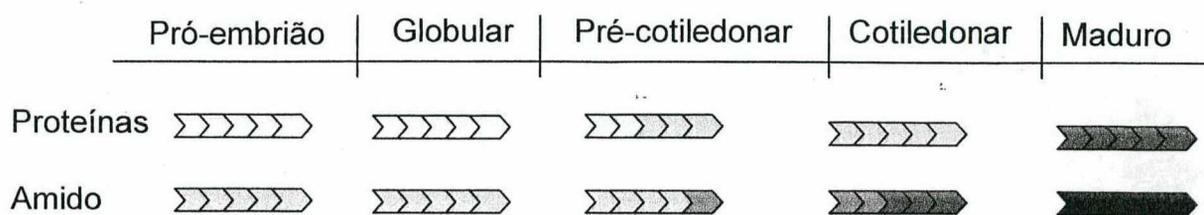
Ao analisar comparativamente o padrão de acúmulo de proteínas e amido durante o desenvolvimento do embrião zigótico e em resposta ao melhor tratamento de maturação foi

observado que, apesar dos embriões somáticos apresentarem acúmulo de proteínas, estes valores ainda são inferiores aqueles observados nas fases tardias do embrião zigótico. Isto sugere que o meio de cultura de maturação seja suplementado com componentes que permitam este acúmulo e alguns dos quais foram identificados no presente trabalho, como por exemplo, as poliaminas, avaliadas no capítulo IV. **Ainda, a identificação dos tipos de proteínas ativadas por cada um dos componentes do meio de cultura, comparativamente às proteínas expressas no embrião zigótico, poderia ser uma importante estratégia para regular a qualidade do desenvolvimento dos embriões somáticos, assim como, otimizar os componentes do meio de cultura de maturação.**

No capítulo IV "Efeito das poliaminas exógenas durante a multiplicação de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*" foram observados efeitos significativos das diferentes poliaminas. **A put foi relacionada à multiplicação celular das culturas enquanto que a Spd e Spm foram relacionadas ao incremento de MS e síntese endógena de substâncias de reserva. Ainda a Spd e Spm influenciaram no acúmulo do conteúdo endógeno de ABA e AIA respectivamente (Figura 1). Isto sugere que estas poliaminas estão relacionadas a mudanças metabólicas endógenas que, combinadas a outros fatores, podem implicar no desenvolvimento morfológico das culturas. A partir destes resultados, novos trabalhos com suplementação do meio de cultura de maturação com poliaminas, especialmente Spd e Spm, podem promover o desenvolvimento completo dos embriões somáticos de *A. angustifolia*.**

Uma das hipóteses sugeridas no presente trabalho é que a ativação simultânea das rotas de acúmulo endógeno de AIA, ABA e síntese de proteínas conduz a mudanças morfológicas durante o desenvolvimento. Esta ativação possivelmente regula a adaptação celular causando reprogramação genética, metabólica e fisiológica a qual resulta na competência embriogênica e a formação de embriões somáticos cotiledonares em *A. angustifolia*.

### Embriogênese zigótica em *Araucaria angustifolia*



### Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia*

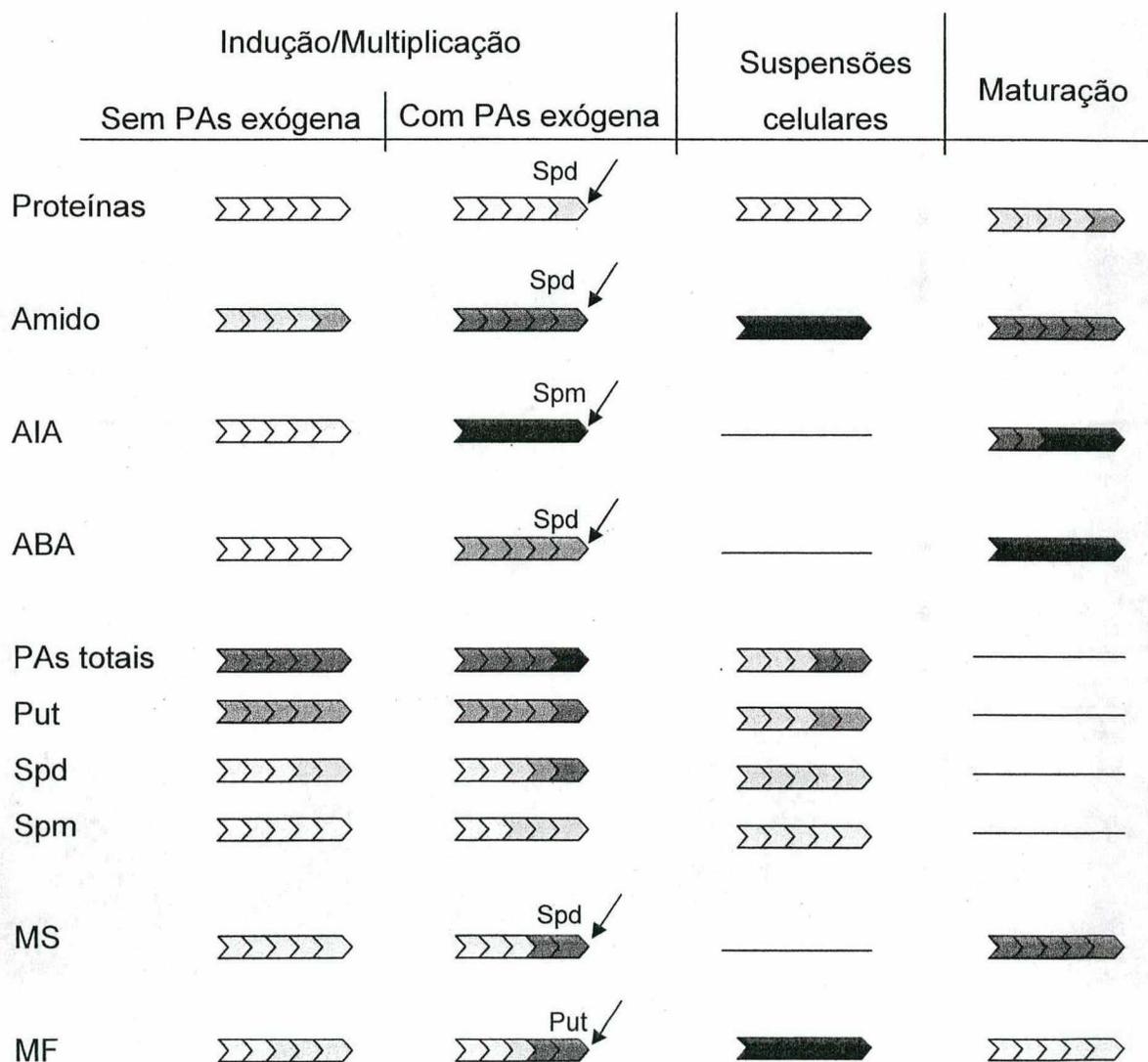
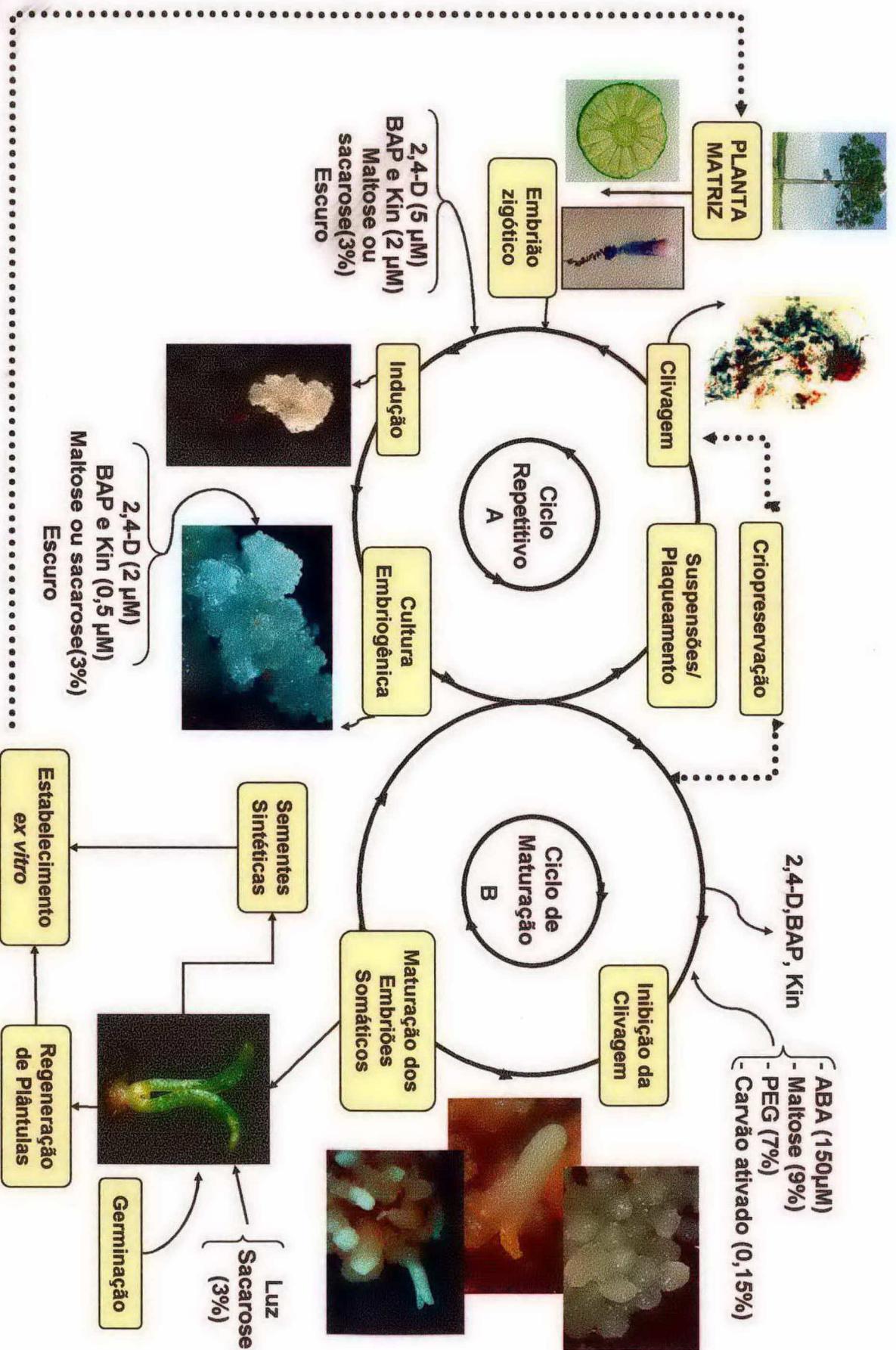


Figura 1. Resumo esquemático dos eventos morfogênicos e fisiológicos durante a embriogênese zigótica e somática de *A. angustifolia*. As setas e suas intensidades de coloração indicam flutuações dos teores endógenos de proteína, amido, AIA, ABA, Poliaminas (PAs), matéria fresca (MF) e matéria seca (MS); (—▶) Setas menores indicam a influencia da poliamina específica para cada componente endógeno; ( — ) Não realizado.



**Figura 2.** Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática de *A. angustifolia*. A) Estabelece condições para a obtenção de 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) Estabelece condições para a progressão e maturação dos embriões somáticos em meio de cultura BM suplementado com PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150µM). Adaptado de Durzan (1988) e Guerra et al., (1999).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altamura M.M., Torrigiani P., Falasca G., Rossini P., Bagni N. 1993. Morpho-functional gradients in superficial and deep tissues along tobacco stem: polyamines levels, biosynthesis and oxidation, and organogenesis. **In vitro Journal Plant Physiology**, 142:543-55.

Amarasinghe V., Dharmi R., Carlson J.E. 1996. Polyamine biosynthesis during somatic embryogenesis in interior spruce (*Picea glauca* x *Picea engelmannii* complex). **Plant Cell Report**. 15:495-499.

Antognoni F., Fornalè S., Grimmer C., Komor E., Bagni N. 1998. Long-distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. **Planta**, 204:520-527.

Arnold C.D., Mitrenga D., Mayresbach H. 1975. Gefiertro und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA) – Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. **Acta histochemistry**, 14:271-277.

Ashihara H., Stasolla C., Loukanima N., Torpe T.A. 2001. Purine metabolism during White spruce somatic embryo development: salvage of adenine, adenosine, and inosine. **Plant Science**, 160:647-657.

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

Astarita L.V., Handro W., Floh E.I.S. 2003b. Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira Botanica**, 26:163-168.

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

Astarita L.V., 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.

- Attree S.M., Moore D., Sawhney V.K., Fowke L.C., 1991. Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos effect of non-plasmolysing water stress and abscisic acid. **Annals of Botany**, 68:519-528.
- Attree S.M., Fowke L.C. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell Tissue and Organ Cultur**, 35:1-35.
- Bagni N., Calzoni GL., Spornaza A. 1978. Polyamines as sole nitrogen sources for *Helianthus tuberosus* explants *in vitro*. **New Phytology**, 80:317-323.
- Bagni N., Torrigiani P., Polyamines: a new class of growth substances. In: Karssen CM, van Loon LC & Vreugdenhil D (eds) **Progress in Plant Growth Regulation**, (pp 264-275). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1992.
- Bagni N., 1996. Aliphatic amine and growth factor of coconut milk a stimulating cellular proliferation in *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke) *in vitro*. **Experientia**, 22:732-739.
- Bagni N., Serafini-Fracassini, D. 1985. Involvement of polyamines in the mechanism of break of dormancy in *Helianthus tuberosus*. **Medical Biology**, 59:403-409.
- Bais H.P., Ravishankar G.A. 2002 Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 69:1-34.
- Bajaj S., Rajam M.V. 1995. Efficient plant regeneration from long-term callus cultures of rice by spermidine. **Plant Cell Reports**. 14:717-720.
- Baraldi R., Bertazza G., Bregoli A.M., Fasolo F., Rotondi A., Predieri S., Serafini-Fracassini D., Slovin J.P., Cphen J.D. 1995. Auxins and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction microcuttings of two pear cultivars. **Journal Plant Growth Regulation**, 14:49-59.
- Bastola D.R., Minocha S.C. 1995. Increased putrescine biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA in carrot promotes somatic embryogenesis. **Plant Physiology**, 109:63-74.

Benson E.A. 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance in vitro plant recalcitrance: an introduction. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**, 36:141-148.

Bewley J.D., Black M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Publishing, 1994. 445p.

Bisbis B., Kevers C., Crèche J., Rideau M., Gaspar T. 1998. Differential growth dependency of normal and habituated sugarbeet cell lines upon endogenous ethylene production and exogenous ethylene application. **Physiology Plantarum**, 103:210-208.

Blanc G., Lardet L., Martin A., Jacob J.L., Carron M.P. 2002. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.), **Journal of Experimental Botany**, 53:1453-1462.

Blanc G., Michaux-Ferrière N., Teisson C., Lardet L., Carron M.P. 1999 Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 59:103-112.

Bonner C.A., Jensen R.A. 1997. Recognition of specific patterns of amino acid inhibition of growth in higher plants, uncomplicated by glutamine-reversible 'general amino acid inhibition'. **Plant Science**, 130:133-143.

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

Bouzon, Z. L. 1993. **Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales - Rhodophyta)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. 66p.

Bozhkov P.V., Filonova L.H., 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.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, 72:248-253.

- Carvalho P. E. R. 1994. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. EMBRAPA-CNPQ. Colombo-PR. 70-78p.
- Charier F., Sotta B., Miginiac E., Haine G. 1999. Induction of adventitious shoots or somatic embryos on in vitro cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels. **Plant Physiology Biochemical**, 37:751-757.
- Chiwocha S., von Aderkas P. 2002. Endogenous levels of free and conjugated forms of auxin, cytokinins and abscisic acid during seed development in Douglas fir. **Plant Growth Regulation**, 36:191-200.
- Cvikrová M., Malá J., Eder J., Hrubcová M., Vágner M. 1998. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in oak somatic embryos in relation to their commercial potential. **Plant Physiology Biochemical**, 16:247-255.
- Cyr J. 1987. Developmental modulation of tubulin protein and mRNA levels during somatic embryogenesis in cultured carrot cells. **Planta**, 171:365-376.
- Dodeman V.L., Ducreux G., Kreis M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, 48:1493-1509.
- Dunstan D.I., Dong J.Z., Carrier D., Abrams S. 1998. Ets following ABA treatment of spruce somatic embryos. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**, 34:159-168.
- Durzan D.J. 1988. Process control in somatic polyembryogenesis, in J.E. Hällgren, (ed.), **Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology**. Swedish University of Agricultural Sciences 8, pp 147.
- Egertsdotter U., Von Arnold S. 1998. Development of somatic embryos in Norway spruce. **Journal Experimental of Botany**, 49:155-162.
- Etienne H., Montoro P., Michaux-Ferriere N., Caron M.P., 1993. Effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic acid on the maturation of *Hevea brasiliensis* somatic embryos, **Journal Experimental of Botany**, 44:1613-1619.

- Evans P.T., Malmberg R.L. 1989 Do polyamines have a role in plant development? **Annual Review Plant Physiology Plant and Molecular Biology**, 40:235-269.
- Faure O., Mengoli M., Nougarede A., Bagni N. 1991. Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis vinifera*. **Journal of Plant Physiology**, 138:545-549.
- Fehér A., Pasternak T.P., Dudits D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 74:201-228.
- Feirer R.P. 1995 The biochemistry of conifer embryo development: amino acids, polyamines, and storage proteins. In: Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J. (Eds.), **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, vol. 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 318-336.
- Feirer R.P., Mignon G., Litvay J.D. 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. **Science**, 223:1433-1435.
- Filonova L., Bozkov P., von Arnold S. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **Journal Experimental of Botany**, 51:343-349.
- Find J.I., Norgaard J.V., Krogstrup P. 1998. Growth parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture, **Journal of Plant Physiology**, 152:510-517.
- Find J.I. 1997. Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. **Plant Science**, 128:75-83.
- Finkelstein R.R., Gibson S.I. 2001 ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? **Current Opinion in Plant Biology**, 5:26-32.
- Fischer-Iglesias C., Sundberg B., Neuhaus G., Jones A.M. 2001. Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. **The Plant Journal**, 26:115-129.
- Fracassini D.S., Bagni N., Cionini P.G., Bennici A. 1980 Polyamines and nucleic acids during the first cell cycle of *Helianthus tuberosus* tissue after the dormancy break. **Planta**, 148:332-337.

- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Ofringa R., Jurguens G. 2003 Efflux-dependente auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. **Nature**, 426:147-153.
- Fujimura T., Komamine A. 1979 Synchronisation of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Plant Physiology**, 64:162-164.
- Galston A.W. 1983. Polyamines as modulators of plant development. **Bioscience**, 33:382-388.
- Galston A.W., Flores H.E. 1991 Polyamines and plant morphogenesis. In: R.D. Slocum; H. E. Flores. (eds) **Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants**. CRC Press, Boca Raton, pp. 175-186.
- Galston A.W., Kaur-Sawhney R. 1990. Polyamines in plant physiology. **Plant Physiology**, 94:406-410.
- Galston A.W., Kaur-Sawhney R., Altabella T., Tiburcio A.F. 1997. Plant polyamines in reproductive activity an response to abiotic stress. **Botany Acta**, 110:197-207.
- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M., Thorpe T.A. 1996. Plant hormones and growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**, 32: 272-289.
- Gazzarrini S., McCourt P. 2001 Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, 4:387-391.
- George E.F. 1993 **Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology**, vol. 1, Exegetics Limited, Edington. 574p.
- Gifford E.M., Foster A.S. 1989 **Morphology and evolution of vascular plants**, W. H. Freeman Co, New York, p. 401-453.

Gösslová M., Svobodová H., Lipavavská H., Albrechtová J., Vreugdenhil D. 2001. Comparing Carbohydrate status during Norway spruce Seed Development and somatic Embryo Formation. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**, 37:24-28.

Grey D., Sarkissian G.S., Fowler M.W. 1987 Biochemistry of forest tree species in culture, In: J.M. Bonga e D.J. Durzan (eds.), **Cell and Tissue Culture in Forestry**, v. 2, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, p. 31-60.

Grieb B., Schäfer F., Imani J., Mashayekhi K., Arnold-Schmitt B., Neumann K.H. 1997 Changes in Soluble Proteins and Phytohormone Concentrations of Cultured Carrot Petiole Explants during Induction of Somatic Embryogenesis (*Daucus carota* L.). **Angewandte Botany**, 71:94-103.

Grimes H.D., Slocum R.D., Boss W.F. 1986. a-Difluoromethy-larginine treatment inhibits protoplast fusion in fusogenic wild carrot protoplasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, 886:130-134.

Grossnickle S.C., Sutton B.C.S. 1999. Applications of biotechnology for forest regeneration. **New Forests**, 17:213-226.

Guerra M.P., Silveira V., Santos A.L.W., Astarita L.V., Nodari R.O. 2000 Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze., in: Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J. (Eds.), **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, vol. 6, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 457-478.

Guerra M.P., Silveira V., Schnaider L., Sedrez M., Nodari R.O. 2002 In: Simões L.L. e Lino C.F. (ed) **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais**. São Paulo. SENAC. p. 85-102.

Guerra M.P., Teixeira J.B., Torres A.C. 1999 Poliembriogênese Somática, In: Torres A.C. e Caldas L. **Técnicas e Aplicações da Biologia Celular e Molecular em Plantas**, Embrapa.

Gupta P.K., Grob, Somatic embryogenesis in conifers. 1995 In: **Somatic embryogenesis in Woody Plants**, S.M. Jain P.K. Gupta R.J. Newton (eds.) Kluwer Academic Publishers, 1:81-98. Dordrecht, The Netherlands.

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

- Gupta P.K., Pullman G., Timmis R., Kreitinger M., Carlson W.C., Grob J., Welty E. 1993. Forestry in the 21st Century. **Bio/technology**, 11:454-459.
- Gutmann M., von Aderkas P., Label P., Lelu M. 1996. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch, **Journal of Experimental Botany**, 47:1905-1917.
- Haberlandt G., 1992. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenellen. **Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien**, 11:62-69.
- Haines R.J., Prakash N. 1980. Proembryo development and suspensor elongation in *Araucaria Juss. Aust.* **Journal of Botany**, 28: 511-523.
- 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., Stabel P., Engstrom P., Eriksson T. 1990. Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce), **Physiologia Plantarum**, 80:441-445.
- Halperin W., Jensen, W. A. 1967 Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. **J. Ultrastruct. Res.**, 18:428-443.
- Hausman J.F., Kevers C., Evers D., Gaspar T. 1997 Conversion of putrescine in to aminobutyric acid, an essential pathway for root formation by polar shoots *in vitro*. In: A. Altman; Y. Waisel. (eds) **Biology of Root Formation and Development**, Plenum Press, 133-139.
- Havelange A., Lejeune P., Bernier G., Kaur-Sawhney R., Galston A.W. 1996 Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. **Physiologia Plantarum**, 96:59-65.
- Higgins T.J.V. 1984 Synthesis and regulation of major proteins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, 35:191-221.

Högberg K.A., Ekberg I., Norell L., Von Arnold S. 1998 Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. **Canadian Journal of Forest Research**, 10:1536-1545.

Huang X.L., Li X.J., Li Y., Huang L.Z. 2001 The effect of AOA on ethylene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. **Physiologia Plantarum**, 113:424-429.

Iraqi D., Tremblay F.M. 2001 Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. **Journal of Experimental Botany**, 52:2301-2311.

Jain S.M., Ishii K. 1998 Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In: S. Burns; D. Tragardh, **Recent Advances in Biotechnology for Tress Conservation and Management**. Mantell S.H., International Foundation for Science, Stockholm Sweden.

Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J. 1995 **Somatic embryogenesis in woody plants**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 388.

Jalonen P., von Arnold S. 1991 Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation. **Plant Cell Reports**, 10:384-387.

Jimenez V.M. 2001 Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia vegetal**, 13:196-223.

Jiménez V.M., Bangerth F. 2001 In vitro culture and endogenous hormone levels in immature zygotic embryos, endosperm and callus cultures of normal and high-lysine berley genotypes. **Journal of Applied Botany**, 75:1-7.

Kaur-Sawnhey R., Applewhite P.B. 1993. Endogenous protein bound polyamines: correlation with regions of cell division in tobacco leaves, internodes and ovaries. **Plant Growth Regulation**, 12:223-227.

Kevers C., Nathalie L.G., Monteiro M., Dommès J., Gaspar T. 2000 Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. **Plant Growth Regulation**, 31:209-214.

Khuri S., Shmoury M.R., Baalbaki R., Maunder M., Talhouk S.N. 2000 Conservation of the *Cedrus libani* populations in Lebanon: history, current status and experimental application of somatic embryogenesis. **Biodiversity and Conservation**, 9:1261-1273.

Klimaszewska K.E., Smith D.R. 1997 Maturation of Somatic Embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum, **Physiologia Plantarum**, 100:949 - 957.

Klimaszewska K., Bernier-cardou M., Cyr D.R., Sutton B.C.S. 2000. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**, 36:279-286.

Kojima K. 1996. Changes of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberellin-like substances in the flowers and development fruitlets of citrus cultivar "Hyuganatsu". **Science Horticulturae**, 65:263-272.

Kong L., Attree S.M., Fowke L.C. 1998. Effects of polyethylene glycol and methylglyoxal bis(guanylhydrazone) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*), **Plant Science**, 133: 211-220.

Kong L., Attree S.M., Fowke L.C. 1997. Changes endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophyte in *Picea glauca* (Moench) Voss. **Physiology Plant**, 101:23-30.

Kong L., Attree S.M., Evans D.E., Binarova P., Yeung E.C., Fowke L.C. 1999 Somatic embryogenesis in white spruce? Studies of embryo development and cell biology. In: Jain SM, Gupta PK, & Newton RJ (eds) **Somatic embryogenesis in Woody Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. vol. 4, p. 1-28.

- Königshofer H., Lechner S. 2002. Are polyamines involved in the synthesis of heat-shock proteins in cell suspension cultures of tobacco and alfafa in response to high-temperature stress. **Plant Physiology Biochemical**, 40:51-59.
- Konrádová H., Lipavská H., Albrechtová J., Vreugdenhil D. 2002. Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogeneses in Norway spruce: content of soluble saccharides and localisation of key enzyme activities. **Journal of Plant Physiology**, 159:387-396.
- Krogstrup P. 1990. Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embryogenic cell suspensions of *Picea sitchensis*, **Plant Science**, 72:115-123.
- Kumar P.P., Thorpe T.A. 1989. Putrescine metabolism in excised cotyledons of *Pinus radiata* cultured in vitro. **Physiology Plant**, 76:521-526.
- Kumar A., Altabella M.A., Taylor A.F., Tiburcio A.F. 1997. Recent advances in polyamine research, **Trends in Plant Science**, 2:124-130.
- Kushad M.M., Dumbroff H. 1991 Metabolic and physiological relationships between the polyamine and ethylene biosynthetic pathways, In: RD Slocum; HE Flores (eds), **Biochemistry and physiology of polyamines in plants**, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 78-89.
- Laukkanen H., Sarjala T. 1997 Effect of exogenous polyamines on Scots pine callus *in vitro*. **Journal Plant Physiology**, 150:167-172.
- Lee T.M., Lin Y.H. 1996. Opposite effects of Fusicoccin and IAA on putrescine synthesis of rice coleoptiles. **Physiology Plant**, 97:63-68.
- Lee T.M., Lur H.S., Chu C. 1997. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. II. modulation of free polyamine levels, **Plant Science**, 126:1-10.
- Li T., Neumann K.H. 1995. Embryogenesis and endogenous hormone content of cell cultures of some carrot varieties (*Daucus carota* L.). **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, 98:227-235.

Li X.Y., Huang F.H., Murphy J.B., Gbur E.E. 1998. Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, 34:22-26.

Lipasvska H., Konrádová H. 2004. Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. **In Vitro Cellular Development Biology –Plant**, 40:23-30.

Lipavská I.I., Sbodova I.I., Albrechtová J., Kumstyrova L., Vágner M., Vondráková Z. 2000. Somatic embryogenesis in Norway spruce: carbohydrate status during embryo maturation and effect of polyethylene glycol treatment. **In Vitro Cellular Development Biology –Plant**, 36:26-267.

Liu Z.X., Chua N. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**, 5:621-630.

Lo Schiavo F., Pitto L., Giuliano G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Veraga R., Orselli S., Terzi M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell culture and its variations as caused by maturation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs. **Theoretical and Applied Genetics**, 77:325.

Lulsdorf M.M., Tautorus T.E., Kikcio S.I., Dunstan D.I., 1992. Growth parameters of embryogenic suspension culture of Interior spruce (*Picea glauca–engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.), **Plant Science**, 82:227-234.

Mader J.C., Hanke D.E. 1997. Polyamine sparing may be involved in the prolongations of cell division due to inhibition of phenyl-propanoid synthesis in cytokinin starved soybean cells. **Journal Plant Growth Regulation**, 16:89-93.

Maki H., Ando S., Kodama H., Komamine A. 1991. Polyamines and the cell cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. **Plant Physiology**, 96:1008-1013.

Martin A.B., Cuadrado Y., Guerra H., Gallego P., Hita O., Martin L., Dorado A., Villalobos N. 2000. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, 154:143–151.

- Mattos J.R. de. 1994 O Pinheiro Brasileiro. (2ed.) Artes gráficas Princesa Ltda. Lages-SC. Vol.1.
- Mccready R.M., Guggolz J., Silvieira V., Owens H.S. 1950. Determination of starch and amyloses in vegetables. **Analytical chemistry**, 22:1156-1158.
- Minocha R., Minocha S.C., Komamine A., Shortle W.C. 1991 Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. **Plant Physiology**, 100:1346-1356.
- Minocha R., Shortle W.C., Long S., Minocha S.C. 1994 A rapid and reliable procedure for extraction of cellular polyamines and inorganic ions from plant tissue. **Journal Plant Growth Regulation**, 13:187-193.
- Minocha S.C., Minocha R. 1995 Role of polyamines in somatic embryogenesis. In: Y.P.S. Bajaj (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Vol. 30. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds 1. Berlin: Springer-Verlag, pp.53-70.
- Mo L.H., 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.
- Monteiro M., Kevers C., Dommès J., Gaspar T. 2002 A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 68:225-232.
- Motto M., Thompson R., Salamini F. 1997 Genetic regulation of carbo-hydrate and protein accumulation in seeds, in: B.A. Larkins, I.K. Vasil (Eds.), **Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 479-522.
- Nambara E., Marion-Poll A. 2003. ABA action and interactions in seeds. **Trends in Plant Science**, 8:213-217.
- Neumann K.H. 2000. Some studies on somatic embryogenesis, a tool in plant biotechnology. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/>

Nishiwaki M., Fujino A., Koda Y., Masuda K., Kikuta Y. 2000 Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, 211:756-759.

Nogaard J.V. 1997 Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies normanniana* L.K. **Plant Science**, 124:211-221.

Nomura K., Komamine A. 1995 Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: *In vitro Embryogenesis in Plants* (T.A. Thorpe, ed.). Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands, pp. 249-265.

Normanly J. 1997 Auxin metabolism. **Physiologia Plantarum**, 100:431-442.

Park Y.S. 1998 Implementation of Conifer Somatic Embryogenesis In Clonal Forestry: Technical Requirements And Deployment Considerations. **Annals of Forest Science**, 59:651-656.

Pasternak T., Prinsen E., Ayaydin F., Mischkolezi P., Potters G., Asárd H., van Onckelen Dudits D., Fehér A. 2002. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfafa (*Medicago sativa* L). **Plant Physiology**, 129:1807-1819.

Phillips G.C. 2004 In vitro morphogenesis in plants – recent advances. **In Vitro Cellular Development Biology—Plant**, 40:342–345.

Pistocchi R., Bagni N., Creus J.A. 1987 Polyamine uptake in carrot cell cultures. **Plant Physiology**, 84:374-380.

Pullman G.S., Namjoshi K., Zhang Y. 2003 Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. **Plant Cell Report**, 22:85-95.

Pullman G.S., Johnson S., Peter G., Cairney J., Xu N., 2003 Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. **Plant Cell Report**, 21:747 –758.

- Rains D.W. 1989 Plant tissue and protoplast culture: applications to stress physiology and biochemistry. In: Jone HG, Flowers TJ, Jones MB (eds) **Plants and Stress** . Cambridge University Press. p.181-196.
- Ranarosandratana A., Harvengt L., Bouvet A., Calvaryrac R., Pâques M. 2001 Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (EMS) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. **In vitro Cellular Development Biology – Plant**, 37:29-34.
- Rastogi R., Davies P.J. 2000 Effects of light and plant growth regualtors on polyamine metabolism in higher plants. In: Slocum RD; Flores HE. **Biochemistry and Physiology of Polyamines in plants**. Boca Raton. CRC Press; p.187-199.
- Read S.M., Northcote D.H. 1981 Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, 116:53 – 64.
- Reed J.W. 2001 Roles and activities of auxin/AIA proteins Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, 6:420-425.
- Reitz R., Klein R.M., Reis A. 1978 Projeto Madeira de Santa Catarina. Separata 28 de sellowia–herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí.
- Reitz P.R., Klein R.M. 1966 Araucariáceas. In: Reitz, P. R **Flora Ilustrada Catarinense**, 1:1-55. Conselho Nacional de Pesquisas Departamento de Recursos Renováveis – M.A. Herbário “Barbosa Rodrigues”.
- Ribnicky D.M., Cohen J.D., Hu W., Coke T.J. 2002 An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. **Planta**, 214:505-509.
- Roberts D.R., Sutton B.C.S., Flinn B.S., 1990 Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. **Canadian Journal of Botany**, 68:1086–1090.

Roberts DR., Dumbroff E.B., Thompson J.E. 1986 Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves – a basis for potential misinterpretation of their true physiological role, **Planta**, 167:395-401.

Sánchez-Romero C., Perán-Quesada R., Barceló-Munoz A., Pliego-Alfaro F. 2002 Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. **Plant Physiology and Biochemistry**, 40:1043-1049.

Sandberg G., Crozier A., Ernstsén A. 1987 Indole-3-acetic acid and related compounds. In: Rivier, L.; Crozier, A. (eds), **Principles and practice of plant hormone analysis**. Academic Press, London, p. 169-301.

Santos A.L.W dos. 2000 **Embriogenese Somática em *Araucária angustifolia* (Bert.) O. Kuntze: Pontos de controle e aspectos do metabolismo**. Dissertação de Mestrado, Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, 85p.

Santos A.L.W., Silveira V., Steiner N., Vidor M., Guerra M.P. 2002 Somatic Embryogenesis in Paraná Pine (*Araucária angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian archives of Biology and Technology**, 45:97-106.

Sasaki K., Shimomura K., Kamada H., Harada H. 1994 AIA Metabolism in Embryogenic and non-embryogenic Carrot Cells. **Plant Cell Physiology**, 35:1159-1164.

Sheen J., Leo P. 2003 Sugar and hormone connections. **Trends in Plant Science**, 8:110-116.

Scholten H.J. 1998 Effect of polyamines on the growth and development of some horticultural crops in micropropagation. **Scientia Horticulture**, 77: 83-88.

Schuller A., Kirchner-Neß R., Reuther G. 2000 Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 60:23-31.

Serafini-Fracassini D. 1991 Polyamine biosynthesis and conjugation to macromolecules during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tuber. In: A. S Galston; A. F. Tiburcio (eds). **Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development**. Ediciones Peninsular. Madrid. pp 40-44.

Setoguchi H., Osawa T. A., Pintaud J., Jaffré T., Veillon J. 1998 Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. **Journal of Botany**, 85: 1507.

Sharma P., Rajam M.V. 1995 Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embryogenesis from different hypocotyl segments of egg-plant (*Solanum melongena* L.), **Journal Plant Physiology**, 146:658–664.

Shewry P.R., Napier J. A., Tatham A. S. 1995 Seed storage proteins. Structures and Biosynthesis. **The Plant Cell**, 7: 945.

Shimizu J.Y., Oliveira Y.M.M. 1981 **Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da Araucaria no sul do Brasil**. EMBRAPA-URPFCS. Documentos, 04. Curitiba-PR. 9p.

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

Silveira V., Balbuena T.S., Santa-Catarina C., Floh E.I.S., Guerra M.P., Handro W. 2004a. Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regulation**, 44:147-156.

Silveira V., Floh E.I.S., Handro W., Guerra M.P. 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., Steiner N., Santos A.L.W., Nodari R.O., E Guerra M.P. 2002 Biotechnology tolls in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 2:463 – 470.

Smith M.A., Davies R.J., Reid J.B. 1985 Role of polyamines in giberellin-induced internode growth in pea. **Plant Physiology**, 78:92-99.

Sokal R.R., Rohlf F.J., 1995 Biometry. 3.ed. New York: Freeman and Co; 957p.

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

Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Liu W., Sederoff R.R. 2003 The Effects of Polyethylene Glycol on Gene Expression of Developing White Spruce Somatic Embryos. **Plant Physiology**, 131:49-60.

Steiner N., Silveira V., Santos A.L.W., Guerra M. P. 1999. Mitotic index and growth dynamic of polyembryonic cell lines of *Araucaria angustifolia*. **Genetics and Molecular Biology**, 22:115-115 (suplemento).

Steiner N., Vieira F.doN., Maldonado S., Guerra M.P. 2004. Carbon Source Affects Morphogenesis and Histodifferentiation of *A. angustifolia* Embryogenic Cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology** (*In press*).

Svobodová H., Albrechtová J., Kumstýrová L., Lipavská H., Vágner M., Vondráková Z. 1999. Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. **Plant Physiology Biochemical**, 37:209-221

Szabados L., Mroginski L.A., Roca W.M. 1993 Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones, in: Roca W.M., Mroginski L.A. (Eds.), **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones** CIAT, Cali, pp. 174-210.

Takeda T., Hayakawa F., Kanako Oe., Matsuoka H. 2002 Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal**, 12:21-28.

Tang W., Ouyang F., Guo Z. 1998 Plant regeneration through organogenesis from callus induced from mature zygotic embryos of loblolly pine. **Plant Cell Report**, 17:557-560.

Tassoni A., Antognoni F., Bagni N. 1996 Polyamine binding to plasma membrane vesicles isolated from zucchini hypocotyls. **Plant Physiology**, 110:817-824.

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

- Thomas C., Bronner R., Molinier J., Prinsen E., Van Oncklen H., Hahne G. 2002 Immunocytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. **Planta**, 215:577-583.
- Tiburcio A.F., Kaur-Sawhney R., Ingersoll R.B., Galston A.W. 1985. Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus. **Plant Physiology**, 78:323-326.
- Torrigiani P., Altamura M.M., Capitani F.F., Serafini-Fracassini D., Bagni N. 1989. *De novo* root formation in thin cell layers of tobacco: changes in free and bound polyamines. **Physiology Plant**, 77:294-301.
- Umbreit W.W., Burris R.H. 1964 Method for glucose and other sugars, In: Umbreit, W. W.; Burris R. H.; Stauffer J. P. **Manometric Techniques**, 4, Burguers Publishing Co.
- van den Broeck D., van Der Straeten D., van Montagu M., Caplan A. 1994 A group of chromosomal proteins is specifically released by spermine and loses DNA-binding activity upon phosphorylation. **Plant Physiology**, 106:559-566.
- von Arnold S., Clapham D., Egertsdotter U., Mo L.H. 1996 Somatic embryogenesis in conifers - A case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*. **Plant Growth Regulation**, 20:3-9.
- von Arnold S., Egertsdotter U., Ekberg I., Gupta P., Mo H., Nørgaard J. 1995 Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*), in: Jain, S.; Gupta, P.; Newton, R. **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, 3, Kluwer Publishers, Netherlands.
- 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.
- Weber H., Borisjuk L., Wobus U. 1997 Sugar import and metabolism during seed development. **Trends Plant Science**, 2:169-174.
- Wilkins M.R., Williams K.L., Appel R.D., Hochstrasser D. (Eds.) 1997 **Proteome research: new frontiers in functional genomics**. Springer-Verlag, Berlin, p. 493.

Willians E.G., Maheswaran G. 1986 Somatic embriogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, 57:443-462.

Winter H., Huber S.C. 2000 Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Plants Science**, 19:31-67.

Wobus U., Weber H. 1999 Sugars as signal molecules in plant seed development. **Biological Chemistry**, 380:937-944.

Wu S.C., Kuniyuki A.H. 1997 Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic potential: efficient somatic embryogenesis with putrescine. **Journal Experimental Botany**, 48:1537-1545.

Wurtele E.S., Keller J.I., Nikolau B.J., Ulrich T.U. 1988 Quantification of starch ADP-yrophosphorylase in non-embryogenic cell and embryogenic cell cultures from carrot suspension culture. **Journal of Biochemical Chemistry**, 266:21131-21137.

Yadav J.S., Rajam M.V. 1998. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. **Plant Physiology**, 116:617-625.

Yadav J.S., Rajam M.V. 1997. Spatial distribution and tem-poral changes in free and bound polyamines in relation to somatic embryogenesis from leaf discs of eggplant: influence of exogenous polyamines and their biosynthetic inhibitors, **Journal Experimental Botany**, 48:1537-1545.

Yu S.M., Kuo Y.H., Sheu G., Liu L.F. 1991 Metabolic derepression of alpha-amylase gene expression in suspension-cultured cells of rice. **Journal of biochemical Chemistry**, 266:21131-21137.

Zee S.Y., Wu S.C. 1979 Embryogenesis in the petiole explants of Chinese celery. **Pflanzenphysiology**, 93:325-335.

Zoglauer K., Behrendt U., Rahmat A., Ross H., Taryono. 2002 Somatic embryogenesis – the gate of biotchnology in conifers In: Rucker, W.; Laimer, H.: **Plant tissue culture one hundred years after Gottlib Haberlandt**. Springer-Verlag, im Druck.