



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

Gabriela Claudia Cangahuala Inocente

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E
PROTEOMICA DA EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA E
SOMÁTICA DE GOIABEIRA SERRANA (*Acca sellowiana* (O.
Berg.) Burret).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Florianópolis
2007

Cangahuala-Inocente, Gabriela Claudia –

Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret). / Gabriela C. Cangahuala Inocente. – Florianópolis, 2007.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais UFSC/Centro de Ciências Agrárias/Departamento de fitotecnia.

Área de concentração: Recursos Genéticos Vegetais

Linha de Pesquisa: Fisiologia vegetal – Biotecnologia vegetal

Orientador: Miguel Pedro Guerra.

Versão do título para o inglês:

Descritores: 1. *Acca sellowiana* 2. Embriogênese somática 3. Proteoma

“Sou eu que estou mandando que você seja firme e corajoso. Portanto, não tenha medo e não se acovarde, porque o Senhor, seu Deus está com você aonde quer que você vá.”

Josué 1:9.

Dedico este trabalho a meu esposo, David e a minha filha Nadia Fernanda. Obrigado por serem a fonte de inspiração em todo momento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque sem sua presença na minha vida, nada teria sentido. Obrigado Padre por a culminação de uma meta e por o começo de um grande sonho, de ser mãe.

Ao professor Guerra, que desde o primeiro momento me ajudo em minha formação e aprendizagem em minha vida profissional, obrigada pelas sugestões e conselhos, assim como sua amizade.

Aos todos os professores do programa de Recursos Genéticos Vegetais, que estiveram atentos em minha aprendizagem e estadia em Florianópolis, obrigados por suas apreciações na minha formação.

Ao Pesquisador Jean Pierre Ducroquet, que sem sua ajuda, o projeto desta tese não sairia do papel. Obrigado por seu tempo e a disponibilidade da coleta do material biológico estudado. De igual maneira, ao Técnico Humberto Nunes Ribeiro por sua disponibilidade de seu tempo nas coletas realizadas em São Joaquim.

Ao professor Hernan Terenzi, por sua ajuda no começo numa nova área do conhecimento, a Proteoma; assim como por as sugestões e conselhos. De igual forma a Andréa Villarino por toda sua orientação nesta nova área e sua amizade.

A professora Eny A. I. Floy, pela disponibilidade do Laboratório de Biologia Celular da USP, assim como a toda a equipe técnica do laboratório.

Aos Doutores Vanildo Silveira e Claudete Santa Catarina, pela amizade e auxílio nos análises bioquímicos realizados na USP, assim como pelas sugestões nos trabalhos realizados.

Aos professores Emanuel Maltempi de Souza e Fabio Pedrosa pela disponibilidade do Laboratório de proteoma da UFPr. De igual forma a doutoranda Daniela Seixas, pela paciência e disponibilidade de tempo na análise no Malditof.

Aos companheiros e amigos do LFDGV, a Luisa pelo apoio técnico, a Lírio por sua experiência, sugestões e conselhos, a Adriana por seus conselhos na área de genética molecular, a amigos que já não se encontram no Laboratório a Douglas por suas múltiplas conversas, e a Richard por sua ajuda pratica quando o precise.

A Neusa por sua ajuda e companheirismo no inicio do trabalho, assim como sua amizade incondicional nos momentos que mais o precise. A Clarissa por sua ajuda na realização deste trabalho, sem sua ajuda meu houvesse estressado ainda mais.

A meus pais, porque sem seu amor e apoio incondicional, não estaria aqui. Obrigada mãe por teu amor e sacrifício em toda minha vida. Obrigado pai por teu apoio e incentivo de superação sempre.

A meu Amor, David, que com seu amor, compreensão, incentivo e apoio em todo momento, consegui culminar esta meta. “Gracias por todos los momentos vividos”.

A minha filha Nadia Fernanda, obrigado meu amor por compreender a tua mãe e dar-lhe o tempo necessário para terminar o que começo. Tu eres o melhor logro que conquiste no tempo do doutorado.

E a todos, que de uma ou outra forma me apoiaram na realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina, por brindar-me a oportunidade de estudar gratuitamente numa universidade de prestígio com professores competentes.

A CAPES, por a concessão da bolsa, que foi um incentivo a mais para a culminação deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	2,4 ácido dicloro fenol acético
2-iP	2 isopenteniladenina
2-DE	Eletroforese bidimensional
ABA	Ácido abscísico
AG ₃	Ácido giberélico
AIA	Ácido indol acético
ANA	Ácido α -naftaleno acético
Asn	Asparagina
Arg	Arginina
ATM	atmosfera
AT-O	Azul de Toluidina
BAP ou BA	6 Benzilaminopurina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CBB	Azul brilhante de Coomassie
ES	Embriões somáticos
Glu	Ácido glutâmico
Gln	Glutamina
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IEF	enfoque isoelétrico
KIN	Cinétina
kDa	Kilodaltons
MCW	Metanol:Clorofórmio:Água
MS	Murashige e Shoog, 1962
N	Nitrogênio
PEG	Polietilenoglicol 3350
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PAs	Poliaminas endógenas
Put	Putrescina
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
SNK	Neuwan-Keuls

SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloro acético
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume
w/v	peso/volume
W	Watts
%	Percentagem média
°C	Graus Celsius

Lista de Figuras

Pág.

Seção I

Figura 1. Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática. **A)** Estabelece condições básicas para a obtenção de ciclos repetitivos de divisão celular e **B)** Estabelece condições básicas para a progressão e maturação dos embriões somáticos e posterior regeneração de plantas. Adaptado de Durzan (1988) e Guerra *et al.*, (1999). 7

Seção II, Capítulo 1

Figura 1. Indução de culturas embriogênicas e não embriogênicas de *A. sellowiana*. **A)** a partir do estilete em meio de cultura com 2,4-D 10 μ M, **B)** com TDZ 40 μ M aos 90 dias de cultura, **C)** a partir de filete do acesso 101x458; **D)** a partir de pétala; **E)** e **F)** Cultura embriogênica do acesso 101x458a obtida no meio de cultura com 2,4-D 20 μ M e BAP 1 mg.L⁻¹. Seta mostrando grupo de células reagindo fortemente ao carmim acético e revelando características embriogênicas. Barra = 0,5 cm 27

Figura 2. Indução de culturas embriogênicas de *A. sellowiana* a partir de pétala do acesso 101x458a em resposta aos fitorreguladores Picloram, Dicamba e 2,4-D aos 90 dias de cultivo. Letras diferentes em minúsculas e maiúsculas são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de três repetições. 30

Figura 3. Indução de culturas embriogênicas por agentes físicos a partir das folhas cotiledonares do embrião zigótico. **A)** meio de cultura com 2,4-D 4 μ M submetido a 45°C por 5h, **B)** meio de cultura com 2,4-D 4 μ M a temperatura de 25°C aos 15 dias de cultura. 31

Seção II, Capítulo 2

Figura 1: Embriogênese somática de *A. sellowiana*. **A)** Embriões somáticos induzidos sobre as folhas cotiledonares do embrião zigótico usado como explante e induzidos em meios de cultura suplementados com glicose. **B)** Diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático. **C)** Conversão à plântula dos embriões somáticos originados em meio de cultura suplementados com maltose. **D)** Embriões somáticos pré-germinados submersos em alginato de sódio (3%). **E)** Embriões somáticos encapsulados nos diferentes tratamentos de endosperma artificial. **F)** Plântulas completas a partir da técnica de semente sintética *ex vitro*. **G)** Planta desenvolvida com cinco meses de idade em casa de vegetação. Abrev.: c, cordiforme. Barra: B) 1 cm. B1) 1 mm. 45

Figura 2. Indução de embriogênese somática com diferentes fontes de carbono. **A)** Percentagem média de indução de embriogênese somática (% de ES) e **B)** Número de embriões somáticos por explante (N° de E S) de *A. sellowiana* em resposta a diferentes fontes de carbono na concentração de 3% doze semanas após indução. Médias seguidas por diferentes letras são diferentes estatisticamente entre si segundo o teste SNK (95%). 46

- Figura 3.** Indução de embriogênese somática com diferentes concentrações de maltose. **A)** Percentagem média de indução de embriogênese somática (% ES) e **B)** Número de embriões somáticos por explante (Nº de ES) de *A. sellowiana* em resposta a meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de maltose após 6, 9 e 12 semanas de indução. Médias seguidas por diferentes letras são estatisticamente diferentes entre si, segundo o teste SNK (95%). **47**
- Figura 4:** Concentração média de: **A)** poliaminas totais (PAs) em µg/g de matéria fresca (MF) e **B)** Razão de PAs: Put (Spd+Spm)⁻¹ em resposta a diferentes fontes de carbono durante a indução e desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*, (média ± desvio padrão, n=3). **49**
- Figura 5:** Concentração média de poliaminas: **A)** livres e **B)** conjugadas (µg/g) de matéria fresca (MF) em resposta a diferentes fontes de carbono durante a indução e desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*, (média ± desvio padrão, n=3). **50**

Seção III, Capítulo 1

- Figura 1:** Desenvolvimento da semente de *A. sellowiana* após a polinização dirigida. 0 DAP: botão floral na fase balão, 21 DAP: formação do embrião zigótico com sucessivas divisões celulares originando um proembrião, 30 DAP: embrião zigótico no estágio globular, 45 DAP: embrião zigótico no estágio cordiforme, 60 DAP: embrião zigótico no estágio torpedo com endosperma ainda líquido, 75 DAP: embrião zigótico no estágio cotiledonar com presença de endosperma, 90, 105 e 120 DAP: embrião zigótico no estágio cotiledonar sem presença de endosperma. Barra = 1 mm. **62**
- Figura 2.** Seções histológicas do processo de embriogênese zigótica de *A. sellowiana*. a) rudimento seminal do fruto imaturo 0 DAP, corado com AT-O, b) detalhe da abertura da micrópila e a presença de dos tegumentos de proteção, c) formação do pró-embrião no fruto imaturo, d) células do suspensor e do proembrião, e) fruto imaturo aos 30 DAP, observando-se o embrião zigótico em estágio globular, f) detalhe do embrião zigótico em estágio globular e a presença do tegumento externo de proteção. Barra = 10 µM. **68**
- Figura 3:** Seções histológicas do processo de embriogênese zigótica de *A. sellowiana*. a) Fruto imaturo aos 45 DAP observando-se o embrião zigótico em estágio cordiforme, b) detalhe do embrião zigótico em estágio cordiforme e a presença da protoderme, c) seção longitudinal do embrião zigótico no estágio cotiledonar inicial aos 75 DAP, d) seção longitudinal do embrião zigótico no estágio cotiledonar aos 90 DAP, e) detalhe do meristema radicular, f) detalhe do meristema apical. Notar que as células das folhas cotiledonares são pouco espessadas. **69**
- Figura 4.** Concentração média de proteínas totais, amido e açúcares totais (mg/g) de Matéria fresca (MF) durante a formação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, (média ± desvio padrão, n=3). **70**
- Figura 5.** Aminoácidos totais durante a formação e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, antes da polinização (tempo 0) e dias após polinização (DAP) (média ± desvio padrão, n=3). **71**
- Figura 6.** Aminoácidos livres durante a formação e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, antes da polinização (tempo 0) e após **72**

- polinização (DAP). **A.** Asn; **B.** Gln; **C.** Arg; **D.** Gaba; **E.** Ala **F.** Ser; **G.** Asp; **H.** His; **I.** Glu; **J.** Met. (média ± desvio padrão, n=3).
- Figura 7.** Aminoácidos livres durante a formação e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, antes da polinização (tempo 0) e após polinização (DAP). **A.** Tre; **B.** Leu; **C.** Gly; **D.** Phe; **E.** Tir; **F.** Ile; **G.** Val; **H.** Lis; **I.** Trp; **J.** Orn. (média ± desvio padrão, n=3). 73
- Figura 8.** Concentração média de **A)** poliaminas totais (µg/g) de matéria fresca (MF) e **B)** Razão do PÁS: Put (Spd+Spm)⁻¹ durante o desenvolvimento e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, (média ± desvio padrão, n=3). 75
- Figura 9.** Concentração média de poliaminas **A)** livres e **B)** conjugadas (µg/g) de Matéria fresca (MF) durante o desenvolvimento e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, (média ± desvio padrão, n=3). 76
- Figura 10.** Concentração média de **A)** AIA e **B)** ABA (µg.g⁻¹) de Matéria fresca (MF) durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *A. sellowiana*, (média ± desvio padrão, n=3). 77
- Figura 11:** Resumo das mudanças bioquímicas da embriogênese zigótica de *A. sellowiana*. 78

Seção III, Capítulo 2

- Figura 1.** Proteínas totais, amido e açúcares totais durante a indução da embriogênese somática *A. sellowiana* ao longo dos primeiros 30 dias em cultura (média ± desvio padrão, n=3). 91
- Figura 2.** Aminoácidos livres totais durante a indução da embriogênese somática de *A. sellowiana* ao longo dos primeiros 30 dias em cultura (média ± desvio padrão, n=3). 92
- Figura 3.** Aminoácidos livres durante a indução da embriogênese somática de *A. sellowiana* ao longo dos primeiros 30 dias em cultura. **A.** Gln; **B.** Arg; **C.** Asn; **D.** Gaba; **E.** Glu; **F.** His; **G.** Asp; **H.** Ala; **I.** Ser; **J.** Gly. (média ± desvio padrão, n=3). 93
- Figura 4.** Aminoácidos livres durante a indução da embriogênese somática de *A. sellowiana* ao longo dos primeiros 30 dias em cultura. **A.** Leu; **B.** Lis; **C.** Val; **D.** Tre; **E.** Phe; **F.** Ile; **G.** Trp; **H.** Met; **I.** Tir; **J.** Orn. (média ± desvio padrão, n=3). 94
- Figura 5.** Concentração média de **A)** poliaminas totais (µg/g) de matéria fresca (MF) e **B)** Razão do PÁS: Put (Spd+Spm)⁻¹ durante a indução da embriogênese somática de *A. sellowiana*, ao longo de 30 dias em cultura (média ± desvio padrão, n=3). 95
- Figura 6.** Concentração média de poliaminas **A)** livres e **B)** conjugadas (µg/g) de MF durante a indução a embriogênese somática de *A. sellowiana*, ao longo de 30 dias em cultura (média ± desvio padrão, n=3) 96
- Figura 7.** Proteínas totais, amido e açúcares totais (mg/g) de Matéria fresca (MF) nos diferentes estágios de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*; C: cordiforme, T: torpedo, PT: pré-cotiledonar e CT: Cotiledonar (média ± desvio padrão, n=3). 97
- Figura 8.** Aminoácidos livres totais nos diferentes estágios de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*; C: cordiforme, T: torpedo, PT: pré-cotiledonar e CT: Cotiledonar (média ± desvio padrão, n=3). 98

Figura 9. Aminoácidos livres nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> ; C: cordiforme, T: torpedo, PT: pré-cotiledonar e CT: Cotiledonar. A. Arg; B. Asn; C. Gln; D. Ser; E. Glu; F. Gaba; G. His; H. Asp; I. Ala; J. Leu. (média ± desvio padrão, n=3)	99
Figura 10. Aminoácidos livres nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> ; C: cordiforme, T: torpedo, PT: pré-cotiledonar e CT: Cotiledonar. A. Phe; B. Lis; C. Val; D. Trp; E. Ile; F. Gly; G. Tre; H. Met; I. Tir. (média ± desvio padrão, n=3).	100
Figura 11. Concentração média de: A) PAs totais (µg/g) de Matéria fresca (MF) e B) razão de Put/(Spd+Spm) nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> ; C: cordiforme, T: torpedo, PT: pré-cotiledonar e CT: Cotiledonar, (média ± desvio padrão, n=3).	101
Figura 12. Concentração média de poliaminas: A) livres e B) conjugadas (µg/g) de Matéria fresca (MF) nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> ; C: cordiforme, T: torpedo, PT: pré-cotiledonar e CT: Cotiledonar (média ± desvio padrão, n=3).	102
Figura 13. Concentração de ABA (µg.g ⁻¹) de Matéria fresca (MF) nos estádios torpedo e cotiledonar de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> .	103
Figura 14: Resumo das mudanças bioquímicas durante a indução de embriogênese somática de <i>A. sellowiana</i> .	104
Figura 15: Resumo das mudanças bioquímicas durante os estádios de desenvolvimento do embrião somático <i>A. sellowiana</i> .	105

Seção III, Capítulo 3

Figura 1. Concentrações médias de proteínas totais, açúcares totais e amido (mg/g) de matéria fresca (MF) durante a germinação do: A) embrião zigótico e B) somático de <i>A. sellowiana</i> .	118
Figura 2. Concentrações médias de: A) Proteínas totais, B) Açúcares totais e C) Amido (mg/g) de matéria fresca (MF) durante a germinação e conversão dos embriões zigóticos e somáticos de <i>A. sellowiana</i> .	119
Figura 3. Concentrações médias de: A) AIA e B) ABA (µg/g de matéria fresca) endógenos durante a germinação e conversão dos embriões zigóticos e somáticos de <i>A. sellowiana</i> .	120
Figura 4: Resumo das mudanças bioquímicas durante a germinação do embrião zigótico e conversão do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> .	122

Seção IV, Capítulo 1

Figura 1: Embriogênese somática de <i>Acca sellowiana</i> . A) Embriões somáticos sobre os cotilédones expandidos do embrião zigótico. Esquerda: estádios de desenvolvimento <i>in vivo</i> do embrião somático. Direita: Seções histológicas dos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático. B, C) embrião somático no estágio globular; D, E) embrião somático no estágio cordiforme; F, G) embrião somático no estágio torpedo; H, I) embrião somático no estágio pré-cotiledonar e J) embrião somático no estágio cotiledonar.	133
Figura 2: Gel unidimensional de poliacrilamida SDS 12% com os dois métodos de extração fenol e TCA/acetona.	134
Figura 3. Proteínas totais (µg/mg MF) ao longo de diferentes estádios de	135

















desenvolvimento do embrião somático do acesso 101x458 de <i>A. sellowiana</i> segundo a metodologia de Bradford.	
Figura 4: Estádios de desenvolvimento do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> em gel unidimensional de poliacrilamida SDS 12% extraídos pelo método por fenol.	136
Figura 5: Gel 2-D do estágio globular do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> mostrando os 47 spot detectados entre as três repetições feitas.	137
Figura 6: Gel 2-D do estágio cordiforme do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> mostrando os 50 spots detectados entre as três repetições feitas.	138
Figura 7: Gel 2-D do estágio torpedo do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> mostrando os 43 spots detectados entre as três repetições feitas.	139
Figura 8: Gel 2-D do estágio precotiledonar do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> mostrando os 48 spots detectados entre as três repetições feitas.	140
Figura 9: Gel 2-D do estágio cotiledonar do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> mostrando os 28 spots detectados entre as três repetições feitas	141
Figura 10: Distribuição dos pI e PM das proteínas detectadas nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> .	142
Figura 11: Spot e regiões diferenciais nos estádios de desenvolvimento do embrião somático. a) estágio globular, b) estágio cordiforme, c) estágio torpedo, d) estágio precotiledonar e e) estágio cotiledonar.	143
 Seção IV, Capítulo 2	
Figura 1. Proteínas totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MF) nos estádios maduros do embrião somático do acesso 101x458 de <i>A. sellowiana</i> segundo a metodologia de Bradford.	175
Figura 2: Géis 2-D de diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> : a) estágio torpedo, b) estágio precotiledonar e c) estágio cotiledonar.	176
Figura 3. Percentagem de volume normalizado da expressão de algumas proteínas ao longo de diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> .	178
Figura 4. Distribuição dos pI e PM das proteínas identificadas em diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> .	185
Figura 5: Dispersão dos valores teóricos e experimental dos pesos moleculares (PM) e ponto isoelétrico (pI) para cada proteína identificada em embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> . A correlação ideal é indicada pela linha diagonal sólida. Regressão linear, representado pelas linhas cortadas, foi usada para calcular a tendência de cada estágio. A equação e o valor R^2 das tendências foram escritos em cada figura.	186
Figura 6: Classificação ontológica das proteínas diferenciais de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> em termos de: a. função, b. processo biológico e c. componente celular. Cada proteína da tabela foi buscada no banco de dados da proteômica, ExPASy (Expert Protein Analysis System) servidor	188

do instituto de Bioinformatica Swiss (<http://ca.expasy.org>). A porcentagem indica que proporção do total de números de términos ontológicos é contida dentro de cada categoria.





Lista de Tabelas

	Pág.
Seção II, Capítulo 1	
Tabela 1. Percentagem média de Indução de calo a partir do estilete e filete do acesso 101x458a de <i>A. sellowiana</i> em resposta a diferentes fitorreguladores.	25
Tabela 2. Percentagem média de Indução de calo a partir do estilete e filete do acesso 101x458b de <i>A. sellowiana</i> em resposta a diferentes fitorreguladores.	25
Tabela 3. Percentagem média de Indução de calo a partir do estilete e filete do acesso 101a de <i>A. sellowiana</i> em resposta a diferentes fitorreguladores.	26
Tabela 4. Percentagem média de Indução de calo a partir do estilete e filete do acesso 101b de <i>A. sellowiana</i> em resposta a diferentes fitorreguladores.	26
Tabela 5. Percentagem média de Indução de calo a partir do estilete e filete do acesso 458 de <i>A. sellowiana</i> em resposta a diferentes fitorreguladores.	27
Tabela 6. Percentagem média de Indução de calo a partir a partir do estilete e do filete em resposta a diferentes fitorreguladores (A) e acessos coletados (B) de <i>A. sellowiana</i>	28
Tabela 7. Percentagem média de Indução de calo a partir do estilete, filete e pétala do acesso 101x458 de <i>A. sellowiana</i> em resposta ao 2,4-D e as citocininas BAP e 2-iP.	29
Tabela 8. Percentagem média de Indução de calo a partir do estilete, e filete do acesso 101x458 de <i>A. sellowiana</i> em resposta a diferentes tipos (picloram, dicamba e 2,4-D) e níveis (2, 20 e 200 μ M) de auxinas.	30
Tabela 9. Percentagem média de indução de calo a partir do embrião zigótico acesso 101x458 de <i>A. sellowiana</i> em resposta ao estresse por temperatura e baixas concentrações de 2,4-D aos 15 e 30 dias.	32
Tabela 10. Percentagem média de indução de embriogênese somática e número de embriões somáticos a partir do embrião zigótico acesso 101x458a de <i>A. sellowiana</i> em resposta ao estresse por temperatura e baixa concentrações de 2,4-D aos 30, 45 e 60 dias.	33
Tabela 11. Percentagem média de indução de culturas embriogênicas e número de embriões somáticos a partir do embrião zigótico acesso 101x458a de <i>A. sellowiana</i> em resposta ao estresse por osmorreguladores aos 30 e 45 dias.	34
Seção II, Capítulo 2	
Tabela 1: Percentagem média de conversão à plântula de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> provenientes de diferentes fontes de carbono (3%) aos 15 e 30 dias.	48
Tabela 2: Percentagem média de emergência da plântula proveniente de sementes sintéticas contendo embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> em resposta a diferentes endospermas artificiais aos 15 e 30 dias.	51

Seção IV, Capítulo 1

Tabela 1. Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g}/\text{ul}$) dos embriões zigóticos (EZ) do acesso 101x458 de <i>A. sellowiana</i> segundo a metodologia de Bradford.	134
Tabela 2: Spots localizados entre os cinco estádios de desenvolvimento do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> . Globular  , Cordiforme  , Torpedo  , Pré-cotiledonar  , Cotiledonar 	145
Tabela 3: Spots localizados entre os estádios Cordiforme  , Torpedo  , Pré-cotiledonar  e Cotiledonar do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> . 	147
Tabela 4: Spots localizados entre três estádios de desenvolvimento do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> .	150
Tabela 5: Spots localizados entre os estádios Torpedo  , Pré-cotiledonar  e Cotiledonar  do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> .	151
Tabela 6: Spots localizados entre o estágio globular e cordiforme do embrião somático de <i>A. sellowiana</i>	152
Tabela 7: Spots localizados entre os estádios cordiforme e torpedo do embrião somático de <i>A. sellowiana</i>	152
Tabela 8: Spots localizados nos estádios torpedo  e pré-cotiledonar  , do embrião somático de <i>Acca sellowiana</i> .	153
Tabela 9: Spots localizados nos estádios pré-cotiledonar  e cotiledonar  do embrião somático de <i>Acca sellowiana</i> .	155
Tabela 10: Spots exclusivos dos estádios de desenvolvimento do embrião somático de <i>A. sellowiana</i> .	157

Seção IV, Capítulo 2

Tabela 1: Spots localizados nos estádios torpedo  e pré-cotiledonar  do embrião somático de <i>Acca sellowiana</i>	179
Tabela 2: Spots localizados nos estádios precotiledonar  e cotiledonar  do embrião somático de <i>Acca sellowiana</i>	180
Tabela 3: Proteínas identificadas nos estádios maduros do embrião somático de <i>Acca sellowiana</i>	182

INDICE

Lista de abreviaturas	ii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	ix
SEÇÃO I: Introdução e justificativa	1
Revisão bibliográfica	5
<i>Acca sellowiana</i>	5
Metabolismo da embriogênese	5
Proteínas	8
Aminoácidos	8
Amido	9
Poliaminas	10
Ácido indol-3-acético	11
Ácido abscísico	11
Sementes artificiais ou sintéticas	12
Proteoma	13
Embriogênese somática de <i>Acca sellowiana</i>	14
HIPOTESE	17
OBJETIVOS	18
SEÇÃO II: Cultivo <i>in vitro</i> da goiabeira serrana	19
Resumo	20
Abstract	21
Capítulo 1: Embriogênese somática induzida por estresse químico e físico a partir explantes de diversas origens de <i>Acca sellowiana</i>	22
Introdução	22
Material e métodos	23
Resultados	24
Aspectos químicos	24
A. Fitorreguladores e acessos	24
B. 2,4-D e citocininas	28
C. Efeitos do 2,4-D, Picloram e Dicamba	28
Aspectos físicos	31
A. Temperatura e 2,4-D	31
B. Osmorreguladores	31
Discussão	34
A. Indução de embriogênese somática por estresse químico	34
B. Indução de embriogênese somática por estresse físico	36
Conclusões	38
Capítulo 2: Influência da fonte de carbono na conversão e nas poliaminas endógenas, assim como utilização do endosperma artificial na conversão <i>ex vitro</i> dos embriões somáticos de <i>Acca sellowiana</i>	39
Introdução	39
Material e métodos	40

Resultados	44
A. Indução	44
A.1 Fontes de carbono	44
A.2 Diferentes concentrações de maltose	44
B. conversão	44
C. PAs endógenas	48
D. Semente sintética <i>ex vitro</i>	51
Discussão	52
Conclusões	55
SEÇÃO III: Estudos bioquímicos da embriogênese somática de <i>A. sellowiana</i>	57
Resumo	58
Abstract	59
Capítulo 1: Aspectos histológicos e bioquímicos da embriogênese zigótica de <i>A. sellowiana</i>	60
Introdução	60
Material e métodos	61
Resultados	67
A. Formação dos embriões somáticos	67
B. Proteínas, açúcares totais e amido	70
C. Aminoácidos	71
D. Poliaminas	74
E. AIA e ABA	77
Discussão	77
A. Formação dos embriões somáticos	77
B. Proteínas, açúcares totais e amido	79
C. Aminoácidos	80
D. Poliaminas	82
E. AIA e ABA	85
Conclusões	86
Capítulo 2: Variações bioquímicas da embriogênese somática e dos estádios de desenvolvimento do embrião somático de <i>Acca sellowiana</i>	87
Introdução	87
Material e métodos	87
Resultados	89
A. Durante a indução da embriogênese somática	89
A.1 Proteína, açúcares e amido	89
A.2 Aminoácidos	90
A.3 Poliaminas	91
B. Durante os estádios de desenvolvimento do embrião somático	95
B.1 Proteína, açúcares e amido	95
B.2 Aminoácidos	96
B.3 Poliaminas	97
B.4 ABA	102
Discussão	102
A. Durante a indução da embriogênese somática	102
A.1 Proteína, açúcares e amido	102
A.2 Aminoácidos	103

A.3 Poliaminas	105
B. Durante os estádios de desenvolvimento do embrião somático	106
B.1 Proteína, açúcares e amido	106
B.2 Aminoácidos	107
B.3 Poliaminas	109
B.4 ABA	110
Conclusões	111
Capítulo 3: Aspectos bioquímicos e hormonais durante a germinação dos embriões zigóticos e somáticos de <i>Acca sellowiana</i>.	112
Introdução	112
Material e métodos	113
Resultados	114
A. Proteínas, açúcares totais e amido	114
B. AIA e ABA	117
Discussão	117
A. Proteínas, açúcares totais e amido	117
B. AIA e ABA	122
Conclusões	123
SEÇÃO IV: Análise proteômicos da embriogênese somática de goiabeira serrana	129
Resumo	130
Abstract	131
Capítulo 1: Obtenção dos mapas protéicos nos estádios de desenvolvimento do embrião somático de <i>A. sellowiana</i>	132
Introdução	
Material e métodos	
Resultados	
A. Estádios de desenvolvimento da embriogênese somática	
B. Protocolo de extração compatíveis com a 2DGE de proteínas	
C. Similaridade e diferença entre os estádios de desenvolvimento	
Discussão	
A. Metodologia utilizada para a 2-DE	
B. Comparação proteômica dos embriões somáticos	
Proteínas comuns a todos os estádios	
Proteínas comuns a quatro estádios	
Proteínas comuns a três estádios	
Proteínas comuns a dois estádios	
Proteínas localizadas num só estágio	
Conclusões	
Capítulo 2: Análise proteômica de diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de <i>Acca sellowiana</i>	
Introdução	
Material e métodos	
Resultados	
A. Dinâmica das proteínas embrionárias por eletroforese bidimensional	
B. Identificação de proteínas por “fingerprint com tripsina / MALDI-	

Tof”

C. Classificação das proteínas identificadas

Discussão

A. Importância dos estudos sobre embriogênese somática da *A. sellowiana*

B. Comparação dos perfis de proteínas entre os estádios de desenvolvimento do embrião somático

B.1 Estádios torpedo do embrião somático

B.2 Estádios pré-cotiledonar do embrião somático

C. Significado funcional das proteínas expressas diferencialmente

Proteínas do metabolismo de carboidrato

Proteínas de biossíntese de purinas

Proteínas de divisão celular

Proteínas do metabolismo secundário

Proteínas de transporte celular

Proteínas sem função definida

Conclusões

SEÇÃO V: Considerações finais e perspectivas futuras

Referencia Bibliográfica

SEÇÃO I

Introdução e Justificativa

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret) é uma planta com origem no sul do Brasil e norte do Uruguai. A fragmentação dos ecossistemas nos quais ela ocorre naturalmente tem sido motivo de preocupação no que tange principalmente à sua erosão genética. Seus frutos doce-acidulados apresentam qualidade peculiar entre as plantas frutíferas. Essa espécie já é cultivada comercialmente em vários países do mundo, entre os quais a Nova Zelândia, a Colômbia e a Geórgia.

As novas biotecnologias associadas às técnicas de cultura de tecidos vegetais apresentam grande potencial de uso para o melhoramento e a conservação de germoplasma vegetal. Estas técnicas são ferramentas auxiliares para o desenvolvimento e a propagação massal de genótipos superiores, bem como para o estabelecimento de bancos de germoplasma, visando à manutenção da variabilidade genética das populações naturais (GUERRA *et al.*, 1999; PARK, 2002).

A embriogênese somática é uma das principais técnicas de cultura *in vitro*. Nos últimos anos foram estabelecidos avanços no desenvolvimento de protocolos para esta rota morfogênica *in vitro* em plantas perenes tais como *Carya illinoensis* (RODRIGUEZ E WETZSTEIN, 1998), *Eucalyptus nitens* (BANDYOPADHYAY E HAMILL 2000), *Holostemma adakodien* (MARTIN, 2003), *Ocotea catharinensis* (MOSER *et al.*, 2004), assim como para espécies de coníferas *Cedrus libani* (KHURI *et al.*, 2000), *Pinus pinaster* (RAMAROSANDRATANA *et al.*, 2001), *Araucaria angustifolia* (SANTOS *et al.*, 2002) e *Pinus taeda* (PULLMAN *et al.*, 2003).

A embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica, no qual uma célula isolada ou um pequeno grupo de células somáticas são os precursores dos embriões (TAUTORUS *et al.*, 1991). A embriogênese somática, além de permitir a propagação massal visando à conservação e o melhoramento genético também pode ser utilizada como um modelo referência para estudos básicos de biologia do desenvolvimento (DAL VESCO E GUERRA, 2001).

Comparativamente às demais técnicas de micropropagação baseadas na organogênese, a embriogênese somática apresenta algumas vantagens, pois permite: a) a obtenção de grande quantidade de propágulos; b) alto grau de automatização, possibilitando baixar os custos por unidade produzida; c) a produção de embriões somáticos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e

conformidade clonal (true-to-type); d) a integração de técnicas associadas à tecnologia de sementes sintéticas.

A embriogênese apresenta uma rota de desenvolvimento complexa que inicia o ciclo de vida das plantas superiores. Durante sua ontogênese, uma célula inicial usa o seu potencial genético em divisões celulares complexas e consecutivas que resultam em um organismo pluricelular. Assim, este processo configura um modelo biológico importante para estudos associados à competência celular, histogênese e histodiferenciação.

O desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática está relacionado aos avanços no conhecimento dos eventos que ocorrem durante a embriogênese zigótica. Nas angiospermas, a embriogênese zigótica inicia-se com uma dupla fertilização que ocorre no rudimento seminal maduro gerando o embrião e o endosperma simultaneamente. O zigoto apresenta polaridade característica, com um vacúolo no pólo micropilar, enquanto no pólo calazal se encontra o núcleo e a maior parte do citoplasma, como observado em *Ensete superbum* (MATHEW E PHILIP, 2003). Nesta espécie, observou-se que esta característica é própria da embriogênese zigótica, uma vez que a polarização foi ausente na embriogênese somática.

Ao longo da embriogênese ocorrem alterações no conteúdo hormonal e na síntese e acúmulo de substâncias de reserva. Postula-se que a auxina ácido indolil-3-acético (AIA) atua de forma proeminente na embriogênese zigótica (RIBNICKY *et al.*, 2002). Os embriões zigóticos globulares, devido ao seu reduzido tamanho, são de difícil isolamento, dificultando a obtenção de quantidades suficientes para análises bioquímicas (DODEMAN *et al.*, 1997). Diferenças fisiológicas e anatômicas ocorrem entre culturas embriogênicas e não embriogênicas, entre essas salientam-se os teores hormonais endógenos (RIBNICKY *et al.*, 2002).

O AIA é a principal auxina natural e, no entanto, pouco se conhece sobre os seus teores nos tecidos vegetais (BANDURSKI *et al.*, 1995). As auxinas exercem funções nos processos de alongamento celular, início da divisão celular, definição de órgãos e promoção da diferenciação do sistema vascular (GASPAR *et al.*, 1996). Muitos dos seus efeitos são dependentes do transporte e nos órgãos e tecidos (FISCHER-IGLESIAS *et al.*, 2001).

Embora tenham ocorrido avanços notáveis na elucidação dos mecanismos associados à modulação de sistemas embriogenéticos pouco se sabe sobre os

marcadores associados aos pontos críticos deste processo. Estudos básicos do metabolismo celular durante a embriogênese zigótica e somática de *Acca sellowiana*, a partir da reconstituição *in vitro* dos eventos fisiológicos e bioquímicos envolvidos podem permitir a elucidação dos pontos de controle desta rota morfogênética *in vitro*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Acca sellowiana

A família das mirtáceas possui aproximadamente 3000 espécies distribuídas em 130 gêneros originários de regiões de clima subtropical e tropical. Esta família tem importância econômica por fazer parte dela espécies de grande interesse e utilidade, como é o caso do camu-camu (*Myrciaria dubia*), goiabeira serrana (*A. sellowiana*), *Eugenia spp.*, *Campomanesia spp.*, e *Eucalyptus spp.*

Feijoa sellowiana foi classificada inicialmente por Berg (Hooker, 1898), que a incluiu em Myrtaceae (CANHOTO E CRUZ, 1996). Mais tarde foi ela renomeada como *Acca sellowiana* (Berg) Burret (LADRUM, 1986). O gênero *Acca* ocorre na América Tropical encontra-se representado por três espécies: *Acca sellowiana*, sin. *Feijoa sellowiana* O. Berg, distribuída no sul do Brasil e no norte do Uruguai; *A. lanuginosa* (Ruiz e Pavon ex. G. Don) McVough, conhecida também como *A. peruviana* O. Berg ou *A. velutina* Burret (*Psidium lanuginosum* Ruiz e Pav. ex G. Don), descrita por A. Weberbauer em 1909, com ocorrência na região andina do rio Pinko, Andahuaylas – Apurimac a 2700 m de altitude no Peru e *A. macrostema* (Ruiz et Pavon ex.G. Don) McVough também denominada de *A. dominguensis* O. Berg, *Eugenia acka* DC. ou *Myrtus acka* Jussieu ex DC ou *Psidium macrostemun* Ruiz e Pav. ex. G. Don, planta arbustiva descrita por Valencia em 1982 com ocorrência no Bosque de Zarate a 2750 m de altitude, em Ancash a 2870 m de altitude no Peru, e no departamento de Cochabamba, na Bolívia a 2900 m de altitude (McVAUGHT, 1958; LANDRUM, 1986, BRAKO E ZARUCCHI, 1993).

As populações naturais de goiabeira serrana em Santa Catarina apresentam uma grande variabilidade no tamanho e cor do fruto e outras características da planta (NODARI *et al.*, 1997). Recentemente passou a ser cultivada comercialmente no Brasil, apesar de ser cultivada há longo tempo em outros países, tais como Nova Zelândia, Austrália, EUA e alguns países europeus (DUCROQUET E HICKEL, 1997; THORP E BIELESKI, 2002).

Metabolismo da embriogênese

A embriogênese compreende uma rota ontogênica que inicia o ciclo de vida das plantas superiores e seus estudos têm impacto direto sobre a produtividade agrícola (CAIRNEY *et al.*, 1999). Uma melhor compreensão dos fatores associados à embriogênese pode ser buscada na interface entre a embriogênese somática e

zigótica (ZIMMERMAN, 1993). Este conhecimento pode permitir o desenvolvimento de protocolos mais precisos e menos empíricos para a obtenção de embriões somáticos.

A embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica, na qual uma célula isolada ou um pequeno grupo de células somáticas são precursores de embriões (AMMIRATO, 1983). Suas aplicações estão associadas a uma série de objetivos, que vão desde a obtenção de um modelo referência para estudos básicos até a propagação clonal visando à conservação e o melhoramento genético vegetal.

Nos tecidos vegetais, as células competentes são reconhecidas pela resposta a um sinal externo que ativa um caminho de desenvolvimento específico (McDANIEL, 1984). Esta competência pode ser adquirida por meio de um processo de desdiferenciação (TORREY, 1977). Em alguns casos, a competência para a regeneração está relacionada à atividade e aos planos de divisão celular. Em outros casos, a competência para a embriogênese ou organogênese parece não estar diretamente relacionada à atividade mitótica (DOLEZELOVA *et al.*, 1992).

A modulação da embriogênese somática em angiospermas pode ser analisada em um sistema de dois ciclos básicos (Figura 1): Ciclo repetitivo que tem seu início na (1) indução em meios de culturas contendo auxinas (mais freqüentes) e citocininas (menos freqüentes); e (2) multiplicação em meios contendo auxinas em baixas concentrações. A saída do ciclo de multiplicação e entrada no ciclo de maturação caracteriza-se pela (3) maturação em presença de ABA e osmorreguladores. Como produto deste ciclo obtém-se embriões somáticos passíveis de (4) conversão em meios de cultura isentos de fitorreguladores de crescimento. A fase de multiplicação pode ser efetuada em meio líquido em biorreatores ou frascos de Steward, sob agitação constante e as demais fases são geralmente realizadas em meio de cultura geleificado (DURZAN, 1988; GUERRA *et al.*, 1999).

A embriogênese envolve não apenas a divisão do zigoto de acordo com um plano pré-determinado, mas relaciona-se também com mudanças ultra-estruturais e bioquímicas nas células, levando ao acúmulo de substâncias de reserva (RAGHAVA E SHARMA, 1995). Bioquimicamente, pode-se detectar a síntese e acumulação de proteínas, lipídios e carboidratos em diferentes partes e em diferentes estádios de desenvolvimento da semente.

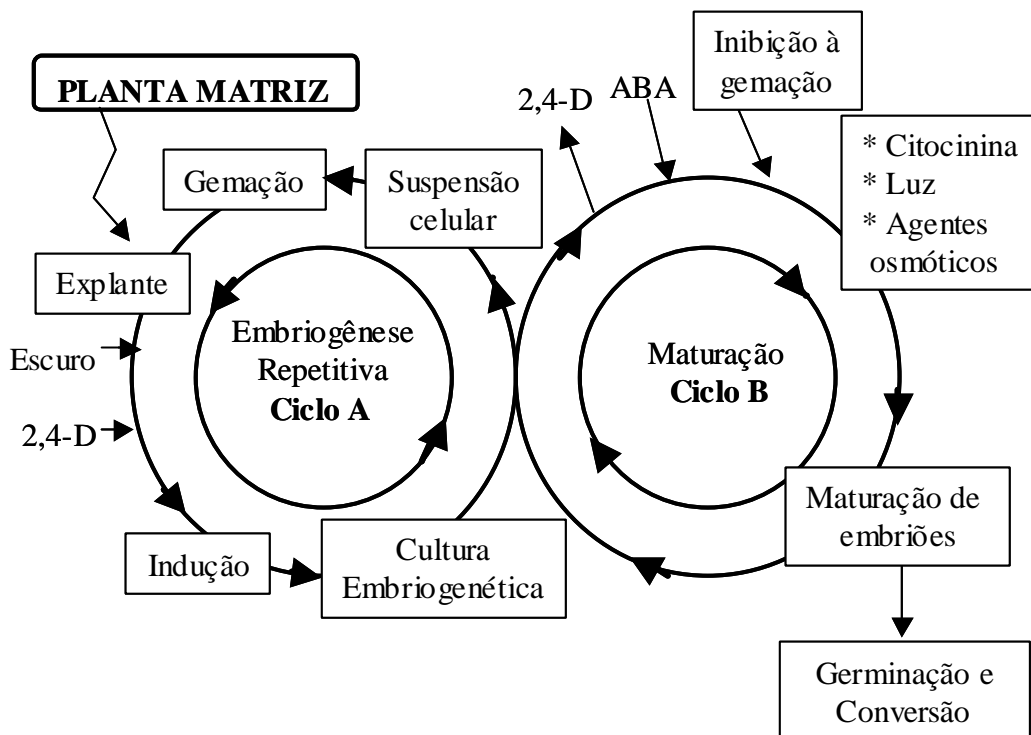


Figura 1. Representação esquemática para a indução e modulação da embriogênese somática. **A)** Estabelece condições básicas para a obtenção de ciclos repetitivos de divisão celular e **B)** Estabelece condições básicas para a progressão e maturação dos embriões somáticos e posterior regeneração de plantas. Adaptado de Durzan (1988) e Guerra *et al.* (1999).

Proteínas

Existem evidências que a acumulação de proteínas características de embriões zigóticos é recapitulada na embriogênese somática. A síntese e acúmulo de substâncias de reserva representam estágio chave na embriogênese zigótica, pois permitem o armazenamento de compostos que serão utilizados pelo embrião até o estabelecimento da autotrofia por parte da plântula recém germinada (MERKLE *et al.*, 1995). Estas substâncias podem ser consideradas como marcadores bioquímicos confiáveis da qualidade dos embriões zigóticos e somáticos.

Nos embriões somáticos, o acúmulo de proteínas totais pode estar relacionado aos processos de desenvolvimento e maturação que culminam com a posterior conversão desses embriões somáticos em plântulas. Sugere-se também o

envolvimento das proteínas na regulação da expansão celular e no estabelecimento das características biofísicas requeridas para a morfogênese (JIMÉNEZ, 2001).

A germinação é um evento que compreende uma série de reações bioquímicas e fisiológicas que permitem o crescimento da planta. A primeira fase da utilização de reservas nitrogenadas envolve a hidrólise de proteínas a aminoácidos livres, que são então metabolizados nos embriões. Nos cotilédones, esses aminoácidos poderiam ser utilizados na síntese de enzimas, permitindo o desenvolvimento embrionário (BEEVERS e GUERNSEY, 1986).

O baixo vigor das plântulas resultantes de embriões somáticos de *Elaeis guineensis* poderia ser devido a um nível insuficiente de proteínas de reserva, onde os clones que acumularam menor quantidade de proteínas na presença de glutamina foram aqueles que continham mais proteína inicialmente (MORCILLO *et al.*, 1999).

Aminoácidos

Nas células vegetais, o nitrogênio (N) encontra-se em altos níveis no citoplasma e nos vacúolos, servindo como substrato para a síntese de proteínas. O N é translocado como aminoácido através do floema para os tecidos com intenso crescimento (CAPUTO e BARNEIX, 1999; ORTIZ-LOPEZ *et al.*, 2000).

Os aminoácidos são substâncias importantes no metabolismo do N, representando o produto inicial da assimilação primária do mesmo, na síntese de proteínas, atuando também na sua forma de transporte para as regiões autotróficas e heterotróficas da planta (ORTIZ-LOPEZ *et al.*, 2000). Os aminoácidos contribuem também em funções do metabolismo secundário, atuando como precursores de hormônios vegetais e de compostos envolvidos na defesa de plantas. Sua síntese pode controlar direta e/ou indiretamente vários aspectos ligados ao crescimento e ao desenvolvimento de plantas (BUCHANAN *et al.*, 2000).

Na embriogênese somática os níveis endógenos de aminoácidos podem variar durante os vários estágios de desenvolvimento. Thorpe (1993) postulou que a embriogênese somática estaria associada ao incremento de teores de aminoácidos como prolina, serina e tirosina. Kamada e Harada (1984) mostraram que a quantidade total de aminoácidos aumentou rapidamente durante a proliferação celular e nos estágios iniciais da formação dos embriões somáticos em culturas de

Daucus carota, sugerindo que os aminoácidos estão relacionados com alguma rota bioquímica neste processo de desenvolvimento.

Amido

Poucos estudos têm sido realizados visando estabelecer uma associação entre o acúmulo de amido e o desenvolvimento de embriões somáticos (MERKLE *et al.*, 1995). Alguns destes estudos evidenciaram aumento no conteúdo de amido durante a maturação de embriões somáticos, os quais apresentam teores mais elevados desta substância do que os embriões zigóticos. Estes resultados sugerem que os embriões somáticos são metabolicamente diferentes dos embriões zigóticos e incapazes de converter eficientemente carboidratos em lipídios e proteínas de reserva (MERKLE *et al.*, 1995).

Conteúdos diferenciais de açúcares redutores e de amido foram reportados como característica de calos embriogênicos e não embriogênicos de *Medicago arborea*, mostrando que altas concentrações de açúcares e baixo conteúdo de amido são encontrados em culturas embriogênicas, em contraste com as culturas não embriogênicas (MARTIN *et al.*, 2000).

O crescimento *in vitro* de culturas de tecidos vegetais normalmente requer uma fonte externa de carbono, a qual é usualmente adicionada ao meio de cultura na forma de sacarose (ROSS *et al.*, 1994). A sacarose é uma importante fonte de reserva de hexoses e uma fonte de carbono para a síntese de polissacarídeos estruturais e de reserva, depois de sua hidrólise pela sacarose sintetase ou invertase (VAN DEN ENDE e VAN LAERE, 1995).

O processo de divisão celular demanda energia e pela degradação do amido são formados intermediários glicolíticos que, submetidos à catálise oxidativa, suprem os altos níveis de ATP necessários para o metabolismo celular (MARTIN *et al.*, 2000). Os açúcares não são utilizados diretamente para o metabolismo de energia, e sim transformados em amido, como substância de reserva nos cotilédones, sendo a sacarose a principal fonte para a síntese de amido em sementes. Mostrou-se também que durante a fase de maturação das sementes ocorre acúmulo de substâncias de reserva tais como o amido (BEWLEY e BLACK, 1994),

Poliaminas

As poliaminas são aminas alifáticas com carga positiva em pH neutro que desempenham papel fundamental na proliferação e diferenciação celular (BOUCHEREAU *et al.*, 1999), assim como na síntese protéica, replicação do DNA e em resposta ao estresse hídrico de plantas (BAIS e RAVISHANKAR, 2002). 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.*, 1999).

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 *A. angustifolia* o conteúdo de poliaminas variou durante a embriogênese zigótica, observando-se altos teores de Put e Spd nas fases iniciais, enquanto que, nos estágios tardios da embriogênese a Spm foi a poliamina mais abundante (ASTARITA *et al.*, 2003a). Assim, Sugere-se que os perfis de poliaminas podem ser utilizados como marcadores das alterações metabólicas ocorridas durante a maturação das culturas embriogênicas.

As poliaminas e as proteínas sintetizadas a partir de aminoácidos livres estão presentes em todas as células vegetais. Elas agem na divisão e diferenciação celulares em ampla gama de espécies (HUANG e VILLANUEVA, 1992). Mudanças nos teores de poliaminas acompanham variações nos níveis de divisão celular e de crescimento. Nos primeiros estádios da germinação, os níveis de poliaminas aumentam e logo decrescem lentamente (VILLANUEVA *et al.*, 1978).

A Put foi a principal poliamina observada durante a germinação de semente de tangerina Cleópatra e a Spm e Spd também foram importantes nos primeiros estádios da germinação (NIEVES *et al.*, 1998b). Vários trabalhos indicam a importância das poliaminas no desenvolvimento de embriões somáticos de *Pinus radiata* (MINOCHA e MINOCHA, 1995; MINOCHA *et al.*, 1999).

Ácido indol-3-acético (AIA)

As auxinas exercem forte influencia nos processos de expansão, divisão celular na definição de órgãos e promoção da diferenciação do sistema vascular (LIU *et al.*, 1993). A auxina mais amplamente encontrada é o AIA que ocorre nos tecidos

vegetais na forma livre (ativa), ou conjugada. A manutenção das auxinas no estado conjugado esta 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 embrionário (FISCHER-IGLESIAS e NAUHAUS, 2001). Durante a embriogênese somática as auxinas podem ser 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 (AG₃) e do AIA, concomitantemente como o progressivo aumento do ácido abscísico (ABA) na semente, alcançando os valores máximos de concentração (CHIWOCHA e VON ADERKAS, 2002).

Ácido abscísico

O desenvolvimento vegetal é 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 dos embriões de diversas espécies em geral é estimulada pela presença de ABA no meio de cultura (STASOLLA e YEUNG, 2003). A ação do ABA é atribuída a inibição de clivagem poliembriionária, permitindo o desenvolvimento do embrião e o acúmulo de substâncias de reserva (GUPTA *et al.*, 1993; DODEMAN *et al.*, 1997).

O decréscimo no conteúdo de água é um evento natural que ocorre durante os estágios avançados de desenvolvimento das sementes e representa importante etapa antes de iniciar o processo de germinação (STASOLLA E YEUNG, 2003). O ABA e os estresses osmóticos estão envolvidos neste processo durante o desenvolvimento e germinação dos embriões zigóticos (KLIMASZEWSKA *et al.*, 1997). Alterações no metabolismo do N seguido pela deposição de substâncias de reserva e na síntese de poliaminas podem ocorrer em resposta ao tratamento com ABA (STASOLLA e 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).

Sementes artificiais ou sintéticas

Uma aplicação importante da técnica de embriogênese somática se relaciona com a produção de sementes sintéticas (MERKLE *et al.*, 1990), que são definidas como uma semente análoga à semente verdadeira ou botânica, consistindo de um embrião envolto por uma ou mais camadas de compostos artificiais. A cápsula assim formada serve de proteção ao embrião somático contra danos mecânicos durante a armazenagem, transporte e semeadura (GRAY e PUROHIT, 1991; ONISHI *et al.*, 1994). O alginato de sódio é o principal gel para o encapsulamento, por causa de suas propriedades geleificantes, do baixo custo, da facilidade de uso e da ausência de toxicidade (GUERRA *et al.*, 1999).

A partir das técnicas descritas por Fujii *et al.* (1989) e Redenbaugh *et al.* (1991), aplicações e modificações nas metodologias básicas foram aplicadas para várias espécies, entre as quais: abeto (ROBERTS *et al.*, 1992a), cenoura (MOLLE *et al.*, 1993), aipo (JANICK *et al.*, 1993), florestais (MARUYAMA *et al.*, 1997), citros (NIEVES *et al.*, 1998a; ANTONIETTA *et al.*, 1999), manga (ARA *et al.*, 1999), *Humulus lupulus* L (MARTÍNEZ *et al.*, 1999), maçã (PAUL *et al.*, 2000), cenoura e batata (PATEL *et al.*, 2000) e *Asparagus officinalis* (MAMIYA e SAKAMOTO, 2001).

Para melhorar a conversão das sementes sintéticas, vêm-se estudando a reconstituição de endospermas artificial, por meio da introdução de componentes nutricionais dos meios de cultura à solução geleificante de alginato (ARA et al., 1999), tais como: osmorreguladores (polietilenoglicol (PEG), sorbitol, manitol) (NIEVES et al., 1998a); fitorreguladores (6-benzilaminopurina (BAP), ABA, AG₃) (MERKLE et al., 1995); substâncias antifúngicas (MAMIYA e SAKAMOTO, 2001); antibióticos e fontes de carbono (MARTÍNEZ et al., 1999).

Em tangerina cleópatra, o endosperma artificial foi suplementado com ABA (1 μ M) e manitol (0,25 M), ocorrendo um retardo na conversão dos embriões zigóticos a plântulas (NIEVES *et al.*, 1998a). Contudo, quando este endosperma sintético foi suplementado com os aminoácidos prolina, ácido glutâmico e arginina, observou-se uma aceleração no processo de conversão.

Em *Asparagus officinalis* observou-se aumento na germinação de sementes sintéticas em substrato não estéril, em resposta à técnica de pré-encapsulamento (MAMIYA e SAKAMOTO, 2001). Walker e Parrott (2001) encontraram diferenças nas respostas ao PEG, manitol e sorbitol na quantidade de embriões maduros produzidos, na germinação e conversão de embriões somáticos de soja.

Embriões somáticos de *Paulownia elongata* encapsulados a partir de diferentes concentrações de alginato de sódio. A concentração de 3% proporcionou um encapsulamento uniforme dos embriões, resultando em altas taxas de germinação e sobrevivência (IPEKCI e GOZUKIRMIZI, 2003).

Métodos tradicionais de propagação da cana de açúcar foram comparados com o emprego da técnica de com plantas derivadas de sementes sintéticas (NIEVES *et al.*, 2003a). As plantas com 12 meses de idade não apresentaram diferenças morfológicas, acúmulo de açúcares e produção. Esses resultados sugerem que as plantas derivadas de sementes artificiais podem ser uma alternativa viável para a produção comercial de cana de açúcar.

Proteoma

Os estudos proteômicos tratam de analisar o perfil das proteínas totais de células específicas, organelas ou tecidos (BLACKSTOCK e WEIR, 1999). Esses estudos foram inicialmente baseados em proteínas complementares de células específicas ou amostras de tecido. A proteômica permite avaliar várias propriedades das proteínas, tais como o perfil das modificações pós-tradução ou a interação com outras biomoléculas. Um dos objetivos mais comuns dos estudos contemporâneos é a caracterização das diferenças entre os níveis de expressão das proteínas em diferentes tecidos (FITZGERALD, 2001).

Na expressão proteômica as proteínas de células específicas são separadas e quantificadas. As proteínas de interesse são assim identificadas e caracterizadas. O gel de eletroforese de poliacrilamida bidimensional (2-DE) é a ferramenta usada para separar proteínas em expressão proteômica. Na 2-DE, o enfoque isoelétrico (IEF) é usado para separar proteínas na primeira dimensão em base a seu ponto isoelétrico. As proteínas são separadas com base em seu peso molecular por meio do gel de eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em alguns protocolos experimentais, 2-DE é usada para decompor as proteínas extraídas de uma célula completa ou uma amostra de tecido. Em outros casos, as proteínas são pré-fracionadas antes da 2-DE baseado nas suas características físico-químicas (solubilidade ou massa molecular) ou propriedades biológicas (ligação com seus anticorpos ou distribuição subcelular). A visualização das proteínas é geralmente feita pelo corante Coomassie Brillante Blue, nitrato de prata, radioatividade ou, mais recentemente, por fluorescência (FITZGERALD, 2001).

O corante coomassie é relativamente fácil de trabalhar e compatível com a identificação das proteínas por espectrômetro de massa (MS), mas é moderadamente sensível, com o limite da proteína de aproximadamente 10ng. O outro corante alternativo tem sido o nitrato de prata, que é mais sensível, detectando proteínas de 0,5 ng (HEAZLEWOOD e MILLAR, 2003) sendo, contudo menos conveniente para a identificação com o MS (LOPEZ, 2000). Recentemente, numerosos corantes fluorescentes foram desenvolvidos, tais como SYPRO *Ruby* e SYPRO *Orange*. Esses corantes combinam as vantagens dos outros corantes, mostrando sensibilidade similar ao nitrato de prata, facilidade de uso e compatibilidade com o MS do coomassie (LAUBER *et al.*, 2001). Entretanto, os altos custos desses corantes podem ser proibitivos, particularmente com estudos nos quais são utilizados muitos géis (ROSE *et al.*, 2004).

Dupire *et al.* (1999) utilizando a 2-DE analisaram as proteínas expressas nas culturas embriogênicas de tecidos mutantes e de tipos selvagens de *Asparagus officinalis* L., classificando 116 proteínas em 20 grupos potencialmente relacionados com a embriogênese somática. Seis polipeptídios foram específicos para o tipo mutante e poderiam estar relacionados com a competência dos tecidos à embriogênese somática. Onze proteínas foram detectadas especificamente nos tecidos do tipo selvagens e sua presença poderia estar relacionada com a inibição da embriogênese somática.

Imin *et al.* (2004) estabeleceram um mapa proteômico referência para o estágio globular do embrião somático de *Medicago truncatula* e mostraram mais de 2000 proteínas expressas. Por outro lado, uma análise comparativa entre os diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático e zigótico de *Cyclamen persicum*, por meio da análise proteômica, revelou que 74% das proteínas expressas nos embriões zigóticos foram encontradas em abundância similar nos embriões somáticos desenvolvidos em meio de cultura contendo sacarose a 6% (WINKELMANN *et al.*, 2006).

Embriogênese somática de *Acca sellowiana*

A embriogênese somática de *Acca sellowiana* foi primeiramente descrita por Cruz *et al.* (1990) a partir de explantes cotiledonares cultivados em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 2,4 ácido dicloro fenol

acético (2,4-D). O protocolo descrito por estes autores foi depois modificado pela alteração da fonte de carbono no meio de cultura (CANHOTO e CRUZ, 1994).

Em *A. sellowiana*, células meristemáticas, originadas da região cotiledonar, após duas semanas em cultivo com 2,4-D, apresentavam características típicas de células embriogênicas, sendo pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, núcleo central proeminente com pequenos grãos de amido e vacúolos pequenos (CANHOTO e CRUZ, 1990).

Nesta espécie, a indução da embriogênese somática e a obtenção do maior número de embriões foi genótipo-dependente. Choques auxínicos com 2,4-D de duas semanas proporcionaram a indução e o desenvolvimento de embriões somáticos (GUERRA *et al.*, 2001). Na obtenção de sementes artificiais, esses mesmos autores reportaram que o alginato de sódio (1%) permitiu o encapsulamento dos embriões somáticos de *A. sellowiana*. O pré-tratamento com KNO_3 (100 mM) facilitou a conversão das sementes sintéticas em plântulas.

Dal Vesco e Guerra (2001) mostraram que as concentrações originais de NH_4^+ e NO_3^- presentes no meio LPm (VON ARNOLD E ERIKSSON, 1981) suplementado com glutamina (4 mM) aumentaram o número de embriões somáticos obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos e que para embriões zigóticos maduros, a adição de Asn, Gln ou Arg ao meio básico LPm melhorou a indução da embriogênese somática. O meio básico MS/2 suplementado com BAP (0,5 μM) permitiu a conversão dos embriões somáticos em plântulas.

Estudos histoquímicos nesta espécie mostraram que os embriões somáticos diferenciaram-se a partir da fragmentação de células do cotilédone do embrião zigótico e este processo ocorreu em duas etapas (i) centros meristemáticos eram originados a partir do processo de segregação celular, (ii) formação de uma camada de células periférica circundando o centro meristemático em que cada célula da camada periférica demonstrava competência para embriogênese somática. As células competentes eram pequenas isodiamétricas e os vacúolos estavam preenchidos por compostos fenólicos. A primeira divisão celular desta camada de células era periclinal e as subseqüentes divisões ocorreram em vários planos até a formação de embriões somáticos completos (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2004).

Por outro lado, a utilização de filamentos de estames de *A. sellowiana*, inoculados em meio de cultura LP geleificado, suplementado com Picloram (10 μM)

e cinetina (Kin) (1 μM) ou Picloram (1 μM) e Kin (0,5 μM) e posteriormente transferidos para meio líquido LP (VON ARNOLD e ERIKSSON, 1981) suplementado com 2,4-D (1 μM) e 2 isopenteniladenina (2-iP) (1 μM) apresentaram competência para a indução e estabelecimento de culturas embriogênicas (STEFANELLO *et al.*, 2005).

Cangahuala-Inocente *et al.* (2007) melhoraram a percentagem e número de embriões somáticos de *A. sellowiana* no meio de cultura LPm suplementado com ácido glutâmico (Glu) (8 mM) e 2,4-D (20 μM). A utilização de um endosperma artificial proporcionou as maiores taxas de conversão dos embriões somáticos encapsulados, sendo o meio de cultura LPm/2 suplementado com sacarose (3%), BAP (0,5 μM) e AG₃ (1 μM) o melhor endosperma artificial (24,5%) em comparação com o tratamento sem fitorreguladores (9%).

Nos estudos bioquímicos observou-se que durante a indução da embriogênese somática de *A. sellowiana*, os níveis de proteínas totais diminuíram e os teores de açúcares solúveis totais e os de amido aumentaram ao longo dos 30 primeiros dias em cultura, mantendo-se constantes até os 120 dias. Nos embriões somáticos, os níveis de proteína aumentaram de acordo com a progressão dos estágios de desenvolvimento e os níveis de açúcares solúveis totais e de amido foram altos nos estádios cordiforme e cotiledonar (CANGAHUALA-INOCENTE, 2002).

HIPÓTESES

- a) A embriogênese somática *in vitro* é dependente tanto do explante a ser induzido quanto do agente indutor, podendo ser esse físico ou químico.
- b) Durante os diversos processos que compreende o ciclo de vida de uma planta diversas substâncias estão sendo sintetizadas e degradadas de uma forma conservativa. Se a embriogênese somática é considerada análoga à embriogênese zigótica, então substâncias tais como aminoácidos, amido e poliaminas estão sendo sintetizados de uma forma constante tanto na quantidade e qualidade dessas substâncias.
- c) Muitas proteínas são expressas nas células e tecidos ao longo de um programa de desenvolvimento e estas proteínas são moduladas e controladas por fatores internos e externos. Portanto, se durante o desenvolvimento dos embriões somáticos, diversas proteínas estão sendo expressas, então a identificação dessas proteínas poderia servir como um marcador protéico da qualidade deste processo.

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo a elucidação dos processos morfofisiológicos, bioquímicos e proteômicos associados à embriogênese zigótica e somática de *Acca sellowiana*, buscando uma melhor compreensão dos fatores que modulam este processo e visando estabelecer um sistema modelo para a embriogênese somática de espécies arbóreas para a aplicação em programas de domesticação, conservação e melhoramento genético.

Objetivos específicos

- a) Estabelecer culturas embriogênicas e não embriogênicas a partir de tecidos embrionários zigóticos e de tecidos de origem somática;
- b) Otimizar a tecnologia de sementes sintéticas *ex vitro* por meio da reconstituição de endosperma artificial;
- c) Caracterizar as principais alterações histo-anatômicas do desenvolvimento da embriogênese zigótica;
- d) Quantificar os níveis de proteínas, aminoácidos, açúcares totais, amido e poliaminas durante o início da embriogênese zigótica e somática, assim como no desenvolvimento dos embriões;
- e) Quantificar os níveis de AIA e ABA endógenas durante a germinação dos embriões zigóticos e somáticos;
- f) Identificar e caracterizar as proteínas expressadas durante o desenvolvimento dos embriões somáticos.

SEÇÃO II

Cultivo *in vitro* da goiabeira
serrana

Resumo

Nesta seção são abordados aspectos da embriogênese somática da *Acca sellowiana* associados à indução de embriogênese somática por agentes causadores de estresses em tecidos somáticos e a influência da fonte de carbono na conversão dos embriões somáticos em plântulas e na síntese de poliaminas nestes embriões, bem como o emprego da tecnologia de sementes sintéticas para a aclimatização *ex vitro*. A embriogênese somática é normalmente induzida em explantes responsivos por auxinas fortes, contudo, existem relatos de indução embriogênica por agentes estressantes. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer culturas embriogênicas e não embriogênicas por meio de agentes químicos e físicos, a partir de tecidos somáticos e zigóticos de diferentes genótipos. Avaliou-se também a influência de diferentes tipos de fonte de carbono do meio de indução, na conversão e conteúdo de poliaminas endógenas dos embriões somáticos, bem como a influência do encapsulamento e do emprego de endosperma artificial na conversão *ex vitro* dos embriões somáticos. A indução de embriogênese somática em *A. sellowiana* a partir de tecido somático mostrou-se genótipo dependente. O tipo de explante utilizado foi determinante na indução de cultura embriogênica, sendo a pétala o explante mais responsivo. O 2,4-D associado ao 2-iP, o Picloram e o Dicamba promoveram a indução de cultura embriogênica. O 2,4-D em baixas concentrações, choques térmicos e alteração da osmolaridade celular por substâncias osmóticas induziram a embriogênese somática direta sobre as folhas cotiledonares do embrião zigótico. A glicose e a maltose foram mais efetivas para a indução e desenvolvimento de embriões somáticos, mas não afetaram as taxas de conversão dos embriões somáticos a plântulas. Os níveis de poliaminas endógenas nos embriões somáticos foram dependentes da fonte de carbono utilizada e a maltose esteve associada aos teores níveis mais elevados de PAs. A utilização de sementes sintéticas enriquecidas com endosperma artificial melhorou conversão e a sobrevivências das plântulas *ex vitro*.

Abstract:

The present chapter deals with several aspects of somatic embryogenesis in *Acca sellowiana*. The focus was the induction of this *in vitro* morphogenetic route as affected by stressing agents and the genotype. The influence of the carbon source supplemented to the culture medium in the polyamine synthesis and in the induction and conversion of somatic embryos to plantlets was investigated. The influence of the synthetic seed and artificial endosperm technology in the *ex vitro* acclimatization was also assayed. The somatic embryogenesis in *Acca sellowiana* was genotype dependent. The explant source was determinant for the induction of embryogenic cultures. Petals were the explant more responsive. Culture media supplemented with 2,4-D plus 2-iP, with Picloram and with Dicamba promoted the induction of embryogenic cultures. The 2,4-D in low concentrations, temperature shocks and the alteration of cellular osmolarity by osmotic substances induced direct somatic embryogenesis in the cotyledonary leaves of the zygotic embryo used as explant. Glucose and maltose enhanced the induction and development of somatic embryos but did not affect the conversion rates of somatic embryos to plantlets. The levels of polyamines in the somatic embryos were dependent of the carbon source being maltose associates to the highest levels of polyamines. The use of synthetic seeds enriched with artificial endosperm enhanced the conversion and the *ex vitro* survival of the amblings.

Capítulo 1: Embriogênese somática induzida por estresse químico e físico a partir explantes de diversas origens de *Acca sellowiana*¹

INTRODUÇÃO:

A embriogênese somática é um importante sistema modelo para estudos de diferenciação e rediferenciação de células vegetais, e é usado amplamente como um sistema experimental para elucidar eventos fisiológicos, bioquímicos e moleculares durante a embriogênese (ZIMMERMAN, 1993). Nos tecidos vegetais, as células competentes para a embriogênese somática são reconhecidas pela resposta a um sinal externo que ativa uma rota de desenvolvimento específico (McDANIEL, 1984) e pode ser adquirida por meio de um processo de desdiferenciação (TORREY, 1977).

Usualmente a embriogênese somática é induzida a partir de diversas fontes de explantes por auxinas fortes como o 2,4-D, ou menos comumente em resposta à citocininas (DE VRIES *et al.*, 1988), contudo, existem relatos de formação direta de embriões somáticos em meios de cultura isentos de reguladores de crescimento (FEHÉR *et al.*, 2003). Isso sugere que a embriogênese somática não pode ser tratada como sendo uma resposta específica induzida por um ou mais reguladores de crescimento e que esta indução pode ser estimulada por outros fatores, entre os quais estresses variados. Os teores hormonais endógenos podem ser considerados fatores determinantes na especificidade das respostas celulares a esses estímulos de estresse (FEHÉR *et al.*, 2003).

A *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret, mirtácea nativa dos planaltos meridionais do sul do Brasil apresenta um sistema de embriogênese somática já bastante estudado e induzido a partir de embriões zigóticos imaturos e maduros (CRUZ *et al.*, 1990; CANHOTO e CRUZ, 1996; DAL VESCO e GUERRA, 2001; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007), e de órgãos e tecidos florais (STEFANELLO *et al.*, 2005).

Este sistema apresenta preferencialmente embriogênese somática direta que ocorre na superfície das folhas cotiledonares e é induzida pelo 2,4-D (DAL VESCO e GUERRA, 2001). O número de embriões somáticos formados pode ser alto, mais de 50 por explante, (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007), mas as taxas de

conversão destes embriões somáticos em plântulas são relativamente baixas, o que poderia ser atribuído aos efeitos residuais do 2,4-D empregados para a indução embriogenética, ou então a um efeito dependente do genótipo.

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer culturas embriogênicas e não embriogênicas por meio de agentes químicos e físicos, a partir de tecidos somáticos e zigóticos de diferentes genótipos de *A. sellowiana*.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Material Vegetal

Botões florais em estágio balão e sementes foram coletados de plantas de *A. sellowiana* mantidas num pomar estabelecido em 1985, de propriedade do Sr. Shu Otani, em São Joaquim, SC. Em câmara de fluxo laminar, os botões florais e/ou as sementes foram mergulhados em álcool 70 % por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio (2 %) por 15 minutos, sendo posteriormente enxaguados três vezes com água destilada contendo ácido cítrico e ácido ascórbico (500 mg.L⁻¹) filtro-esterilizado.

B. Condições do cultivo *in vitro*

Botões florais foram inoculados em placas de petri as quais continham 30 ml de meio de cultura e embriões zigóticos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura, constituído pela formulação LPm, suplementado com vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951) (LPmM), 3 % maltose, 8 mM Glu e geleificado com 0,2 % phytigel. O pH foi ajustado a 5,8 antes da esterilização em autoclave.

As culturas foram mantidas na ausência de luz (indução e multiplicação) em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, UR de 60 ± 5%.

C. Fatores estressantes

C.1. Agentes químicos

A fonte de explante para estabelecer as culturas foi constituída por filamentos de estames (filete), estilete e pétala de botões florais de *A. sellowiana*. Foram delineados quatro experimentos:

- a) Diferentes fitorreguladores (Picloram, Dicamba, Tidiazuron (TDZ) e 2,4-D) e concentrações (10, 20 e 40 μM), utilizando quatro acessos diferentes: 101, 458, 101x458a (F4P3) e 101x458b (F28P15).
- b) 2,4-D (20 e 40 μM) combinado com 1 e 2 mg.L^{-1} de BAP e de 2-iP.
- c) Diferentes tipos e concentrações (2, 20 e 200 μM) de 2,4-D, Picloram e Dicamba combinadas com 2-iP (0,5 μM).

As unidades experimentais foram constituídas por trinta filamentos, cinco pétalas e três estiletos, em um delineamento em blocos completamente casualizados. As avaliações morfogênicas, bem como as histoquímicas foram realizadas por meio da dupla coloração com carmim acético e azul de Evans, efetuadas aos 90 dias em cultura.

C.2. Agentes físicos

A fonte de explante para estabelecer as culturas foi constituída por embriões zigóticos do acesso 101x458 de *A. sellowiana*. Foram estabelecidos dois experimentos:

- a) Estresse por temperatura a 5°C e 45°C por 5h , c ombinado com baixas concentrações de 2,4-D (2, 4 e 8 μM),
- b) Estresse osmótico provocado pelos osmorreguladores sacarose, PEG 3350 e sorbitol a 6%. As unidades experimentais foram constituídas por dez explantes com quatro repetições, arranjadas em blocos completamente casualizados.

D. Análise estatística

Os dados coletados em porcentagem foram submetidos ao teste de separação de médias SNK 5 % de significância. Foram utilizados os softwares Statgraf 7.0 e Statistica 6.0, para auxílio nos procedimentos matemáticos e estatísticos.

RESULTADOS

Agentes químicos

A. Fitorreguladores e acessos

Para o acesso 101x458a, as taxas mais elevadas de indução de calos ocorreram em resposta ao 2,4-D e Dicamba (10 e 40 μM) a partir dos estiletos e

com Dicamba (10 μM) a partir de filetes (Tabela 1). Para o acesso 101x458b, a taxa mais elevada de indução ocorreu em resposta ao 2,4-D e Dicamba (10 μM) a partir do estilete (Tabela 2).

Tabela 1. Percentagem média de Indução de calo a partir do estilete e filete do acesso 101x458a de *A. sellowiana* em resposta a diferentes fitorreguladores.

Fitorregulador (μM)	Estilete				Filete			
	10	20	40	Média	10	20	40	Média
2,4-D	50,0	0,0	50,0	33,3A	0,0	0,0	0,0	0,0A
Picloram	25,0	0,0	25,0	16,7A	0,0	5,4	0,0	1,8A
Dicamba	50,0	0,0	50,0	33,3A	7,1	2,5	1,1	3,6A
TDZ	0,0	0,0	0,0	0,0A	0,0	0,0	0,0	0,0A
Média	31,3A	0,0B	31,3A	20,8	1,8A	2,0A	0,3A	1,3

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

Tabela 2. Percentagem média de Indução de calo a partir do estilete e filete do acesso 101x458b de *A. sellowiana* em resposta a diferentes fitorreguladores.

Fitorregulador (μM)	Estilete			
	10	20	40	Média
2,4-D	25,0	0,0	0,0	8,3A
Picloram	0,0	0,0	0,0	0,0A
Dicamba	25,0	0,0	0,0	8,3A
TDZ	0,0	0,0	0,0	0,0A
Média	12,5A	0,0A	0,0A	4,2

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

Para o acesso 101a, as taxas mais elevadas de indução ocorreram em estiletos, em resposta ao meio de cultura suplementado com Picloram (10 μM), e a partir do filete em resposta ao meio de cultura suplementado com Dicamba (10 μM) (Tabela 3). Para o acesso 101b, a taxa mais elevada de indução ocorreu em estiletos em resposta ao meio de cultura suplementado com 2,4-D (40 μM), e, a partir dos filetes em resposta ao meio de cultura suplementado com Dicamba (20 μM) (Tabela 4).

Tabela 3. Percentagem média de indução de calo a partir do estilete e filete do acesso 101a de *A. sellowiana* em resposta a diferentes fitorreguladores.

Fitorregulador (μM)	Estilete				Filete			
	10	20	40	Média	10	20	40	Média
2,4-D	0,0b	0,0b	0,0b	0,0B	0,0	0,0	0,0	0,0A
Picloram	50,0a	0,0b	0,0b	16,67A	0,0	0,0	0,0	0,0A
Dicamba	0,0b	0,0b	0,0b	0,0B	11,8	0,0	0,0	3,9A
TDZ	0,0b	0,0b	0,0b	0,0B	0,0	0,0	0,0	0,0A
Média	12,5A	0,0B	0,0B	6,3	3,0A	0,0A	0,0A	1,0

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

Tabela 4. Percentagem média de indução de calo a partir do estilete e filete do acesso 101b de *A. sellowiana* em resposta a diferentes fitorreguladores.

Fitorregulador (μM)	Estilete				Filete			
	10	20	40	X	10	20	40	Média
2,4-D	25,0	0,0	50,0	25,0A	0,0	0,0	0,0	0,0A
Picloram	0,0	50,0	0,0	16,7A	0,0	0,0	0,0	0,0A
Dicamba	0,0	0,0	25,0	8,3A	3,6	4,8	0,0	2,8A
TDZ	0,0	0,0	0,0	0,0A	0,0	3,9	0,0	1,1A
Média	6,3A	12,5A	17,8A	12,5	0,9A	2,0A	0,0A	1,0

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

Para o acesso 458, as taxas mais elevadas de indução ocorreram a partir dos estiletos e filetes em resposta ao meio de cultura suplementado com 2,4-D (40 μM) (Tabela 5).

As auxinas associadas as mais elevadas taxas de indução de calos foram o 2,4-D a partir do estilete e Dicamba a partir do filete, independentemente do acesso avaliado (Figura 1A, B) (Tabela 6A). Comparando todos os acessos, o acesso 458 apresentou as taxas mais elevadas de indução a partir de estilete (35,4%) e dos filetes (11,8%) (Tabela 6B).

Tabela 5. Percentagem média de indução de calo a partir do estilete e filete do acesso 458 de *A. sellowiana* em resposta a diferentes fitorreguladores.

Fitorregulador (μM)	Estilete				Filete			
	10	20	40	Média	10	20	40	Média
2,4-D	50,0	50,0	75,0	58,3A	10b	14,6ab	33,4a	19,3A
Picloram	50,0	25,0	25,0	33,3AB	8,0b	17,3ab	3,6b	9,6AB
Dicamba	50,0	0,0	75,0	41,7AB	15,9ab	21,0ab	3,0b	13,3AB
TDZ	0,0	0,0	25,0	8,3B	1,0b	0,0b	5,2b	2,1B
Média	37,5A	18,8A	50,0A	35,4	8,7A	13,2A	11,3A	11,1

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

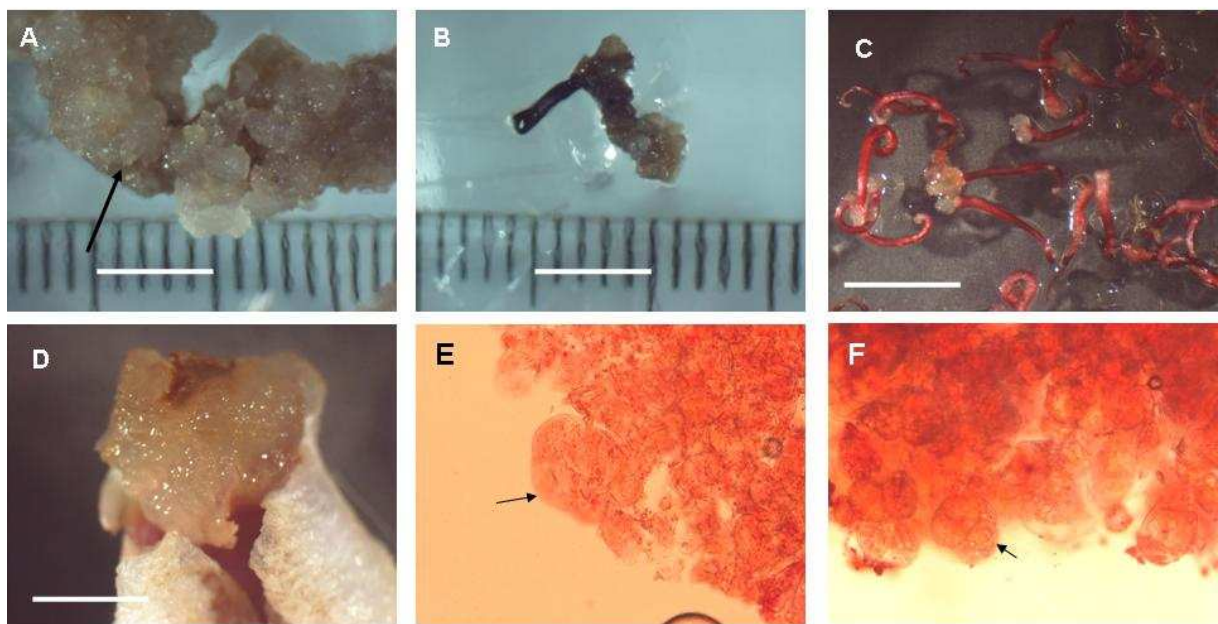


Figura 1. Indução de culturas embriogênicas e não embriogênicas de *A. sellowiana*.

A) a partir do estilete em meio de cultura com 2,4-D 10 μM aos 90 dias de cultura, **B)** com TDZ 40 μM aos 90 dias de cultura, **C)** a partir de filete do acesso 101x458; **D)** a partir de pétala; **E)** e **F)** Cultura embriogênica do acesso 101x458a obtida no meio de cultura com 2,4-D 20 μM e BAP 1 mg.L^{-1} . Seta mostrando grupo de células de coloração vermelha reagindo fortemente ao carmim acético e revelando características embriogênicas. Barra: 0,5 cm

Tabela 6. Percentagem média de indução de calo a partir do estilete e do filete em resposta a diferentes fitorreguladores (A) e acessos coletados (B) de *A. sellowiana*.

Fitorreguladores (A)	Estilete	Filete	Acessos (B)	Estilete	Filete
2,4-D	25,0A	4,1A	458	35,4A	11,8A
Picloram	16,7AB	1,9A	101x458a	20,8AB	1,0B
Dicamba	18,3AB	5,5A	101b	4,2B	1,1B
TDZ	1,7B	0,7A	101x458b	4,2B	0,0B
Média	15,4	3,1	101a	12,5AB	1,4B
			Média	15,4	3,1

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

B. 2,4-D e citocininas

O 2,4-D na concentração de 40 μM , associado ao 2-iP proporcionou elevada taxa de indução de calos a partir de estiletos. O BAP (2 mg.L^{-1}) inibiu a formação de calos (Tabela 7). A combinação de 2,4-D (20 μM) e BAP (1 e 2 mg.L^{-1}) resultou em 100 % de indução de calos a partir dos filetes (Figura 1C). Para as pétalas, todas as combinações induziram calos (Figura 1D). Entretanto, as combinações de 2,4-D (20 μM) com BAP (1 mg.L^{-1}) ou 2-iP (2 mg.L^{-1}) induziram calos com características embriogênicas (Tabela 7). As células destas culturas apresentavam-se isodiamétricas, pequenas e agrupadas, com reação positiva ao corante carmim acético (Figura 1E, F).

C. Efeitos do 2,4-D, Picloram e Dicamba.

Para os estiletos as taxas mais elevadas de indução de calos foram obtidas em resposta ao Dicamba ou 2,4D (2 μM) (Tabela 8). Para os filetes, as taxas mais elevadas de indução ocorreram em resposta a qualquer auxina testada nas concentrações de 2 ou 20 μM (Tabela 8). Da mesma forma do que o observado para os filetes, concentrações elevadas das auxinas testadas inibiram as respostas morfogenéticas *in vitro*. Para as pétalas, a indução de calos foi obtida em todos os tratamentos. Entretanto, pode-se distinguir a formação de dois tipos de calo: compacto e friável. Para este último Picloram e Dicamba foram mais efetivos para a indução de calo friável (Figura 2).

Tabela 7. Percentagem média de indução de calo a partir do estilete, filete e pétala do acesso 101x458 de *A. sellowiana* em resposta ao 2,4-D e as citocininas BAP e 2-iP.

	2,4-D	Estilete			Filete			Pétala					
		20µM	40µM	Média	20µM	40µM	Média	Calo compacto			Calo friável		
		20µM	40µM	Média	20µM	40µM	Média	20µM	40µM	Média	20µM	40µM	Média
BAP	1 mg.L⁻¹	66,7a	100,0a	41,7B	100,0a	16,7b	66,4A	89,3	100,0	97,3A	10,7ab	0,0b	2,7A
	2 mg.L⁻¹	0,0b	0,0b		100,0a	48,9a		100,0	100,0		0,0b	0,0b	
2-iP	1 mg.L⁻¹	100,0a	100,0a	91,7A	65,0a	0,0c	32,9B	100,0	100,0	95,8A	0,0b	0,0b	4,2A
	2 mg.L⁻¹	66,7a	100,0a		66,7a	0,0c		83,3	100,0		16,7a	0,0b	
Média		58,3A	75,0A		82,9A	16,4B		93,2a	100,0A		6,8A	0,0B	
Média	1 mg.L⁻¹	91,7A			45,4A			97,3A			2,7A		
	2 mg.L⁻¹	41,7B			53,9A			95,8A			4,2A		
		66,7			49,7			96,6			3,4		

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

Tabela 8. Percentagem média de indução de calo a partir do estilete, e filete do acesso 101x458 de *A. sellowiana* em resposta a diferentes tipos (picloram, dicamba e 2,4-D) e níveis (2, 20 e 200 μM) de auxinas.

Fitorregulador (μM)	Estilete				Filete			
	2	20	200	Média	2	20	200	Média
Picloram	83,3ab	83,3ab	16,7c	61,1A	100,0a	100,0a	33,3b	77,8A
Dicamba	100,0a	50,0b	0,0c	50,0A	100,0a	100,0a	0,0c	66,7A
2,4-D	100,0a	83,3ab	0,0c	61,1A	100,0a	100,0a	0,0c	66,7A
Média	94,4A	72,2B	5,6C	57,41	100,0A	100,0A	11,1B	70,4

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

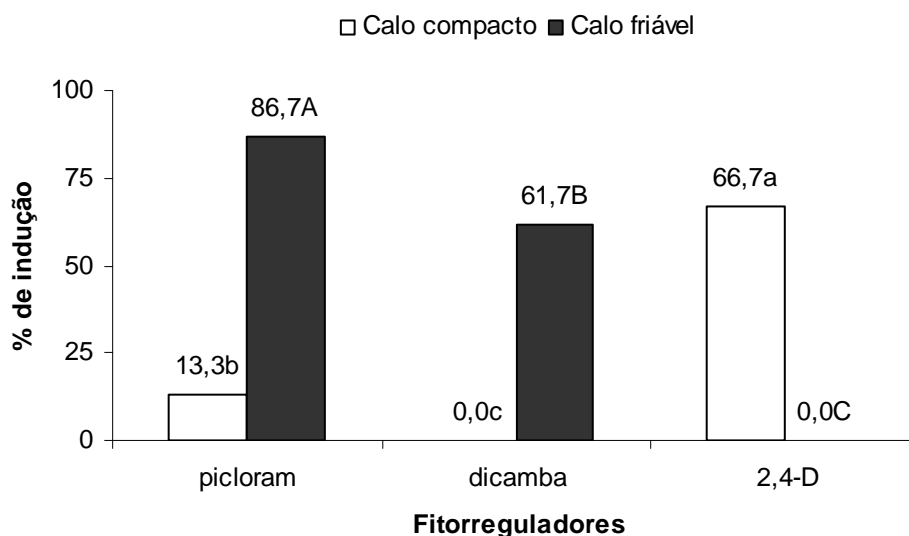


Figura 2. Indução de culturas embriogênicas de *A. sellowiana* a partir de pétala do acesso 101x458a em resposta aos fitorreguladores Picloram, Dicamba e 2,4-D aos 90 dias de cultivo. Letras diferentes em minúsculas e maiúsculas são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de três repetições.

Agentes Físicos

A. Temperatura e 2,4-D

Todas as folhas cotiledonares dos embriões zigóticos formaram calo em resposta ao 2,4-D e às diferentes temperaturas (Figura 3). Observaram-se alterações dos calos tais como a formação de pilosidade, especialmente em resposta às temperaturas de 5°C por 5 h (Tabela 9). Calos compactos sem alterações ocorreram em resposta ao tratamento com 5°C e 45°C por 5 h (Tabela 9). Por outro lado, observou-se indução de calos embriogênicos e embriões somáticos em qualquer temperatura avaliada em meios contendo 2,4-D (Tabela 9).

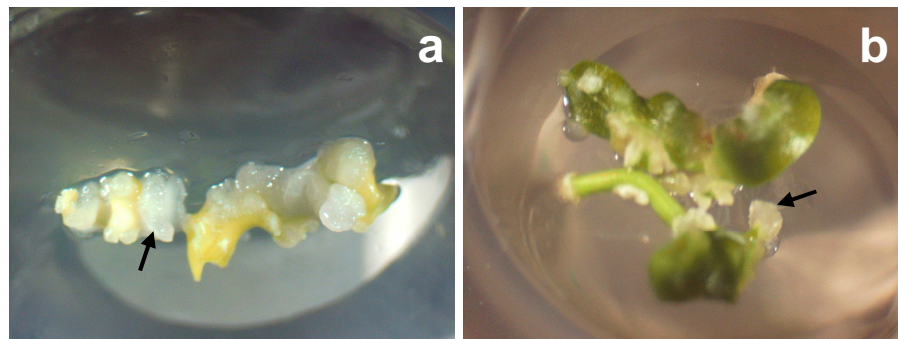


Figura 3. Indução de culturas embriogênicas por agentes físicos a partir das folhas cotiledonares do embrião zigótico. **A)** meio de cultura com 2,4-D 4 µM submetido a 45°C por 5h, **B)** meio de cultura com 2,4-D 4 µM a temperatura de 25°C aos 15 dias de cultura.

Baixas concentrações de 2,4-D (2 µM) resultaram em altas taxas de indução embriogênica, cuja magnitude foi maior (100%) em resposta à temperatura de 25°C aos sessenta dias em cultura (Tabela 10). Este mesmo tratamento gerou o maior número de embriões somáticos (16,8 ES/explante).

B. Osmorreguladores

A adição de osmorreguladores no meio de cultura como agente estressante do tipo osmótico para induzir culturas embriogênicas, favoreceu a formação de embriões somáticos.

A análise estatística não revelou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os osmorreguladores testados para a taxa de indução embriogênica e número de embriões somáticos formados. Após 30 dias em cultura a sacarose resultou na taxa mais elevada de indução (12,5%) em comparação com aqueles explantes

Tabela 9. Percentagem média de indução de calo a partir do embrião zigótico acesso 101x458 de *A. sellowiana* em resposta ao estresse por temperatura e baixas concentrações de 2,4-D aos 15 e 30 dias.

15 dias								
2,4-D μ M	Calo compacto				Calo com pilosidade			
	Temperatura				Temperatura			
	5°C	25°C	45°C	Média	5°C	25°C	45°C	Média
2	27,5c	10,0c	55,0b	30,8C	72,5a	0,0c	45,0b	39,2A
4	82,5a	10,0c	76,9a	56,5B	17,5c	0,0c	23,1c	13,5B
8	100,0a	10,0c	95,0a	68,3A	0,0c	0,0c	5,0c	1,7C
Média	70,0A	10,0B	75,6A	51,9	30,0A	0,0B	24,4A	18,1

30 dias								
2,4-D μ M	Calo compacto				Calo embriogênico			
	Temperatura				Temperatura			
	5°C	25°C	45°C	Média	5°C	25°C	45°C	Média
2	42,5c	47,5c	92,5a	60,8B	12,5b	52,5a	7,5b	24,2A
4	100,0a	45,0c	95,0a	80,0A	0,0b	55,0a	5,0b	20,0A
8	90,0a	75,0ab	97,5a	87,5A	10,0b	25,0b	2,5b	12,5A
Média	77,5B	55,8C	95,0A	76,1	7,5B	44,2A	5,0B	18,9

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

Tabela 10. Percentagem média de indução de embriogênese somática e número de embriões somáticos a partir do embrião zigótico acesso 101x458a de *A. sellowiana* em resposta ao estresse por temperatura e baixas concentrações de 2,4-D aos 30, 45 e 60 dias.

2,4-D (μM)	% de ES											
	30 dias				45 dias				60 dias			
	Temperatura				Temperatura				Temperatura			
	5°C	25°C	45°C	Média	5°C	25°C	45°C	Média	5°C	25°C	45°C	Média
2	12,5b	52,5a	7,5b	24,2A	90,0a	90,0a	15,0d	65,0A	90,0a	100,0a	35,0c	75,0A
4	0,0b	55,0a	5,0b	20,0A	35,0cd	80,0ab	35,0cd	50,0B	45,0c	100,0a	40,0c	61,7B
8	10,0b	25,0b	2,5b	12,5A	55,0bc	35,0cd	20,0cd	36,7B	55,0bc	70,0b	15,0d	47,7C
Média	7,5B	44,2A	5,0B	18,9	60,0A	68,3A	23,3B	50,6	63,3B	90,0A	30,0C	61,1

2,4-D (μM)	N° ES											
	30 dias				45 dias				60 dias			
	Temperatura				Temperatura				Temperatura			
	5°C	25°C	45°C	Média	5°C	25°C	45°C	Média	5°C	25°C	45°C	Média
2	1,7ab	3,3a	2,2ab	2,4A	12,3a	26,8a	1,6b	13,6A	14,6a	16,8a	3,6bc	11,7A
4	0,0b	2,3ab	0,6ab	1,0B	3,6b	9,5b	3,1b	5,4B	5,8bc	9,3b	6,3bc	7,1B
8	0,4b	1,5ab	0,1b	0,7B	6,17b	4,0b	2,1b	4,1B	8,2b	9,0b	1,6c	6,2B
Média	0,7B	2,4A	1,0B	1,3	7,3B	13,4A	2,3C	7,7	9,5A	11,7A	3,8B	8,3

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

submetidos ao PEG e sorbitol. Aos 45 dias de indução, o osmorregulador sorbitol superou essa taxa (27,5% de indução), seguido da sacarose (Tabela 11).

Tabela 11. Percentagem média de indução de culturas embriogênicas e número de embriões somáticos a partir do embrião zigótico acesso 101x458a de *A. sellowiana* em resposta ao estresse por osmorreguladores aos 30 e 45 dias.

Osmorregulador (6 %)	30 dias		45 dias	
	% ES	N° ES	% ES	N° ES
Sacarose	12,5A	0,5A	22,5A	4A
PEG 3350	0,0A	0,0A	2,5A	0,1A
Sorbitol	2,5A	0,2A	27,5A	3,6A
Média	5,0	0,2	17,5	2,6

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

DISCUSSÃO

A. Indução de embriogênese somática por estresse químico

Calogênese é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidização e transformações (VENTURIERI e VENTURIERI, 2004). No presente trabalho, o 2,4-D foi o fitorregulador mais eficiente para o estabelecimento de calo a partir do estilete, filete e pétala de *A. sellowiana* nos diferentes acessos utilizados. Onay *et al.* (2004) obtiveram 65% de calos embriogênicos a partir de botões florais de *Pistacia vera*, induzidos em meio MS suplementado com 1 mg.L⁻¹ BAP. Por outro lado, o uso de TDZ e ANA reduziu a indução de embriogênese somática nesta espécie.

Em *Vitis spp.* a obtenção de calo a partir do cultivo de antera e ovário foi dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado (GAMBINO *et al.*, 2006). No presente trabalho foi observado que a maior percentagem de indução de calo foi

obtida a partir do estilete independentemente do acesso utilizado, mas variando dentro deles. No estudo realizado em *Vitis spp.* diferentes tipos de calo foi observado: calo compacto seco e não embriogênico, calo amarelo ou marrão do tipo suave, úmido e não embriogênico, calo granular branco ou amarelo pré-embriogênico e calo embriogênico associado a um calo obscuro (GAMBINO *et al.*, 2006), Igualmente no presente trabalho foi observado diferentes tipos de calo como o tipo calo compacto seco amarelo não embriogênico e um calo friável suave úmido embriogênico.

Guerra *et al.* (2001) mostraram que o genótipo, o explante, a fase de crescimento e o tipo e concentração dos reguladores de crescimento exógenos têm efeito marcante na aquisição de competência embriogênica de *Acca sellowiana*. O presente trabalho corrobora essa informação, mostrando que a utilização de estilete do acesso 458 e 101x458a como fonte de explantes resultou na taxa mais elevada de indução de calo.

A indução da embriogênese depende de uma série de fatores, entre os quais estão à fonte de carboidratos, aminoácidos, sais e de um balanço hormonal indutivo (EMONS, 1994). Muitos estudos têm revelado papel fundamental da aplicação de auxinas exógenas, principalmente o 2,4-D, considerado um dos principais indutores da embriogênese somática (AMMIRATO, 1983). No presente trabalho o 2,4-D associado ao BAP ou 2-iP possibilitou a obtenção de calo embriogênico a partir de pétalas. Os mesmos efeitos foram reportados por outros estudos que mostraram que o 2,4-D em combinação com a citocinina estimularam a resposta embriogênica em embriões zigóticos (PAIVA NETO *et al.*, 2003; PUCHOOA, 2004; AMOO e AYISIRE, 2005).

Na cultura de tecidos vegetais e nas plantas intactas, diversos efeitos fisiológicos causados pelas citocininas são conhecidos tais como o estímulo à divisão celular e morfogênese. Todas essas respostas podem variar dependendo do tipo de citocinina e da espécie estudada (MAUSETH, 1991; RAVEN *et al.*, 1992; SALISBURY e ROSS, 1992; DAVIES, 1995).

No presente trabalho pétalas do acesso 101x458a inoculados em meio de cultura LPm suplementado com 2,4-D (20 μ M) e 2-iP (2 mg.L⁻¹) apresentaram competência para a indução de culturas embriogênicas. Já, Stefanello *et al.* (2005) reportaram que filamentos de estames desta espécie, inoculados em meio de cultura LPm suplementado com Picloram e Kin, quando transferidas para meio

líquido LPm suplementado com 2,4-D e 2-iP, apresentaram competência embriogênica. Folhas de *Scaevola aemula* induzidas em meio MS suplementado 2,4-D e BAP produziram embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento (WANG *et al.*, 2004).

Diversos estudos têm mostrado o efeito promotor de outras auxinas sintéticas, como o Picloram e Dicamba, na indução de embriogênese somática (DINESHKUMAR *et al.*, 1995, LITTLE *et al.*, 2000, KARAMI *et al.*, 2007). No presente estudo a suplementação destes fitorreguladores no meio de cultura promoveram a formação de culturas embriogênicas a partir de pétala no acesso 101x458a. Em *Cicer arietinum* o Picloram foi uma potente auxina para induzir calogênese e embriogênese somática a partir de folhas (DINESHKUMAR *et al.*, 1995).

Em *Arachis hypogaea*, altas concentrações de Picloram e centofenoxine em meio sólido induziram uma alta produção de embriões somáticos globulares a partir do eixo embrionário do embrião zigótico maduro (LITTLE *et al.*, 2000). Da mesma forma, em *A. correntina*, alta taxa de indução embriogênica foi obtida no meio de cultura MS suplementado com Picloram a partir de folhas imaturas (VIDOZ *et al.*, 2006). Por outro lado, Karami *et al.* (2007) reportam que para a obtenção de embriões somáticos de *Dianthus caryophyllus*, o tecido embriogênico foi induzido a partir de pétalas no meio de cultura MS contendo sacarose, 2,4-D e BA. Tecido embriogênico transferido para o meio MS com 3% sacarose suplementado com baixas concentrações de Picloram resultou na formação de embriões somáticos.

B. Indução de embriogênese somática por estresse físico

Os tratamentos indutores de estresse provocados pela temperatura e osmorreguladores promoveram a formação de embriões somáticos diretamente sobre as folhas cotiledonares do embrião zigótico de *A. sellowiana*. Resultados similares foram obtidos em cenoura (KAMADA *et al.*, 1993), *Pelargonium hortorum* (MADAKADZE e SENARATNA, 2000) e *Quercus suber* (PUIGDERRAJOLS *et al.*, 2002).

No presente estudo, diferentes temperaturas associadas ao 2,4-D em baixas concentrações promoveram a indução de embriogênese somática e a formação de embriões somáticos. A temperatura de 25°C mostrou-se a mais adequada para induzir esse processo morfogenético, assim como a temperatura de 5°C por 5h.

FEHÉR *et al.* (2002) mencionam que o 2,4-D em concentrações altas (> 10 µM) além do efeito auxínico age como um agente estressante ao mesmo tempo. Essa hipótese é sustentada pelos resultados observados em *Medicago sativa*. Protoplastos de folha em presença de baixas concentrações de 2,4-D formaram culturas não embriogênicas e as culturas embriogênicas somente foram obtidas em resposta a diversos tratamentos de estresse associados ao ferro e cobre, entre outros (FEHÉR *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos no presente trabalho são consistentes com a hipótese de que o 2,4-D agiu como auxina e como um agente estressante para a indução embriogênica e que os choques térmicos (altos ou baixos) induziram também a formação de embriões somáticos, porém em menor proporção. Smýkal (2000) mostrou que choques de temperatura são efetivos para induzir o desenvolvimento do pólen embriogênico em *Brassica napus*.

Por outro lado, na cenoura foi observado que uma resposta ao incremento de temperatura foi a repressão da transcrição de muitas proteínas celulares, no entanto a expressão de pequenas proteínas associadas a choques térmicos (HSPs) foi incrementada preferentemente (PITTO *et al.*, 1983). Essa resposta fisiológica ao estresse térmico é uma das rotas bioquímicas mais conservadas evolutivamente na natureza (VIERLING, 1991). Muitos tecidos e células vegetais são competentes para induzir uma resposta durante o estresse térmico, mas dois estádios do ciclo de vida da planta, germinação do pólen e a embriogênese inicial, são as mais notáveis para muitas respostas ao choque térmico (SCHOFFL *et al.*, 1998).

No presente trabalho, a adição de agentes osmóticos ao meio de cultura induziu a formação de embriões somáticos diretamente sobre os tecidos do explante. O manitol, sorbitol, maltose e prolina são rotineiramente usados na cultura de tecidos por seus efeitos osmóticos e morfogenéticos (AKULA *et al.*, 2000). O estresse osmótico ocorre quando a concentração de moléculas na solução fora da célula é diferente daquela interna à célula. Quando acontece isso, a água flui de dentro ou de fora da célula por osmose, alterando o ambiente intracelular (PONDROM, 2004). Vários estudos têm reportado que o estresse osmótico causa um incremento nos níveis endógenos de ácido absícico (MORGAN, 1984; KAMADA *et al.*, 1993; MADAKADZE e SENARATNA, 2000).

No presente estudo a utilização da sacarose em alta concentração, assim como o osmorregulador do tipo plasmólico (manitol) provocaram um estresse

osmótico resultando numa resposta morfogenética associada à formação de embriões somáticos. Isso foi também observado em *Camellia sinensis*, onde a formação rápida e direta de embriões somáticos a partir de sementes maduras foi obtida quando as mesmas foram inoculadas no meio de indução contendo betaína, um osmoprotector que dá as células tolerância ao estresse hídrico, salino ou térmico pelo frio (AKULA *et al.*, 2000).

Em *Arabidopsis thaliana*, tratamentos estressantes induziram a formação de embriões somáticos a partir do domo meristemático apical e botões florais. Vários tipos de estresse induziram embriogênese somática, mas o tratamento ótimo foi o estresse osmótico com manitol (IKEDA-IWAI *et al.*, 2003).

CONCLUSÕES

A indução de embriogênese somática em *A. sellowiana* a partir de tecido somático é genótipo dependente, observando-se acessos mais responsivos a esta morfogênese. O tipo de explante utilizado é determinante na obtenção de cultura embriogênica, sendo a pétala o melhor explante para este processo. A utilização da auxina 2,4-D associado à citocinina 2-iP promove a formação de cultura embriogênica, assim como a utilização de Picloram e Dicamba. Fatores estressantes como 2,4-D em baixas concentrações, choques térmicos e alteração da osmolaridade celular por substâncias osmóticas promovem a embriogênese somática direta sobre as folhas cotiledonares do embrião zigótico.

Capítulo 2: Influência da fonte de carbono na conversão e nas poliaminas endógenas, assim como utilização do endosperma artificial na conversão *ex vitro* dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*

INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é uma técnica promissora para micropropagação clonal massal de genótipos selecionados e está sendo aplicada para a goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret), uma mirtácea nativa do Sul do Brasil, com grande potencial de produção frutífera e já cultivada em muitos países (THORP e BIELESKI, 2002). Essa técnica vem sendo estudada para esta espécie no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC, como demonstram os trabalhos de Guerra *et al.* (2001); Dal Vesco e Guerra, (2001); Stefanello *et al.* (2005) e Cangahuala-Inocente *et al.* (2007).

A obtenção e modulação de um protocolo de embriogênese somática nesta espécie, dependem da identificação e elucidação dos pontos de controle associados à indução, desenvolvimento e maturação de embriões somáticos. Para a fase de indução, estudos mostram que a fonte de carbono exerce papel fundamental (BLANC *et al.*, 1999). Os açúcares exercem função regulatória em muitos processos vitais das plantas fotossintéticas, entre os quais a regulação da expressão gênica, proliferação e morte celular, crescimento da planta, expansão foliar e senescência e desenvolvimento da semente (SMEEKENS, 2000; GIBSON, 2005; ROLLAND *et al.*, 2006).

A sacarose é o carboidrato mais amplamente usado na composição dos meios de cultura. Outras fontes são também empregadas em menor intensidade, como é o caso da frutose e rafinose, as quais incrementaram a produção de embriões somáticos em *Spinacia oleracea* (KOMAI *et al.*, 1996). Em outros casos é necessária a mudança na fonte de carboidrato no meio de cultura entre a fase de indução e de maturação, como é o caso de *Abies alba* e *Citrus deliciosa* para as quais o desenvolvimento de embriões somáticos foi obtido quando a lactose e galactose foram adicionados ao meio de cultura, respectivamente (SCHÜLLER e REUTHER, 1993; CABASSON *et al.*, 1995). Em *Hevea brasiliensis*, a embriogênese

somática foi induzida pela substituição da sacarose pela maltose (BLANC *et al.*, 1999).

Entre as substâncias associadas à regulação da morfogênese vegetal, as poliaminas (PAs) são consideradas moduladoras de vários processos biológicos, tais como divisão, crescimento e diferenciação (WALDEN *et al.*, 1997; MALMBERG *et al.*, 1998). Muitos estudos demonstraram a importância das PAs no processo de embriogênese somática e zigótica como sendo fundamental na divisão e diferenciação celular (MINOCHA e MINOCHA, 1995; MINOCHA *et al.*, 1999). As poliaminas derivam dos aminoácidos através da descarboxilação. A parte principal do esqueleto do carbono é fornecida pelos aminoácidos básicos ornitina, arginina e lisina, entando que a metionina contribui com o grupo aminopropil para a formação de espermidina e espermina (BAGNI e TASSONI, 2001).

As PAs vegetais podem ocorrer como moléculas livres, mas também conjugadas a pequenas moléculas como as amidas do ácido hidróxi-cinâmico ou a proteínas (BAGNI e TASSONI, 2001). As poliaminas conjugadas podem ser classificadas de acordo a sua solubilidade em ácido solúveis SH e insolúveis PH. As SH-PAs conjugadas aparecem como associações com pequenas moléculas como açúcares, fenóis e aminoácidos, e as PH-PAs conjugadas estão associadas usualmente com macromoléculas (TIBURCIO *et al.*, 1985).

O objetivo do presente estudos foi avaliar a influência de diferentes tipos de fonte de carbono suplementados no meio de indução, na produção, maturação e conversão de embriões somáticos, bem como determinar o conteúdo de poliaminas endógenas nos embriões somáticos originados nesses meios de cultura. Também, foi avaliada a utilização de um endosperma artificial na conversão *ex vitro* dos embriões somáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Material Vegetal

As sementes foram coletadas de plantas de *A. sellowiana* mantidas num pomar estabelecido em 1985, de propriedade do Sr. Shu Otani, em São Joaquim, SC. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram mergulhadas em hipoclorito de sódio (2 %) por 15 minutos, sendo posteriormente enxaguados três vezes com água destilada.

B. Cultivo *in vitro*

Os meios de cultivo utilizados, assim como as condições de cultivo *in vitro* foram às mesmas das aquelas detalhadas na Seção II, Capítulo 1.

C. Indução

Em câmara de fluxo laminar as sementes maduras de *A. sellowiana* foram mergulhadas em hipoclorito de sódio (2%) ajustando-se o pH em 7. Após, estas foram enxaguadas três vezes com água destilada.

Foram estabelecidos dois experimentos visando à obtenção de embriões somáticos para posteriores análises.

a. Diferentes fontes de carbono: O meio LPmM (Seção II, Capítulo 1) foi suplementado com 20 μM 2,4-D, 8 mM Glu e diferentes fontes de carbono a 3% (sacarose, maltose, frutose, glicose), constituindo cinco tratamentos com dez repetições e cinco unidades experimentais.

b. Diferentes concentrações de maltose: O meio LPmM foi suplementado com 20 μM 2,4-D, 8 mM Glu e maltose (0, 1, 2 e 3%), constituindo quatro tratamentos com nove repetições e cinco unidades experimentais.

Foi avaliada porcentagem de indução e número de embriões somáticos formados a 3, 6, 9 e 12 semanas em cultura. Após 15 semanas em cultura os embriões somáticos formados foram coletados para os estudos bioquímicos e avaliação da taxa de conversão.

D. Conversão

Foram coletados embriões somáticos nos estádios torpedo e pré-cotiledonar mantendo os tratamentos de origem do experimento com fonte de carbono. Os embriões somáticos foram inoculados em placas petri contendo o meio de cultura LPmM suplementado com 0,5 μM BAP, 1 μM AG₃, 3% sacarose, 1,5 g.L⁻¹ carvão ativado e 0,7% ágar. A unidade experimental foi constituída por 30 embriões somáticos com três repetições arranjados em blocos completamente casualizados. Taxas de conversão dos embriões somáticos em plântulas foram avaliadas aos 15 e 30 dias em cultura.

E. Análise de poliaminas endógenas

A determinação de PAs foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Silveira *et al.* (2004). As amostras (300 mg de massa fresca (MF)) foram maceradas com 1,6 mL de ácido perclórico 5% (v/v). O material macerado foi mantido no gelo por uma hora e posteriormente centrifugado a 20.000 g por 20 min, a 4 °C. O sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de ácido perclórico 5%, centrifugado novamente e os dois sobrenadantes foram homogeneizados. A fração sobrenadante contém as PAs livres e conjugadas solúveis em ácido perclórico. As PAs conjugadas foram extraídas por hidrólise ácida de 200 mL do sobrenadante em igual volume de HCl 12 N, por 18 horas a 110 °C. Posteriormente, as amostras foram secas a 40 °C sob jato de nitrogênio e ressuspensionadas em 200 mL de ácido perclórico 5%. As PAs livres e conjugadas foram em seguida derivatizadas. Na derivatização, 40 µL da amostra contendo PAs foram misturadas com 100 µL de cloreto de dansil (5 mg.mL⁻¹ em acetona), 50 µL de solução saturada de NaHCO₃ e 20 µL de 1,7- diaminoheptano (DAH) que foi utilizado como padrão interno. Após a mistura, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min, a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 µL de prolina (100 mg.mL⁻¹) com posterior incubação por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, as PAs derivatizadas foram particionadas com 200 µL de tolueno. A fase apolar (tolueno) contendo as PAs foi coletada (175 µL), seca sob jato de nitrogênio e ressuspensionada em 175 µL de acetonitrila.

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

F. Sementes sintéticas

Foram utilizados embriões somáticos no estágio torpedo e pré-cotiledonar originados no meio de cultura suplementado com maltose (3%) e pré-germinados no meio LPmM suplementado com BAP (0,5 μM), AG₃ (1 μM) (LPmMf), sacarose (3%), carvão ativado (1.5 g.L⁻¹) e ágar (0.7%) por 20 dias.

Depois de isolados e mergulhados numa solução de alginato de sódio (2%), os embriões somáticos foram capturados pelo sistema de gotas e em seguida complexados em CaCl₂ (100 mM) por 20 minutos. Oito tipos de endosperma artificial foram testados: 1) somente água (controle); 2) meio de cultura LPmM/2; 3) com BAP (0,5 μM) e AG₃ (1 μM); 4) meio de cultura LPmM/2 suplementado com BAP (0,5 μM) e AG₃ (1 μM); 5) água com carvão ativado (1 g.L⁻¹); 6) meio de cultura LPmM/2 e carvão ativado (1 g.L⁻¹); 7) BAP (0,5 μM), AG₃ (1 μM) e carvão ativado (1 g.L⁻¹) e 8) meio de cultura LPmM/2 suplementado com BAP (0,5 μM), AG₃ (1 μM) e carvão ativado (1 g.L⁻¹).

A unidade experimental foi constituída por dez embriões somáticos com quatro repetições. Dados de percentagem de emergência da plântula foram coletados aos 15 e 30 dias após semeadura em bandejas de isopor de 80 células contendo substrato Plantmax®.

G. Análise estatística

Os dados coletados em porcentagem foram submetidos a um teste de heterogeneidade de variâncias, pelo teste do F-máximo. Se detectada heterogeneidade de variâncias, os dados foram transformados. Os dados foram submetidos à análise de variância conforme o respectivo delineamento utilizado no experimento, no qual foi aplicado o F-teste 5%. Se observada significância através do F-teste as médias foram submetidas ao teste de separação de médias SNK ao nível de 5 % de significância. Foram utilizados os softwares Statgraf 7.0 e Statistica 6.0 para auxílio nos procedimentos matemáticos e estatísticos.

Para a análise de PAs, os dados foram analisados e apresentados a partir da média e seu respectivo desvio padrão (SOKAL e ROHLF, 1995).

RESULTADO

A. Indução

A.1. Fontes de carbono

A indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros foi favorecida pela adição dos carboidratos ao meio de cultura (Figura 1). De uma forma geral, os primeiros embriões somáticos (ES) foram observados principalmente sobre a região dos cotilédones dos embriões zigóticos (Figura 1A). Estes embriões desenvolveram-se de acordo com os estádios globulares, cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar (Figura 1B).

A mais alta percentagem média de indução de embriogênese somática foi obtida com a glicose seguida pela maltose (Figura 2A). Da mesma forma, o maior número de embriões somáticos formados (26,1 ES/ explante) foi obtido em resposta à glicose (Figura 2B), porém sem diferença significativa da maltose e sacarose. A frutose foi uma fonte de carbono tóxica para os explantes utilizados, observando-se necrose e mortalidade em quase todos os explantes.

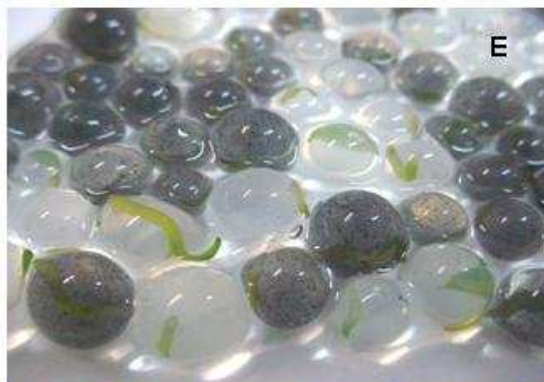
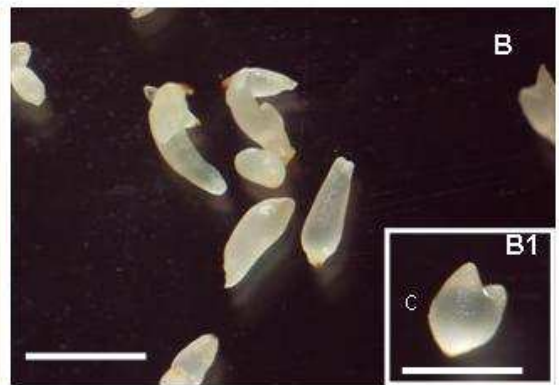
A.2 Diferentes concentrações de maltose

A indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros foi favorecida pela adição da maltose ao meio de cultura (Figura 3). A maior percentagem média de indução de embriogênese somática foi obtida com a maltose 3%, o que se refletiu em todas as semanas de avaliação, atingindo 81,7% de indução após doze semanas (Figura 3A). Para o parâmetro número de embriões somáticos, a adição de 2% de maltose resultou no maior número de embriões a partir da nona semana (12,8%), superando os valores obtidos em resposta 3% de maltose (Figura 3B).

B. Conversão

A transferência dos embriões somáticos de *A. sellowiana* no estágio torpedo e pré-cotiledonar do meio de indução provenientes de diferentes fontes de carbono, para meio de cultura isenta de 2,4-D, suplementado com fitorreguladores BAP (0,5 μ M) e AG₃ (1 μ M) e carvão ativado permitiu a conversão à plântula completa a partir dos 15 dias de transferência (Figura 1C). Os tratamentos de indução de diferentes fontes de carbono foram os que produziram número suficiente de embriões

Figura 1: Embriogênese somática de *A. sellowiana*. **A)** Embriões somáticos induzidos sobre as folhas cotiledonares do embrião zigótico usado como explante e induzidos em meios de cultura suplementados com glicose. **B)** Diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático. **C)** Conversão à plântula dos embriões somáticos originados em meio de cultura suplementados com maltose. **D)** Embriões somáticos pré-germinados submersos em alginato de sódio (3%). **E)** Embriões somáticos encapsulados nos diferentes tratamentos de endosperma artificial. **F)** Plântulas completas a partir da técnica de semente sintética *ex vitro*. **G)** Planta desenvolvida com cinco meses de idade em casa de vegetação. Abrev.: c, coração. Barra: B) 1 cm. B1) 1 mm.



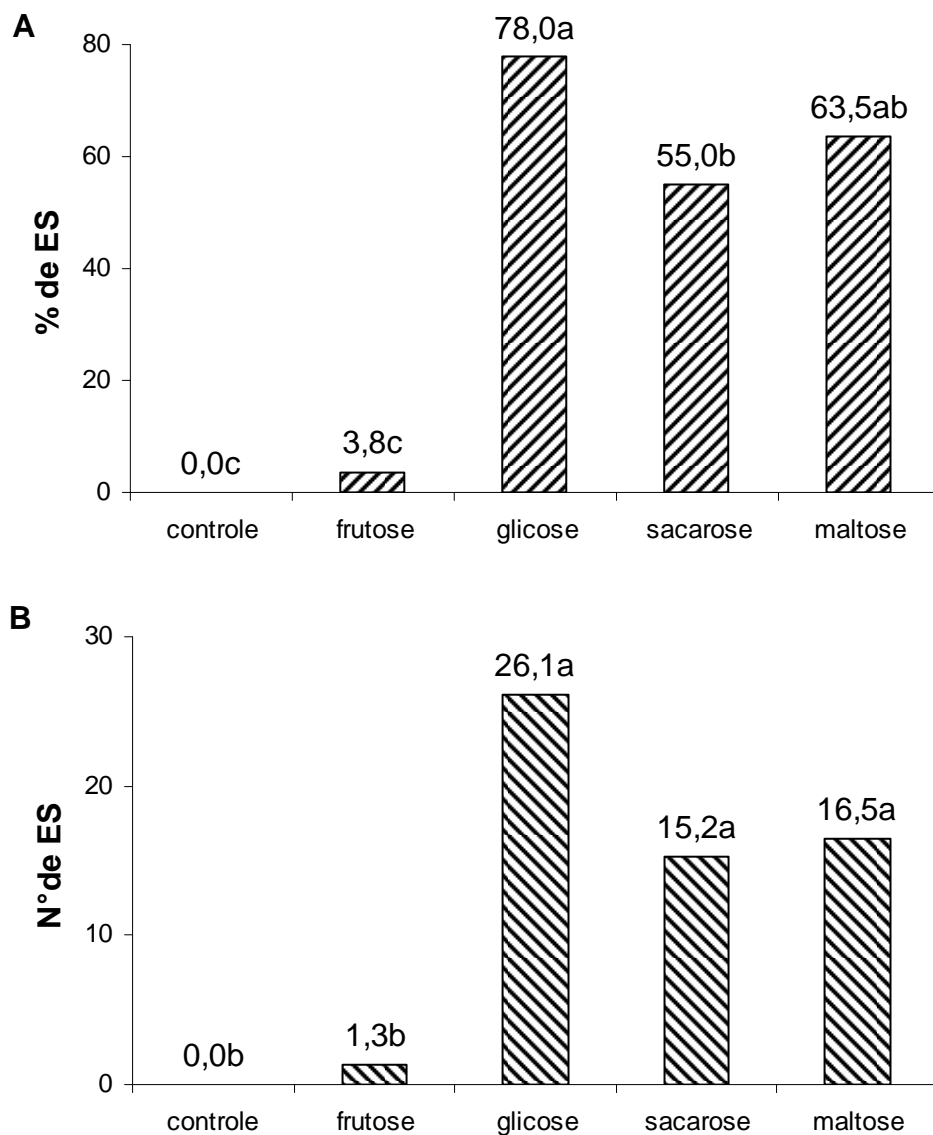


Figura 2. Indução de embriogênese somática com diferentes fontes de carbono. **A)** Percentagem média de indução de embriogênese somática (% de ES) e **B)** Número de embriões somáticos por explante (Nº de ES) de *A. sellowiana* em resposta a diferentes fontes de carbono na concentração de 3%, as doze semanas após indução. Médias seguidas por diferentes letras são diferentes estatisticamente entre si segundo o teste SNK (95%).

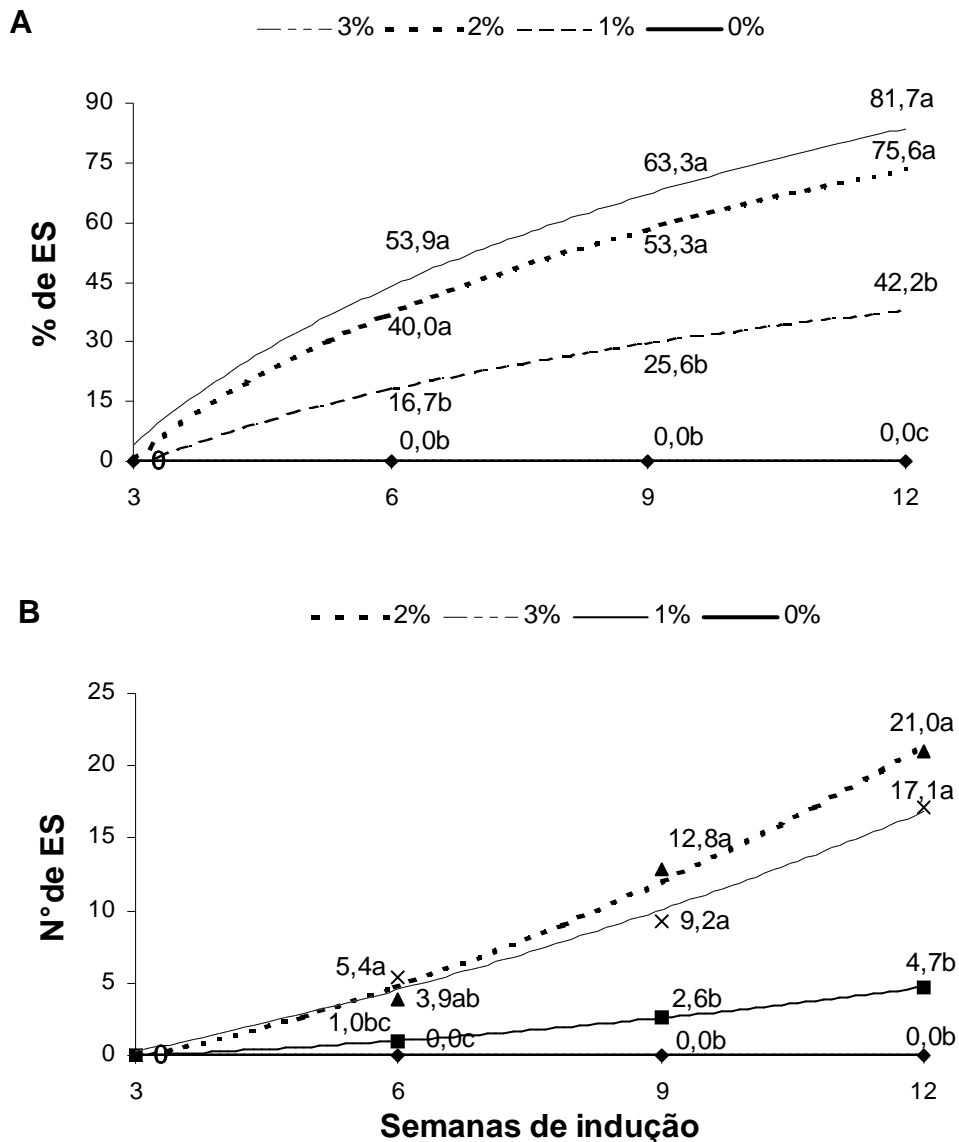


Figura 3. Indução de embriogênese somática com diferentes concentrações de maltose. **A)** Percentagem média de indução de embriogênese somática (% ES) e **B)** Número médio de embriões somáticos por explante (Nº de ES) de *A. sellowiana* em resposta a meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de maltose após 6, 9 e 12 semanas de indução. Médias seguidas por diferentes letras são estatisticamente diferentes entre si, segundo o teste SNK (95%).

somáticos para os testes de conversão bem como para a análise de PAs endógenas.

Os embriões somáticos no estágio torpedo e pré-cotiledonar provenientes do meio de indução com glicose apresentaram a maior taxa de conversão à plântula completa aos 15 dias (Tabela 1). Já aos 30 dias no meio de conversão, a taxa de conversão dos embriões somáticos originados na sacarose foi a maior, não sendo significativamente diferentes dos valores observados para os embriões somáticos originados dos meios suplementados com maltose e glicose (Tabela 1). Não se observou diferença estatística para a taxa de emissão de raiz dos embriões somáticos originados no meio de indução suplementados com diferentes fontes de carbono. Contudo, observou-se que os embriões somáticos que emitiram raiz aos 15 dias chegaram a desenvolver uma plântula completa aos 30 dias (Tabela 1).

Tabela 1: Percentagem média de conversão à plântula dos embriões somáticos de *A. sellowiana* provenientes de diferentes fontes de carbono (3%) aos 15 e 30 dias.

	15 dias (%)		30 dias (%)	
	Plântula	emissão	Plântula	emissão
sacarose	6,6B	32,3A	47,6A	4,8A
maltose	14,5AB	32,9A	44,8A	9,6A
glicose	19,4A	36,7A	39,3A	12,3A
Média	13,6	33,9	44,0	8,9

Médias dentro de cada dado seguidas por diferentes letras na vertical são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%).

C. PAs endógenas

Os embriões somáticos de *A. sellowiana*, independentemente do tratamento utilizado revelaram um aumento nos níveis das PAs totais (livres + conjugadas) em resposta ao meio de cultura contendo como fonte de carbono a maltose, seguido da glicose e sacarose (Figura 4A). Tendo em conta a concentração de maltose, a concentração de 3% resultou nos maiores valores de PAs totais em comparação aos valores observados em resposta à concentração de 2% (Figura 4A).

Ao contrário do observado com as PAs totais, a relação Put/(Spd+Spm) nos embriões somáticos provenientes de diferentes fontes de carbono foi mais baixa nos embriões somáticos cultivados no meio contendo maltose. Essa relação foi

intermediária nos embriões somáticos cultivados no meio contendo glicose e maior em resposta à sacarose (Figura 4B).

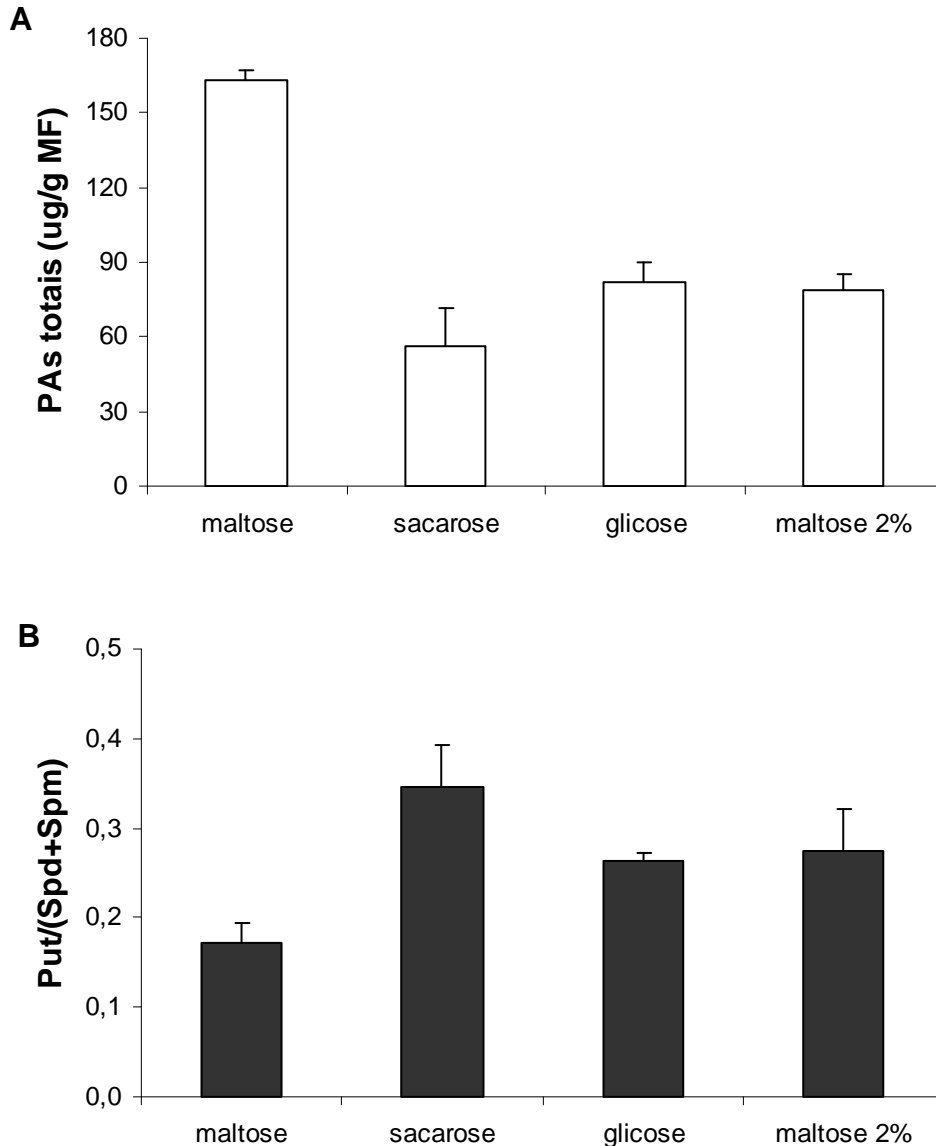


Figura 4: Concentração média de: **A)** poliaminas totais (PAs) em $\mu\text{g/g}$ de matéria fresca (MF) e **B)** Razão de PAs: Put (Spd+Spm)⁻¹ em resposta a diferentes fontes de carbono durante a indução e desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*, (média \pm desvio padrão, n=3).

Os embriões somáticos cultivados em meios suplementados com diferentes fontes de carbono apresentaram níveis proporcionalmente menores de Put, intermediários de Spd e maiores de Spm dentro das poliaminas livres totais (Figura 5A), apresentando os teores mais elevados naqueles originados no meio de

indução, suplementado com maltose. A concentração de 3% da maltose também resultou em teores mais elevados de PAs livres quando comparado com os teores observados em resposta à concentração de 2% (Figura 5A).

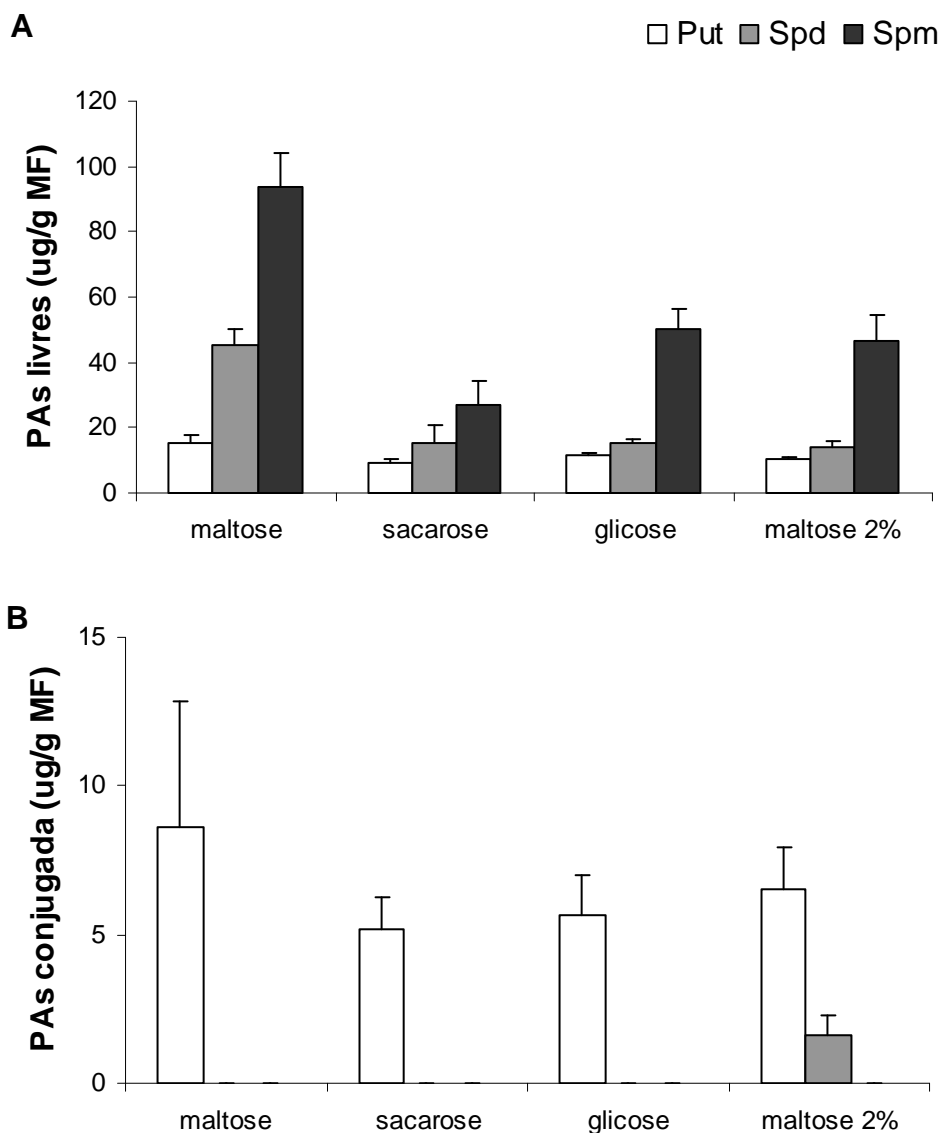


Figura 5: Concentração média de poliaminas: **A)** livres e **B)** conjugadas ($\mu\text{g/g}$) de matéria fresca (MF) em resposta a diferentes fontes de carbono durante a indução e desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*, (média \pm desvio padrão, $n=3$).

Dentro das PAs conjugadas foi detectada somente a Put nos embriões somáticos independentemente do meio de indução utilizado. Os maiores teores de Put foram detectados nos embriões somáticos oriundos do meio de indução suplementado com maltose, seguidos da glicose e sacarose (Figura 5B). Dentro das

concentrações de maltose utilizadas a concentração de 3% resultou nos maiores teores de PAs conjugadas, já a concentração de 2% resultou em teores mais elevados de Put e menores de Spd (Figura 5B).

D. Semente sintética *ex vitro*

Os embriões somáticos no estágio de torpedo, quando pré-convertidos e encapsulados em endosperma artificial (Figura 1F), geraram plântulas completas (Figura 1G) em bandejas de isopor com substrato Plantmax®. Essas bandejas foram colocadas dentro de uma caixa de plástico cobertas com vidro, dentro do fitotron com um fotoperíodo de 16 h Luz, a 25°C. A transferência destas bandejas para casa de vegetação com controle de irrigação promoveu o desenvolvimento e alongamento do eixo hipocótilo-radícula resultando em plântulas completas e fotossinteticamente ativas (Figura 1H).

A maior percentagem de conversão a plântulas completas foi obtida em resposta ao endosperma artificial suplementado com fitorreguladores, BAP (0,5 µM) e AG₃ (1 µM) (27,5%) e com o meio de cultura LPm à metade da sua força salina (26,3%), aos quinze dias de encapsulamento (Tabela 2).

Tabela 2: Percentagem média de emergência da plântula proveniente de sementes sintéticas contendo embriões somáticos de *A. sellowiana* em resposta a diferentes endospermas artificiais aos 15 e 30 dias.

Carvão ativado (g.L ⁻¹)	15 dias				30 dias					
	Emergência da plântula				Emergência da plântula					
	água		LPm/2		água		LPm/2			
	BAP (0,5 µM) + AG ₃ (1 µM)	BAP (0,5 µM) + AG ₃ (1 µM)	BAP (0,5 µM) + AG ₃ (1 µM)	BAP (0,5 µM) + AG ₃ (1 µM)	Média	Sem	Com	Sem	Com	Média
0	20,0b	16,7b c	25,0b	23,3b	21,3A	10,0c d	30,0a b	13,3c d	16,7b c	17,5A
1,5	3,3c	30,0a b	16,7b c	40,0a	22,5A	0,0d	35,0a	10,0c d	35,0a	20,0A
Média	17,5B		26,3A			18,8A		18,8A		
BAP (0,5 µM) + AG₃ (1 µM)	Sem	16,3B				8,3B				
	Co			28,9						18,8
	m	27,5A				29,2A				

Médias dentro de cada dado seguido por diferentes letras na vertical e horizontal são diferentes estatisticamente entre si, segundo o teste SNK (95%), média de quatro repetições.

A presença ou não do carvão ativado promoveu respostas favoráveis aos quinze e trinta dias não sendo diferentes significativamente. No entanto, a presença de carvão ativado promoveu as maiores taxas de conversão das cápsulas em plântula (Tabela 2).

Aos quinze dias, a mais alta taxa de emergência das plântulas da cápsula (40%) foi obtida em resposta ao endosperma artificial contendo meio de cultura LPm/2 suplementado com BAP (0,5 μ M) e AG₃ (1 μ M) e carvão ativado (1,5 g.L⁻¹), porém, aos trinta dias, as cápsulas isentas do meio LPm/2 contendo os fitorreguladores BAP (0,5 μ M) e AG₃ (1 μ M) e o carvão ativado resultaram em taxas semelhantes às observadas no tratamento citado anteriormente (Tabela 2).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, a utilização de glicose como fonte de carbono na indução e formação dos embriões somáticos resultou em maior produção, em comparação à maltose e sacarose. Isto pode ser atribuído a uma maior disponibilidade deste carboidrato no meio extracelular, assim como no transporte entre as membranas citoplasmáticas e uso rápido como fonte de energia. A composição do meio de cultura, em particular a concentração dos fitorreguladores e dos açúcares afeta a diferenciação de culturas celulares (FUKUDA e KOMAMINE, 1985; FUKUDA, 1992; ROBERTS *et al.*, 1992b).

A glicose é uma das mais antigas moléculas sinalizadoras centrais de uma ampla gama de organismos (MORENO *et al.*, 2005). A glicose é fosforilada por hexoquinase na preparação para o processamento metabólico na célula (CHO *et al.*, 2006) e na forma livre também é empregada em culturas embriogênicas fotoautotróficas (GRIEB *et al.*, 1994). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a glicose livre no meio de cultura, conjuntamente com o 2,4 D, foram fatores determinantes para a embriogênese somática de *A. sellowiana*.

Em *Araucaria angustifolia*, a sacarose suplementada ao meio de cultura durante a indução de culturas embriogênicas apresentou melhores resultados do que a maltose em termos de proliferação celular. No entanto, a suplementação do meio de cultura com maltose favoreceu o desenvolvimento de proembriões

somáticos com morfologia bipolar (STEINER *et al.*, 2005). No presente estudo, a maltose na concentração de 3% foi a segunda melhor fonte de carbono durante a indução e formação dos embriões somáticos. De acordo com Blanc *et al.* (2002), os efeitos da maltose na morfologia e histodiferenciação de culturas embriogênicas são atribuídos à baixa quantidade de hexoses presentes neste carboidrato.

No presente trabalho, a utilização da glicose como fonte de carbono na indução e desenvolvimento dos embriões somáticos também melhorou a taxa de conversão dos mesmos a plântulas, sendo igualada aos 30 dias pelas outras fontes de carbono (maltose e sacarose). Por outro lado, observou-se alta percentagem de embriões somáticos com a emissão da raiz aos quinze dias de avaliação, chegando quase todos a formar plântulas completas aos trinta dias. Isso sugere que a fonte de carbono durante a indução não afeta a taxa de conversão dos embriões somáticos em plântulas, aspecto este que poderia estar associado às substâncias de reservas acumuladas e aos hormônios endógenos, entre outras, como reportado na Seção III, Capítulo 3.

Em *Melia azedarach*, a germinação de 100% dos embriões somáticos originados em meio de cultura suplementados com 2,4-D e sacarose (3%) foi obtida quando os embriões foram transferidos para um meio com baixas concentrações de AG₃ e BAP e livre de auxinas (SHARRY *et al.*, 2006). Embriões somáticos de *Camellia sinensis* foram sensíveis à dessecação e seu desenvolvimento normal ou germinação não foram associados a agentes externos, como o frio e AG₃. A suplementação do meio de cultura com formas facilmente disponíveis de carboidratos como a sacarose ou a maltose junto com o ácido cinâmico melhorou a germinação dos embriões somáticos (MANDAL *et al.*, 2002).

As PAs são implicadas em uma série de processos celulares importantes, tais como a divisão celular, a síntese de proteínas, a replicação do DNA e as respostas aos estresses abióticos. Estudos recentes relacionam estes compostos à indução e modulação da embriogênese somática em várias espécies de plantas (KAKKAR e SAWHNEY, 2002). No presente trabalho, os teores de PAs endógenos dos embriões somáticos induzidos em meios de cultura suplementados com diferentes fontes de carbono foram significativamente maiores em embriões somáticos cultivados em meio de cultura suplementados com maltose. Estes resultados coincidem com aqueles descritos na Seção III, Capítulo 2 para os

estádios torpedo e pré-cotiledonar dos embriões somáticos induzidos em meios de cultura suplementados com maltose.

Em si, o acúmulo dos diferentes tipos de PAs livres bem como a relação entre elas foi semelhante em todos os tratamentos, mas superior nos embriões somáticos provenientes dos meios de indução suplementados com maltose. A PA livre Spm foi sintetizada em maiores teores, seguido da Spd e Put. Minocha *et al.* (1999) observaram um decréscimo no conteúdo de Put concomitantemente ao acúmulo no conteúdo de Spd ou Spm durante o desenvolvimento dos embriões somáticos de *Pinus radiata*. Ao contrário, os embriões zigóticos no estágio torpedo e cotiledonar de *A. sellowiana* e *Helianthus annuus* apresentaram maiores teores de Put, intermediários de Spd e baixos de Spm (Seção III, Capítulo 1; BENAVIDES *et al.*, 1997).

Parece claro que a degradação catabólica da Put pela diamina oxidase (DAO) não é simplesmente uma regulação do conteúdo celular dessa diamina (BAGNI e TASSONI, 2001). O catabolismo da Put resulta em compostos que desempenham importantes papéis morfogenéticos em plantas, assim como a elicitação de respostas a várias formas de estresses abióticos (BHATNAGAR *et al.*, 2002). Por exemplo, catabólitos da Put são precursores de alcalóides importantes em muitas plantas (HARTMANN, 1999).

No presente estudo observou-se uma maior produção de Put conjugada nos embriões induzidos e desenvolvidos nos meios de cultura suplementados com maltose, comparativamente às demais fontes de carbono, sendo essa a única PA conjugada detectada. A produção elevada de Put em culturas transgênicas de *Populus nigra x maximowiczii* aumentou proporcionalmente o conteúdo do DAO (BHATNAGAR *et al.*, 2002). Assim, sugere-se no presente trabalho que o acúmulo de Put nos embriões somáticos de *A. sellowiana* levaria ao acúmulo de DAO, possibilitando a formação das outras PAs, assim como a produção de polifenóis nas fases seguintes de desenvolvimento dos embriões somáticos, bem como na conversão destes a plântulas.

No presente trabalho, a reconstituição do endosperma artificial com fitorreguladores BAP (0,5 μ M) e AG₃ (1 μ M) e carvão ativado elevaram a taxa de emergência das plântulas em condições *ex vitro*, convertidas a partir de embriões somáticos originados em meios de cultura suplementados com maltose. A utilização de nutrientes dentro da cápsula de alginato está bem documentada para outros

sistemas embriogênicos, tais como para *Saccharum* sp. (NIEVES *et al.*, 2001), *Paulownia elongata* (IPECKI e GOZUKIRMIZI, 2003), *Eleutherococcus senticosus* (JUNG *et al.*, 2004) e *Citrus reticulata* (ANTONIETTA *et al.*, 2007).

Em *Saccharum* sp., os embriões somáticos pré-cultivados em ABA e encapsulados em alginato de sódio com um endosperma artificial composto do meio MS com sacarose, fitorreguladores (AG₃ e AIA), arginina e Glu, incrementou a tolerância à dessecação e melhorou a sobrevivência dos embriões somáticos (NIEVES *et al.*, 2001). De igual forma, em *Paulownia elongata* os embriões somáticos obtidos diretamente de folha foram encapsulados em meio líquido MS contendo alginato de sódio 3% complexado por 30 min em 50 mM CaCl₂. Esse meio promoveu um encapsulamento uniforme dos embriões com uma taxa de sobrevivência e germinação de 73,7% e 53,3%, respectivamente (IPECKI e GOZUKIRMIZI, 2003).

No presente estudo, os resultados obtidos com a técnica de sementes sintéticas convertidas *ex vitro*, num ambiente com temperatura e luz controlada foram semelhantes aos obtidos anteriormente com esta mesma espécie (GUERRA *et al.*, 2001; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007). Embriões somáticos no estágio cotiledonar de *Eleutherococcus senticosus* foram encapsulados em alginato de sódio 3% contendo sacarose (2%) e amido (1%); 96% dos embriões encapsulados converteram à plântula em Perlita autoclavada como substrato (JUNG *et al.*, 2004).

Métodos tradicionais de propagação da cana de açúcar foram comparados com plantas derivadas de sementes sintéticas (NIEVES *et al.*, 2003). As plantas com 12 meses de idade não apresentaram diferenças morfológicas, acúmulo de açúcares e produção. Esses resultados sugerem que as plantas derivadas de sementes artificiais podem ser uma alternativa viável para a produção comercial de cana de açúcar. De igual forma, o encapsulamento dos embriões somáticos de *Citrus reticulata* com um endosperma artificial contendo meio MS/2, extrato de malte, ácido ascórbico, AG₃, ANA, sacarose e o fungicida Tiofanato-metílico, permitiu o armazenamento das cápsulas a 4°C por 60 dias e promoveu altas taxas de brotação com uma frequência de desenvolvimento da raiz e conversão à plântula em condições *in vitro* e *ex vitro* (ANTONIETTA *et al.*, 2007)

CONCLUSÕES

As fontes de carbono utilizadas para a indução de embriogênese somática em *A. sellowiana* afetam a produção de embriões somáticos, bem como os níveis endógenos de PAs. A glicose e a maltose foram mais efetivas para a indução e formação de embriões somáticos, mas não afetaram as taxas de conversão dos embriões somáticos a plântulas. Os níveis de poliaminas endógenas nos embriões somáticos foram dependentes da fonte de carbono utilizada, sendo a maltose o carboidrato associado aos níveis mais elevados de PAs. A utilização de endosperma artificial na formação da semente sintética melhorou a conversão e sobrevivência das plântulas *ex vitro*.

SEÇÃO III

Estudos bioquímicos da
embriogênese de *A.*
sellowiana

Resumo:

Nesta seção são abordados aspectos bioquímicos associados à embriogênese zigótica e somática de *A. sellowiana*. Estudos anteriores com esta espécie enfatizaram a otimização dos protocolos de embriogênese somática visando sua propagação massal. Um dos fatores limitantes é a baixa taxa de conversão dos embriões somáticos em plântulas. O conhecimento insuficiente das mudanças bioquímicas e do metabolismo na maturação e germinação dos embriões somáticos limita a aplicação desta tecnologia. Assim, o objetivo do presente trabalho foi quantificar os teores de proteínas, açúcares totais, amido, aminoácidos, poliaminas, AIA e ABA, em diferentes fases da embriogênese zigótica e somática desta espécie. Foram detectadas variações no conteúdo endógeno de proteínas, amido, aminoácidos e poliaminas nos diferentes estádios da embriogênese somática direta. O padrão de síntese e acúmulo de proteínas e aminoácidos nos diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos guardou um paralelo com os padrões observados no desenvolvimento dos embriões zigóticos. O aminoácido prevalente foi a Asn tanto no embrião zigótico quanto no somático. Foram detectadas diferenças nos padrões de síntese e acumulação de poliaminas entre embriões somáticos e zigóticos, sendo Spd a que apresentou maiores teores no embrião zigótico entanto que Spm foi a PA prevalente nos embriões somáticos. Foram detectadas variações no conteúdo endógeno de açúcares e amido durante a germinação dos embriões zigóticos, sendo que as principais substâncias de reserva mobilizadas durante este processo foram os carboidratos e o amido. O padrão de síntese e degradação de proteínas e carboidratos durante a conversão dos embriões somáticos foi antagônico ao observado durante a germinação do embrião zigótico. Embriões zigóticos acumularam proteínas e amido ao final dos 30 primeiros dias de germinação e o contrário foi observado para os embriões somáticos. Para AIA e ABA observaram-se diferenças nos padrões de síntese e degradação entre embriões somáticos e zigóticos. Embriões somáticos apresentaram teores menores de AIA em comparação com os embriões zigóticos. Os teores de ABA aumentaram durante a germinação do embrião zigótico e diminuíram durante a conversão dos embriões somáticos. Os resultados obtidos permitiram uma melhor compreensão e elucidação das dinâmicas relacionadas com a síntese e acumulação de proteínas, carboidratos e hormônios nos embriões de *A. sellowiana*. Possibilitaram também a identificação dos pontos de controle da embriogênese somática e o ajuste das composições dos meios de cultura visando uma melhor eficiência dos protocolos associados a esta rota morfo genética.

Abstract:

In this section biochemical aspects related to *Acca sellowiana* somatic and zygotic embryogenesis are focused. Previous studies with this species stressed the optimization of protocols aiming at the mass propagation. One of the limiting factors that hinder its application is the low conversion rate of somatic embryos to plantlets. The insufficient knowledge of the metabolic and biochemical changes is a scientific constraint. The present work aimed at the quantification of protein, total sugars, starch, amino acids, polyamines, IAA and ABA in different stages of zygotic and somatic embryogenesis in this species. It was detected variations in the endogenous content of proteins, starch, amino acids and polyamines in the different stages of direct somatic embryogenesis. The pattern of synthesis and accumulation of proteins and amino acids in the different developmental stages of somatic embryos kept a parallel with the observed patterns of zygotic embryos. The prevalent amino acid in the zygotic as well as in the somatic embryos was Asn. It was detected differences in the patterns of polyamines synthesis and accumulation among zygotic and somatic embryos; Spd showed the highest levels in the zygotic embryos and Spm was the prevalent polyamine in the somatic embryos. It was also detected variations in the endogenous content of sugars and starch during the germination of zygotic embryos, the main mobilized storage substances being carbohydrates and starch. The pattern of synthesis and degradation of protein and carbohydrates during the conversion of somatic embryos showed antagonism to that observed during the germination of zygotic embryos. Zygotic embryos accumulated protein and starch after 30 days of germination, the contrary being observed for somatic embryos. It was observed differences in the patterns of IAA and ABA synthesis and degradation among somatic and zygotic embryos. Somatic embryos presented lower IAA levels than zygotic ones. The levels of ABA increased during the germination of zygotic embryos and decreased during the conversion of somatic embryos. The results of the present work allow a better comprehension and elucidation of the dynamics associated to the synthesis and accumulation of several substances of embryonary metabolism in *A. sellowiana*. These results also allowed the identification of the control points of somatic embryogenesis and the adjustment of the composition of the culture media looking at a better efficiency of the protocols associated to this morphogenic route.

Capítulo 1: Aspectos histológicos e bioquímicos da embriogênese zigótica de *Acca sellowiana*

INTRODUÇÃO

Estudos recentes têm sido direcionados para a otimização dos protocolos de embriogênese somática em *A. sellowiana* (CANHOTO e CRUZ, 1996; DAL VESCO e GUERRA, 2001; STEFANELLO *et al.*, 2005; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007) e uma das principais limitações destes protocolos está associada à baixa taxa de germinação dos embriões somáticos.

Dentre os principais limitantes na maturação e conversão dos embriões está o limitado conhecimento das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento e maturação do embrião zigótico. Assim, a determinação dos padrões bioquímicos durante o desenvolvimento embrionário pode fornecer subsídios para a otimização dos sistemas de propagação *in vitro* baseados na embriogênese somática (PULLMAN e BUCHANAN, 2003).

A embriogênese zigótica é um processo complexo e organizado, essencial no ciclo de vida dos vegetais. Este processo pode ser dividido em duas etapas principais: a primeira etapa caracterizada pela divisão celular e diferenciação do embrião, e a segunda caracterizada pela maturação do embrião. Nesta última etapa ocorre o acúmulo dos principais compostos de reserva e a preparação do embrião para a tolerância à desidratação, dormência e germinação (MORDHORST *et al.*, 1997; SALLANDROUZE *et al.*, 2002).

A síntese e acúmulo de substâncias de reserva representam um estágio chave na embriogênese zigótica (MERKLE *et al.*, 1995). Estas substâncias podem ser consideradas como marcadores bioquímicos confiáveis da qualidade dos embriões zigóticos e somáticos. Os aminoácidos são substâncias importantes no metabolismo do nitrogênio, representando o produto inicial da assimilação primária do mesmo, na síntese de proteínas, atuando também na sua forma de transporte para as regiões autotróficas e heterotróficas da planta (ORTIZ-LOPEZ *et al.*, 2000). Já, as poliaminas, aminas alifáticas com carga positiva em pH neutro, desempenham papel fundamental na proliferação e diferenciação celular (BOUCHEREAU *et al.*, 1999), bem como na síntese protéica, replicação do DNA e em resposta ao estresse hídrico nas plantas (BAIS e HAVISHANKAR, 2002).

As auxinas exercem forte influencia nos processos de expansão, divisão celular na definição de órgãos e promoção da diferenciação do sistema vascular (LIU *et al.*, 1993). Na embriogênese zigótica, as auxinas estão associadas à regulação do padrão de formação embrionário (FISCHER-IGLESIAS e NAUHAUS, 2001). Outro hormônio que afeta o desenvolvimento da semente é o ácido absícico (ABA), havendo evidências de que a germinação precoce é prevenida por este hormônio (KERMODE, 1995). O ABA promove também a acumulação de substâncias de reserva (CAILLOUX *et al.*, 1996), a maturação do embrião (BLACK, 1991) e reduz a frequência de mal formações (ETIENNE *et al.*, 1993) e embriogênese somática secundária (NUUTILA *et al.*, 1991).

O objetivo do presente trabalho foi quantificar os teores de proteínas, açúcares totais, amido, aminoácidos, poliaminas, AIA e ABA durante a formação e desenvolvimento do embrião zigótico de *A. sellowiana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

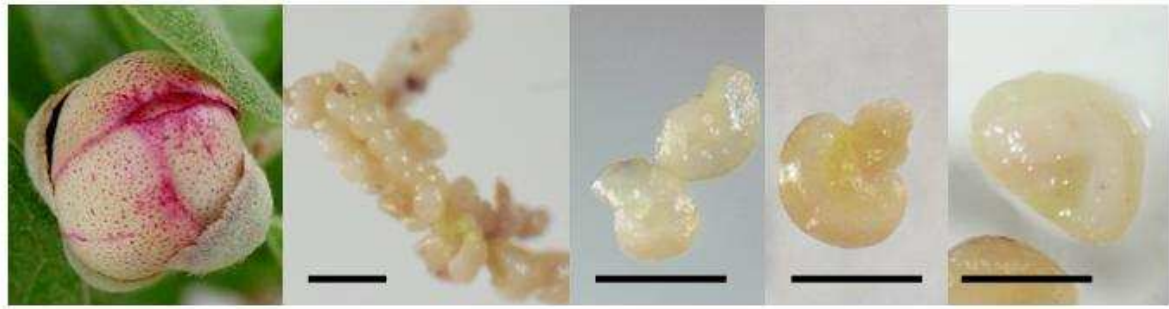
As coletas dos materiais de *A. sellowiana* foram realizadas na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), São Joaquim, SC no período de novembro de 2004 a março de 2005. Cerca de 3800 flores foram emasculadas e polinizadas manualmente. Rudimentos seminiais oriundos de flores não polinizadas foram considerados o tempo zero de coleta. Foram coletados frutos aos 21 e 30 dias e posteriormente a cada 15 dias até a maturação dos frutos 120 dias (Figura 1). Todo o material vegetal coletado foi imediatamente colocado em gelo seco e, posteriormente, estocado a -20°C.

Análise histológica

Para os estudos histológicos, uma parte das amostras foi fixada em glutaraldeído a 1% e formaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2M pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965) durante 24 horas. Após a fixação, essas amostras foram desidratadas progressivamente em série etanólica de 10% a 95% e, posteriormente, infiltradas com historesina.

Em seqüência as amostras foram colocadas na solução de pré-infiltração (historesina: etanol 95%, 1:1, v/v) durante 24 horas e, em seguida, transferidas para

Figura 1: Desenvolvimento da semente de *A. sellowiana* após a polinização dirigida. 0 DAP: botão floral na fase balão, 21 DAP: formação do embrião zigótico com sucessivas divisões celulares originando um proembrião, 30 DAP: embrião zigótico no estágio globular, 45 DAP: embrião zigótico no estágio cordiforme, 60 DAP: embrião zigótico no estágio torpedo com endosperma ainda líquido, 75 DAP: embrião zigótico no estágio cotiledonar com presença de endosperma, 90, 105 e 120 DAP: embrião zigótico no estágio cotiledonar sem presença de endosperma. Barra = 1 mm.



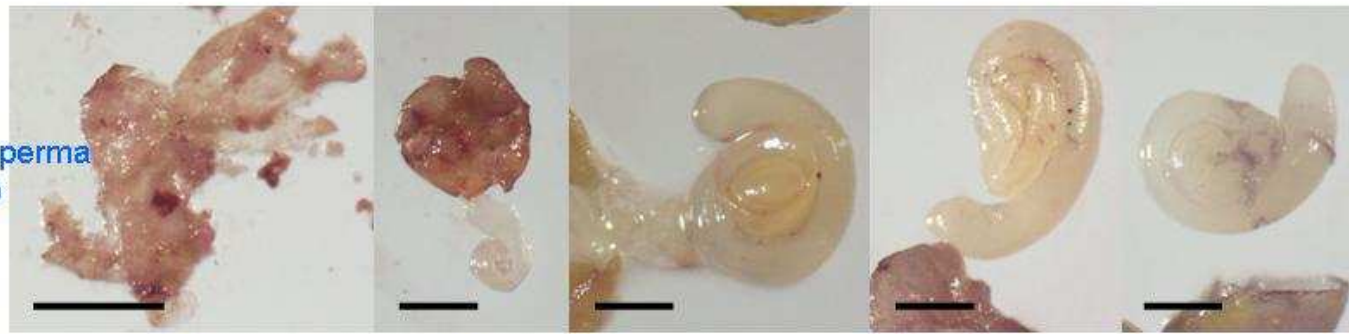
0 21 30 45 60

Endosperma líquido



75 90 105 120

Endosperma sólido



Endosperma líquido

60 75 90 105 120

Endosperma sólido

a solução de infiltração (historesina pura) por sete dias, à temperatura de 5°C. As amostras foram então colocadas em moldes que continham a solução de inclusão (ARNOLD *et al.*, 1975). Das amostras incluídas foram obtidos cortes longitudinais e transversais seriados (5 µm de espessura), utilizando-se micrótomo rotativo (Slee, Cut 4055). A coloração das seções foi obtida com azul de toluidina (C.I. 52040) a 0,05% em tampão fosfato 0,2M e pH 6,8 (O'BRIEN *et al.*, 1965), durante 1 minuto.

Análise bioquímica

A. Extração e determinação do conteúdo de proteínas totais.

Amostras de 300 mg de cada material foram maceradas à temperatura de 4°C com tampão de extração, composto de 50 mM.L⁻¹ 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. Estas amostras foram maceradas e centrifugadas a 5000 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 adição de dois volumes de álcool etílico absoluto para cada volume de sobrenadante e, em seguida, as amostras foram armazenadas a 0°C por 15 min. Após este período as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 20 minutos a 0°C. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) com as modificações de Read e Northcote (1981), e com a utilização de albumina de soro bovino como padrão.

B. Determinação dos teores de açúcares totais

A extração dos açúcares solúveis totais foi realizada segundo a metodologia de Shannon (1968). Os precipitados das amostras utilizadas para a extração de proteínas foram macerados em cadinho com 2 mL de solução MCW (metanol:clorofórmio:água) na proporção de 12:5:3 e centrifugadas durante 10 minutos a 2000 rpm para a obtenção do sobrenadante. Foi realizada uma segunda extração com 2 mL de MCW e, após a centrifugação, os dois sobrenadantes foram unidos, reservando-se o precipitado para posterior análise. Para cada quatro partes de sobrenadante, adicionados uma parte de clorofórmio e 1,5 partes de água, seguido de uma centrifugação de 10 minutos a 2000 rpm, onde foram obtidas duas fases aquosas, retirando-se a fase aquosa superior para a posterior dosagem.

A dosagem foi realizada pelo método de Umbreit e Burris (1960), utilizando-se o reagente antrona 0,2%. Para o preparo do reagente dissolveu-se 200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 95%. Alíquotas de 1mL foram obtidas dos extratos e foram adicionadas a 2 mL de antrona 0,2%. Em seguida, as amostras 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 teores de açúcares solúveis totais foram obtidos a partir da curva padrão, preparada com concentrações de 0 a 100 µg.mL⁻¹ de glicose, diluídas em água destilada.

C. Extração e determinação do conteúdo de amido

A extração e a determinação do conteúdo de amido total foram realizadas através do método de McCready *et al.* (1950). Os precipitados das amostras utilizadas para a extração de açúcares totais foram macerados em 1mL de álcool etílico 80% aquecido a 50-60°C, para eliminação do conteúdo de açúcares solúveis totais ainda presentes nas amostras. Após centrifugação por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a extração do amido foi iniciada a partir do precipitado. O precipitado foi então macerado com 1mL de ácido perclórico 30% e centrifugado a 10000 rpm, por 15 minutos.

Alíquotas de 1mL das amostras foram adicionadas em 2mL de antrona 0,2%. Em seguida, as soluções foram agitadas e aquecidas em água fervente, por três minutos. Após resfriamento, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 620 nm. Como padrão foi utilizado glicose (Sigma® G-8270) diluída em ácido perclórico 30%. Os valores encontrados nas amostras foram multiplicados pelo fator 0,9 para a conversão em amido.

D. Extração e determinação de aminoácidos

A metodologia para a determinação de aminoácidos livres: Arginina (Arg), Alanina (Ala), Ácido aspártico (Asp), Ácido glutâmico (Glu), Asparagina (Asn), Serina (Ser), Glutamina (Gln), Histidina (His), Ácido γ-aminobutírico (Gaba), Glicina (Gly), Treonina (Ter), Tirosina (Tir), Metionina (Met), Triptofano (Trp), Valina (Val), Fenilalanina (Phe), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Lisina (Lis) e Ornitina (Orn); seguiu os procedimentos de Astarita *et al.* (2003a).

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

A identificação e quantificação dos aminoácidos por HPLC foram realizadas utilizando-se uma coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Foram utilizados como solventes metanol 65% e uma solução de acetato de sódio 50 mM, fosfato de sódio 50 mM, metanol (20 mL.L⁻¹) e tetrahydrofurano (20 mL.L⁻¹), com pH 8,6 ajustado com ácido acético glacial. A mudança na proporção de metanol 65% em relação ao outro solvente definiu o gradiente de corrida, sendo o gradiente de metanol 65% programado para 15% durante os primeiros 34 min, de 15 a 35% entre 34 e 55 min, de 35 a 85% entre 55 e 75 min, de 85 a 100% entre 75 e 85 min e 100% até 100 min, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, a 40° C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 250 nm e emissão de 480 nm. Foram injetados 20 µL da solução derivatizada com OPA. As áreas e tempos de retenção de cada aminoácido foram avaliados por comparação com aminoácidos padrão em concentrações conhecidas.

E. Extração e determinação das Poliaminas

A determinação de PAs: Putrecina (Put), Spermidina (Spd) e Spermina (Spm) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Silveira *et al.* (2004), detalhada na Seção II, Capítulo 2.

F. Determinação de AIA e ABA

A metodologia para a determinação de AIA e ABA foi baseada naquela descrita por Silveira *et al.* (2004a). Amostras (1g de MF) foram maceradas com tampão de extração (etanol 80% + 1% polivinipirrolidona-40) e o [³H]AIA e [³H]ABA radioativos foram utilizados como padrão interno para a determinação do rendimento do processo. O extrato foi agitado por 1 h e 30 min, no escuro a 4°C, e centrifugado a 15.500 x g por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi concentrado em "speed vac" a

45 °C, 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 contendo o AIA e o ABA foi coletada e seca em "speed vac", a 45 °C. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 200 μ L de metanol 100% e transferidas para tubos do tipo eppendorf e armazenadas a -80° C, para análises posteriores em HPLC.

A quantificação do AIA e ABA foi realizada por HPLC em fase reversa, com coluna C18 (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Utilizaram-se como solventes 100% metanol e uma solução de 10% água-metanol e 0,5% ácido acético. A mudança na proporção de metanol em relação ao outro solvente definiu o gradiente de corrida, sendo o gradiente de metanol 100% ajustado para aumentar de 20% a 30% durante os primeiros 10 min, de 30 a 45% entre 10 e 22 min, de 45 a 54% entre 22 e 33 min, de 54 a 100% entre 33 e 34 min e 100% até 60 min, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, a 40 °C. Para a detecção do AIA, o detector de fluorescência foi ajustado para excitação em 280 nm, e emissão em 350 nm. Para a detecção do ABA, o detector de UV foi ajustado em 254 nm. Foram injetados 40 μ L da amostra. Coletaram-se frações contendo AIA e ABA as quais foram 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.

Delineamento e análise estatística

Os dados de cada tratamento foram analisados com intervalo de confiança para verificar precisão dos procedimentos adotados durante a condução do experimento e apresentados a partir da média e seu respectivo desvio padrão (SOKAL e ROHLF, 1995).

RESULTADOS

A. Formação dos embriões zigóticos

O tempo zero correspondeu aos rudimentos seminais de *A. sellowiana*, os quais são do tipo anátropo (Figura 2a), bitegmentados, com placentação axilar,

desenvolvendo-se assincronicamente (Figura 2b). A nucela apresenta um grande número de camadas de células com núcleos proeminentes (Figura 2b), caracterizando um rudimento seminal crassinucelado.

Aos 21 dias após polinização (DAP), observou-se que as primeiras divisões celulares da embriogênese resultaram na formação do proembrião (Figura 2c), constituído por um aglomerado de células em sua extremidade apical, das quais deriva todo o embrião propriamente dito, e por um grupo de células basais, formando o suspensor (Figura 2d). Aos 30 DAP, após uma série de divisões mitóticas, as células apicais do proembrião originaram uma massa esférica de células, correspondente ao estágio globular (Figura 2e, f). O endosperma de posição nuclear era constituído por uma camada de células com núcleos visíveis (Figura 2e).

Aos 45 DAP, o embrião encontrava-se na fase cordiforme apresentando a forma bilobada devido à formação inicial dos cotilédones (Figura 3a, b). Em corte perpendicular ao eixo central observou-se uma camada de células externas muito bem definidas correspondentes a protoderme (Figura 3b). Sessenta dias após a polinização, o embrião alcançava o estágio de torpedo, com um eixo apical-basal alongado (dados não mostrados).

O estágio cotiledonar em fase inicial foi observado no fruto aos 75 dias após polinização e neste estágio os cotilédones apresentavam-se pouco espessados (Figura 3e). Aos 90 dias após polinização observou-se que as células das folhas cotiledonares ainda não estavam espessas, mas já tinham perdido o endosperma (Figura 3f). Também se observaram neste estágio células indiferenciadas em ambas as extremidades, correspondente aos meristemas apical (Figura 3g) e basal (Figura. 3h) do eixo epicótilo - radícula. Posteriormente, entre os 105 e 120 DAP, observou-se a maturação do fruto, o endosperma totalmente consumido e os cotilédones engrossados pela presença de substâncias de reservas acumuladas (ver Figura 1).

B. Proteínas, açúcares totais e amido

A concentração de proteínas totais encontradas durante a formação dos embriões zigóticos coletadas após 105 dias de polinização foram baixas em comparação com a concentração de proteínas no embrião zigótico maduro registrado em 2001 ($1,1 \text{ mg.g}^{-1}$) (CANGAHUALA-INOCENTE, 2002). Contudo, os teores de proteínas mantiveram-se constante durante a formação do embrião zigótico, variando entre $0,24$ e $0,39 \text{ mg.g}^{-1}$ de proteína MF (Figura 4).

Figura 2. Seções histológicas do processo de embriogênese zigótica de *A. sellowiana*. **a)** rudimento seminal do fruto imaturo 0 DAP, corado com AT-O, **b)** detalhe da abertura da micrópila e a presença de dos tegumentos de proteção, **c)** formação do pró-embrião no fruto imaturo, **d)** células do suspensor e do proembrião, **e)** fruto imaturo aos 30 DAP, observando-se o embrião zigótico em estágio globular, **f)** detalhe do embrião zigótico em estágio globular e a presença do tegumento externo de proteção. Barra = 10 μ M.

Abrev.: mi: micrópila, te: tegumento, ca: calaza, nu: nucela, fu: funículo, Tex: tegumento externo, Tin: tegumento interno, en: endosperma, ez: embrião zigótico, sus: suspensor, pro-em: proembrião, glo: estágio globular.

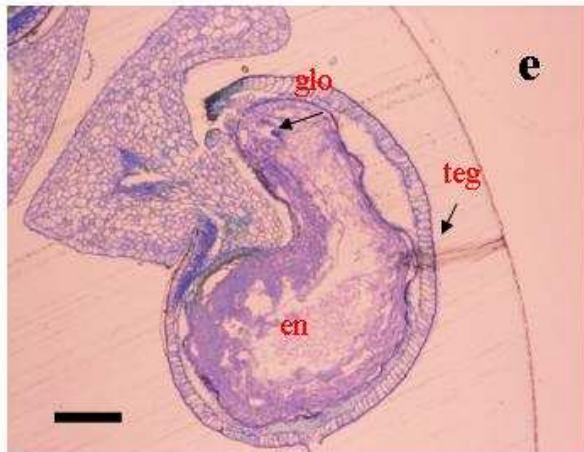
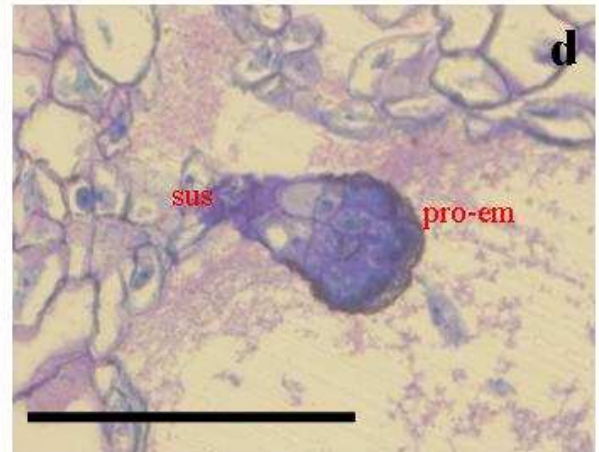
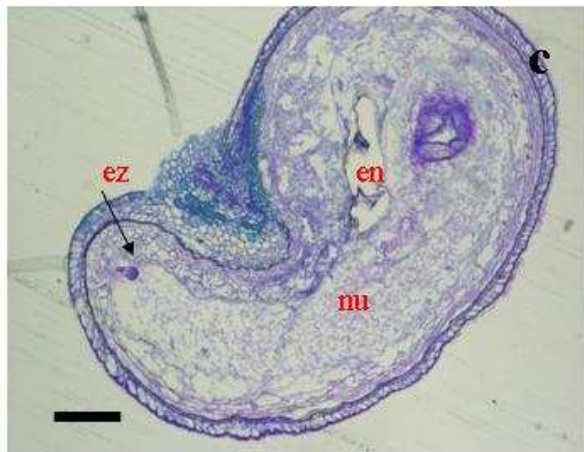
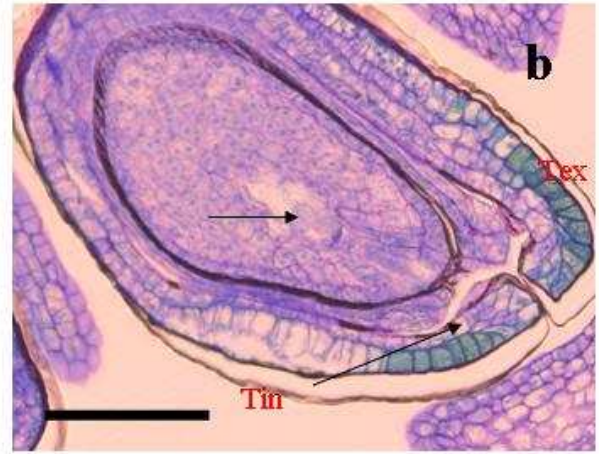
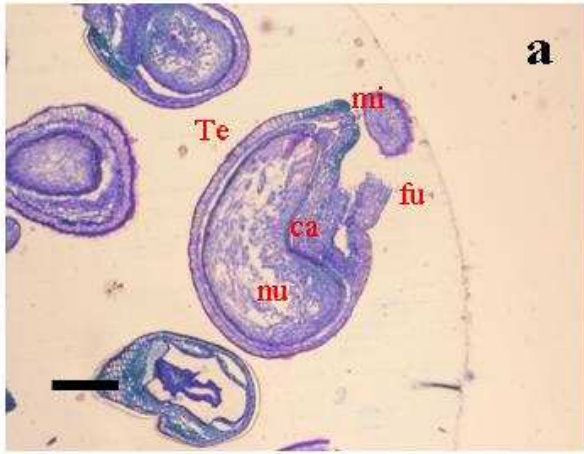
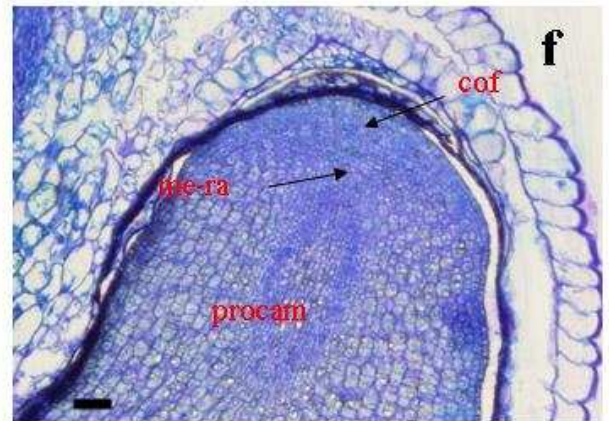
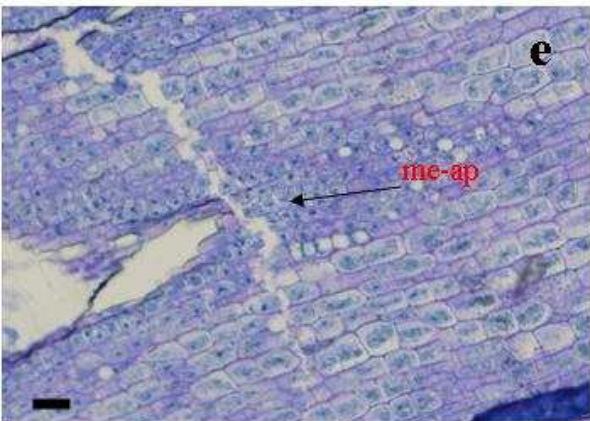
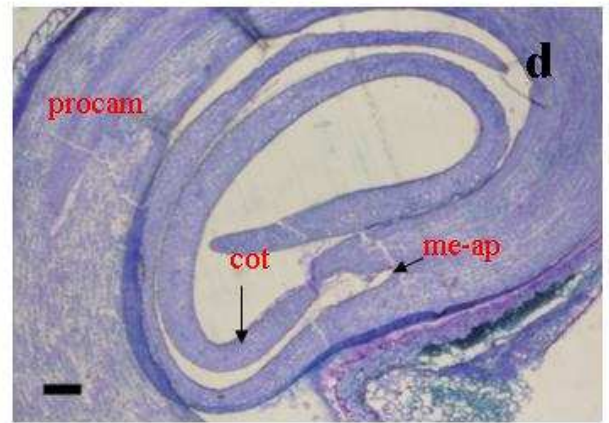
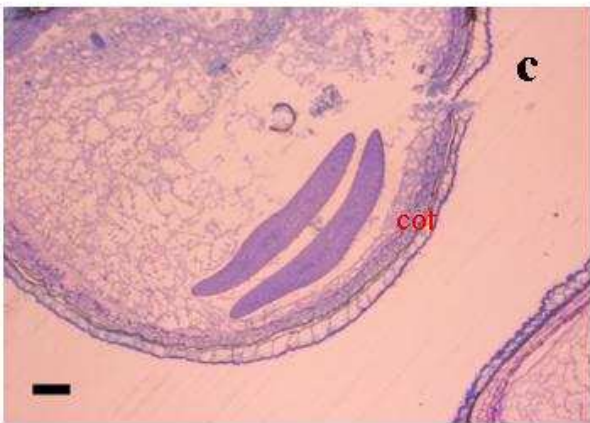
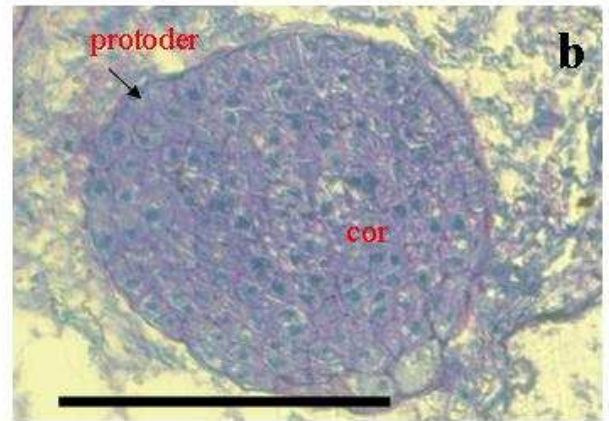
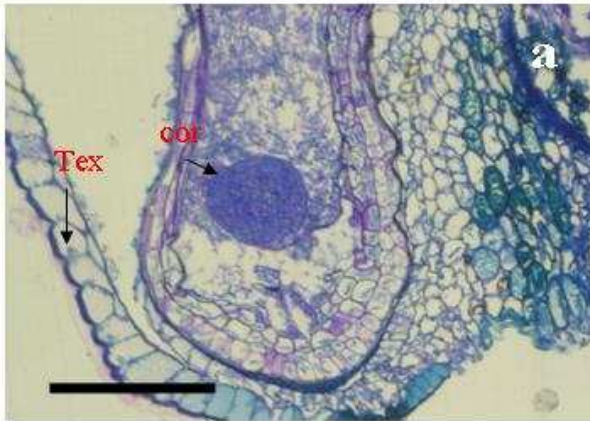


Figura 3: Seções histológicas do processo de embriogênese zigótica de *A. sellowiana*. **a)** Fruto imaturo aos 45 DAP observando-se o embrião zigótico em estágio cordiforme, **b)** detalhe do embrião zigótico em estágio cordiforme e a presença da protoderme, **c)** seção longitudinal do embrião zigótico no estágio cotiledonar inicial aos 75 DAP, **d)** seção longitudinal do embrião zigótico no estágio cotiledonar aos 90 DAP, **e)** detalhe do meristema radicular, **f)** detalhe do meristema apical. Notar que as células das folhas cotiledonares são pouco espessadas. Barra = 10 μ M.

Abrev.: Tex: tegumento externo, cor: cordiforme, protoder: protoderme, cot: cotilédone, procam: procâmbio, me-ap: meristema apical, me-ra: meristema radicular, cof: coifa.



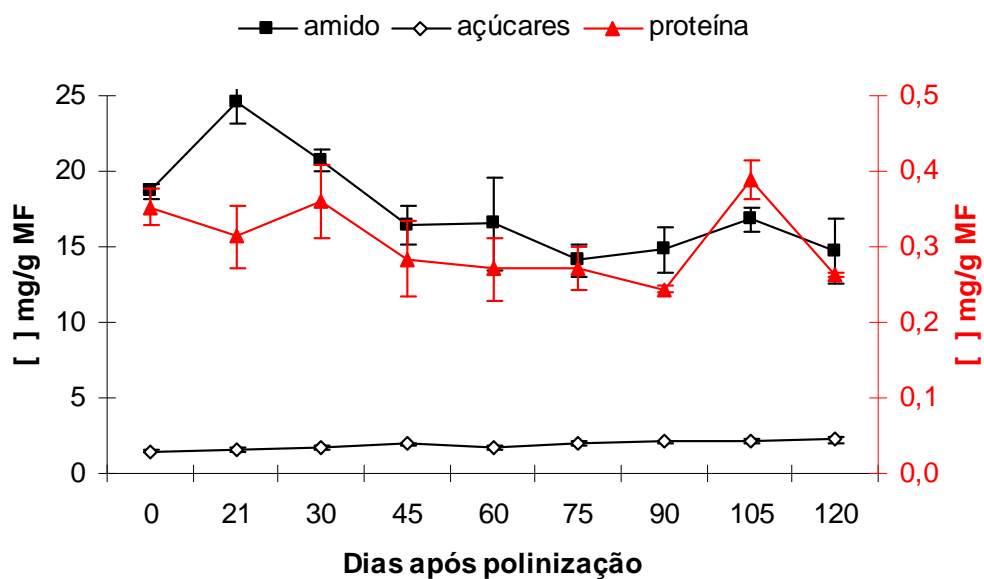


Figura 4. Concentração média de proteínas totais, amido e açúcares totais (mg/g) de Matéria fresca (MF) durante a formação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, (média \pm desvio padrão, n=3).

Durante a formação do embrião zigótico, os açúcares solúveis totais apresentaram valores crescentes de 1,45 a 2,23 mg.g⁻¹ ao longo do período avaliado (Figura 4). Já, os teores de amido mantiveram-se quase constantes durante a formação do embrião zigótico. Assim, aos 21 DAP registrou-se o maior valor de amido (24,5 mg.g⁻¹ MF) (Figura 4), coincidindo com a fertilização do gametófito feminino e a formação do embrião zigótico, seguido de um decréscimo paulatino até os 120 dias de avaliação.

C. Aminoácidos

Durante o desenvolvimento embrionário de *A. sellowiana* observou-se que o conteúdo de aminoácidos totais analisados até os 30 dias de cultura manteve-se constante, aumentando aos 45 dias, período na qual o embrião zigótico encontrava-se no estágio cordiforme (Figura 5). Seguindo o desenvolvimento do embrião, o conteúdo de aminoácidos totais aos 60 dias decresceu significativamente. Um acréscimo acentuado no conteúdo de aminoácidos foi observado aos 75 DAP (Figura 5), período no qual o embrião zigótico encontrava-se no estágio cotiledonar.

Posteriormente foi observado um decréscimo progressivo nos teores de aminoácidos entre os 90 e 105 DAP (Figura 5).

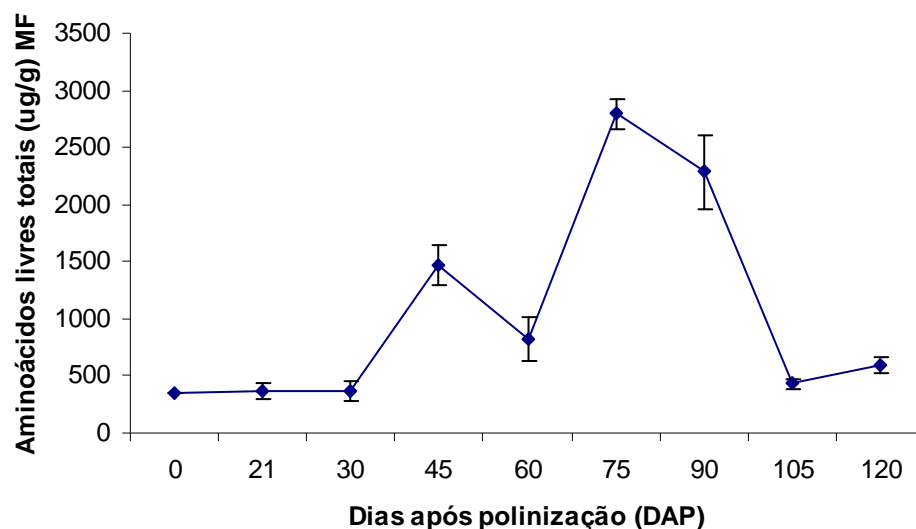


Figura 5. Aminoácidos totais durante a formação e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, antes da polinização (tempo 0) e dias após polinização (DAP) (média \pm desvio padrão, n=3).

O Asn foi o aminoácido predominante durante o desenvolvimento dos embriões zigóticos, sendo sua concentração mais elevada no final do desenvolvimento embrionário (75 e 90 DAP), quando os cotilédones encontram-se completamente desenvolvidos (Figura 6). Dentre os aminoácidos livres quantificados durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *A. sellowiana*, o Gln, Asp, Gaba e Ala, ocorreram em concentrações menores que a Asn, porém mais elevadas que os demais (Figura 6). Os maiores valores foram obtidos durante o desenvolvimento completo dos cotilédones (75 e 90 DAP), sendo estes aminoácidos, juntamente com a Asn, os responsáveis pelo aumento significativo no conteúdo de aminoácidos livres neste estágio de desenvolvimento.

Durante o desenvolvimento e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, os aminoácidos Ser, Asp, His e Glu ocorreram em concentrações menores em relação ao grupo anterior (Gln, Asp, Gaba e Ala). Seguido dos aminoácidos Tre, Leu, Gly, Phe, Tir, Ile, Val e Lis (Figura 7) que apresentaram valores intermediários a baixos. Por último, as menores concentrações registradas foram dos aminoácidos Met, Trp e Orn; e este último, apresentou o menor nível, sendo este constante em todos os períodos avaliados (Figura 7). Glu e Tir foram os únicos aminoácidos que

Figura 6. Aminoácidos livres durante a formação e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, antes da polinização (tempo 0) e após polinização (DAP). **A.** Asn; **B.** Gln; **C.** Arg; **D.** Gaba; **E.** Ala **F.** Ser; **G.** Asp; **H.** His; **I.** Glu; **J.** Met. (média \pm desvio padrão, n=3).

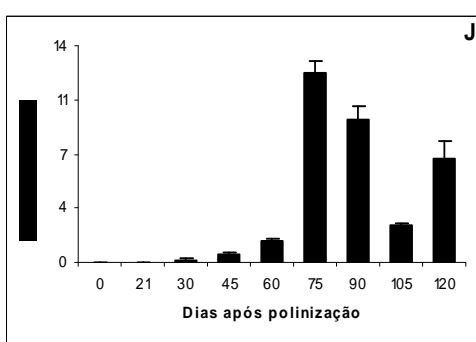
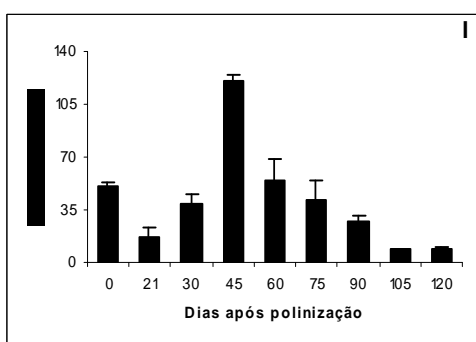
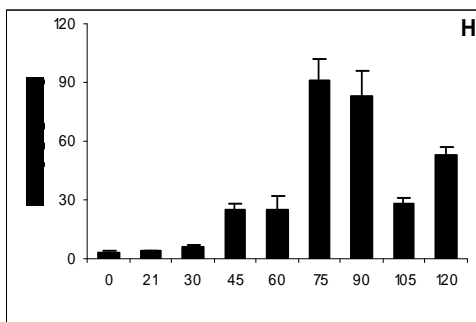
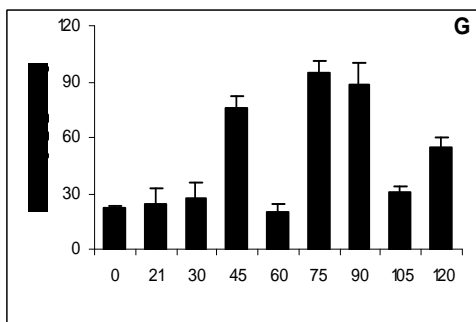
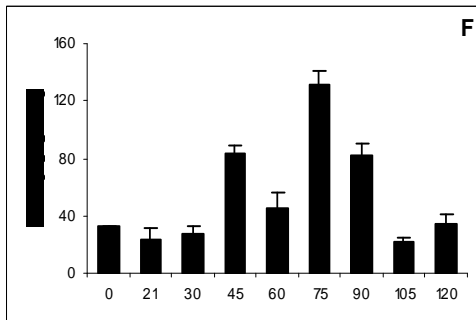
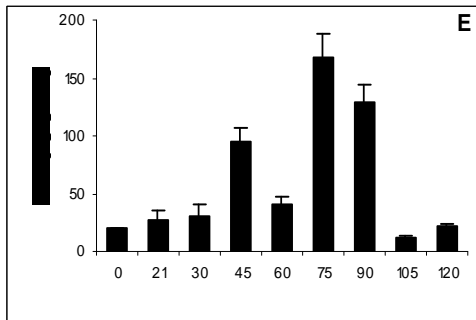
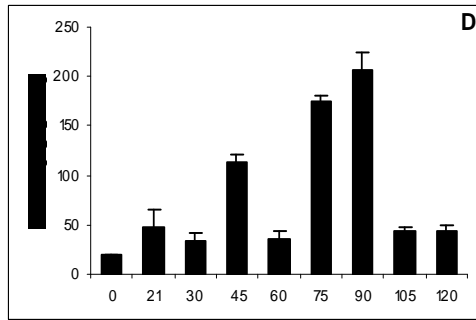
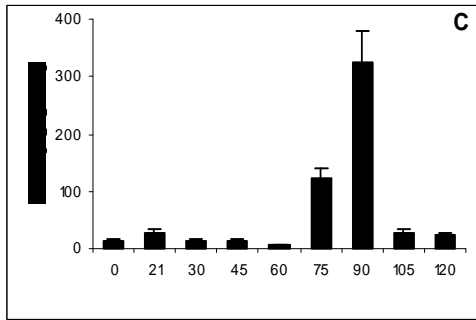
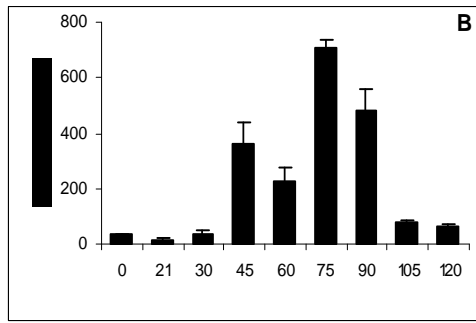
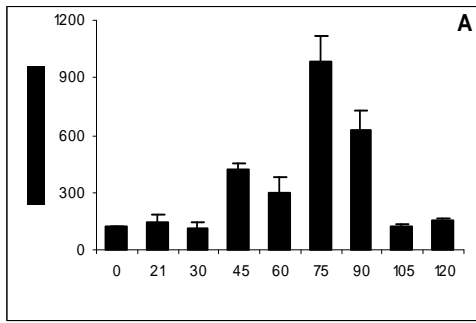
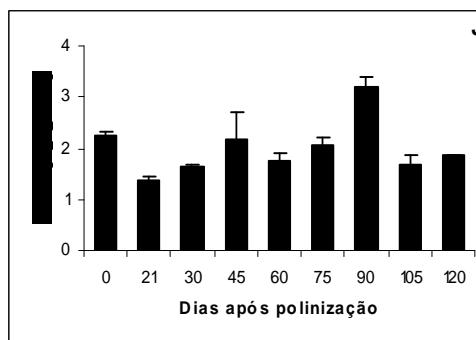
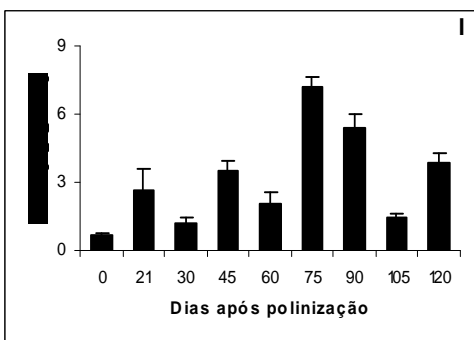
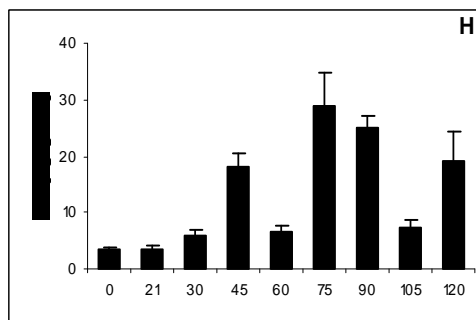
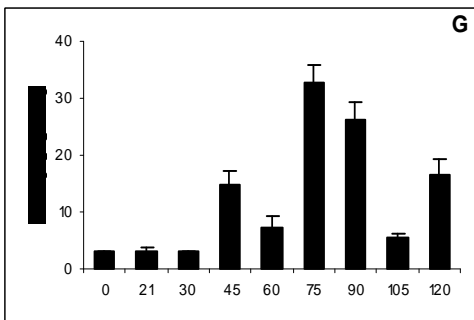
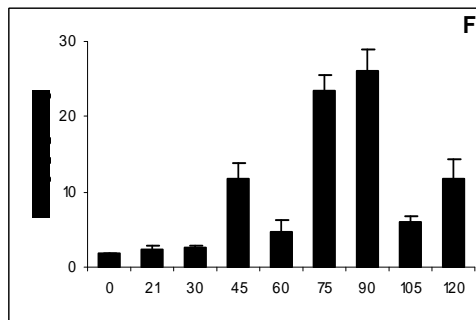
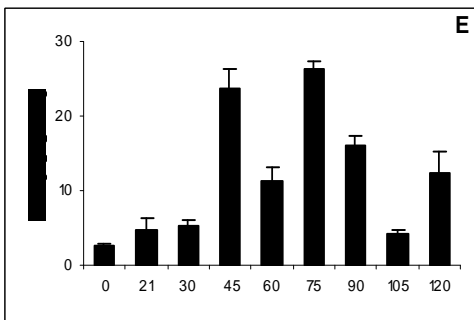
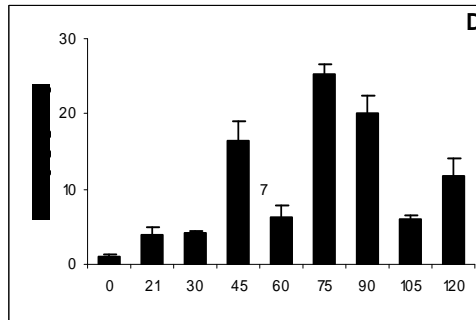
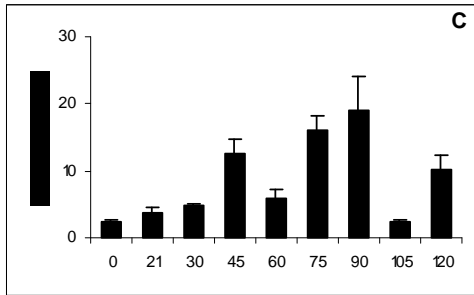
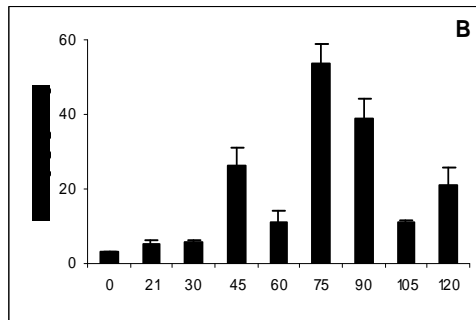
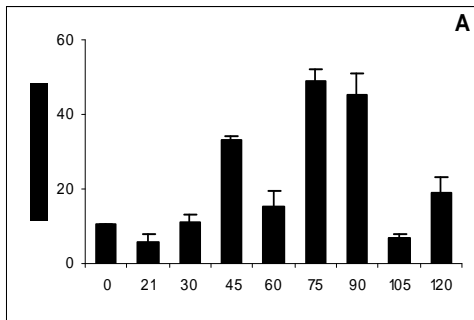


Figura 7. Aminoácidos livres durante a formação e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, antes da polinização (tempo 0) e após polinização (DAP). **A.** Tre; **B.** Leu; **C.** Gly; **D.** Phe; **E.** Tir; **F.** Ile; **G.** Val; **H.** Lis; **I.** Trp; **J.** Orn. (média \pm desvio padrão, n=3).



ocorreram em concentrações maiores no estágio cordiforme do embrião zigótico (45 DAP) (Figuras 6 e 7).

D. Poliaminas (PAs)

Os teores de PAs totais foram menores no gametófito feminino antes da polinização (tempo zero), aumentando significativamente aos 21 DAP, correspondente ao período de fertilização e formação do embrião zigótico. Nos estádios subseqüentes os teores de PAs totais foram maiores aos 30 e 45 DAP, diminuindo subsequentemente (Figura 8A). Os teores máximos foram observados aos 45 DAP. Por outro lado, embriões zigóticos no estágio cotiledonar (90 DAP), mostraram aumento significativo nos teores de PAs totais, com posterior redução na semente madura (120 DAP). (Figura 8A).

No presente trabalho, a relação de PAs $[\text{Put}:(\text{Spd}+\text{Spm})^{-1}]$ foi baixa tanto no tempo 0 quanto aos 21 DAP (Figura 8B). Já a relação de PAs $[\text{Put}:(\text{Spd}+\text{Spm})^{-1}]$ foi alta durante o desenvolvimento do embrião zigótico (30, 45 e 60 DAP), correspondentes, respectivamente aos estádios globular, cordiforme e torpedo do embrião zigótico, sendo os maiores valores detectados no estágio cordiforme e decrescendo no estágio cotiledonar (Figura 8B).

As poliaminas livres apresentaram teores menores de Put, maiores de Spd e intermediários de Spm, no tempo zero, equivalente estágio de gametófito antes da polinização. No momento da fertilização e formação do embrião zigótico (DAP 21), correspondente a uma fase de peças florais em senescência, os teores de PAs livres foram intermediários para Put, altos para Spd e baixos para Spm (Figura 9A).

Nos estádios subseqüentes os teores de PAs livres apresentaram padrão de variação semelhante entre Put e Spd e menor para Spm durante o desenvolvimento do embrião zigótico (30-75 DAP), predominando a Put em todos os estádios. Aos 60 DAP, a relação foi à mesma, mas os teores foram menores. A Spd livre apresentou os teores mais altos aos 105 e 120 DAP. Baixos teores de Spm livre foram observados em todos os estádios de desenvolvimento (Figura 9A).

Os perfis de PAs conjugadas foram similares aos observados para a PAs livres. No entanto, a diferença com as PAs livres, a Spm conjugada apresentou a concentração mais elevada no tempo 0, equivalente à fase de fertilização. Já, a Spd apresentou a concentração mais alta na fase de formação do embrião zigótico (DAP

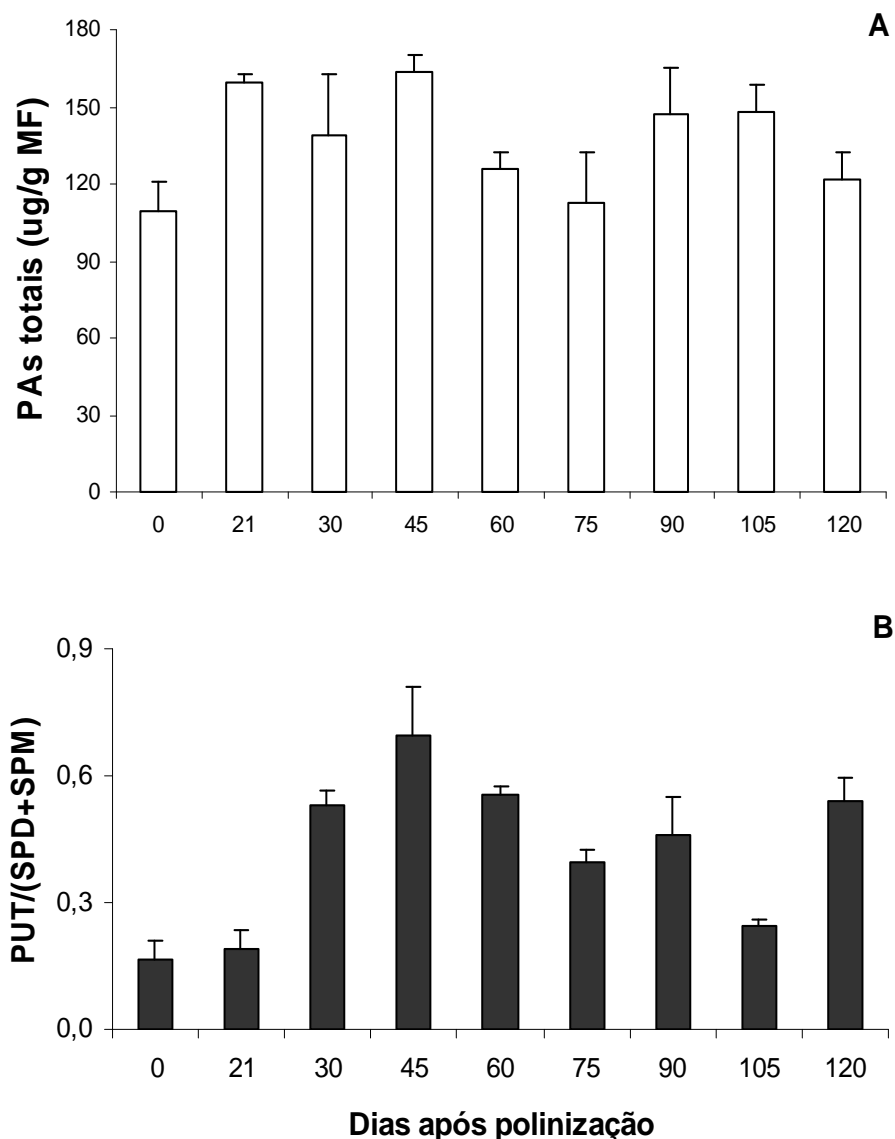


Figura 8. Concentração média de **A)** poliaminas totais ($\mu\text{g/g}$) de matéria fresca (MF) e **B)** Razão do PAs: Put $(\text{Spd}+\text{Spm})^{-1}$ durante o desenvolvimento e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, (média \pm desvio padrão, $n=3$).

21) (Figura 9B). Nos estádios subseqüentes, os teores de Put, Spd e Spm não apresentaram diferenças significativas entre os estádios globular, cordiforme e torpedo, sendo Spd a PA predominante. A partir dos 75 DAP equivalente ao estágio de embrião cotiledonar, os teores de PAs conjugadas foram menores (Figura 9B).

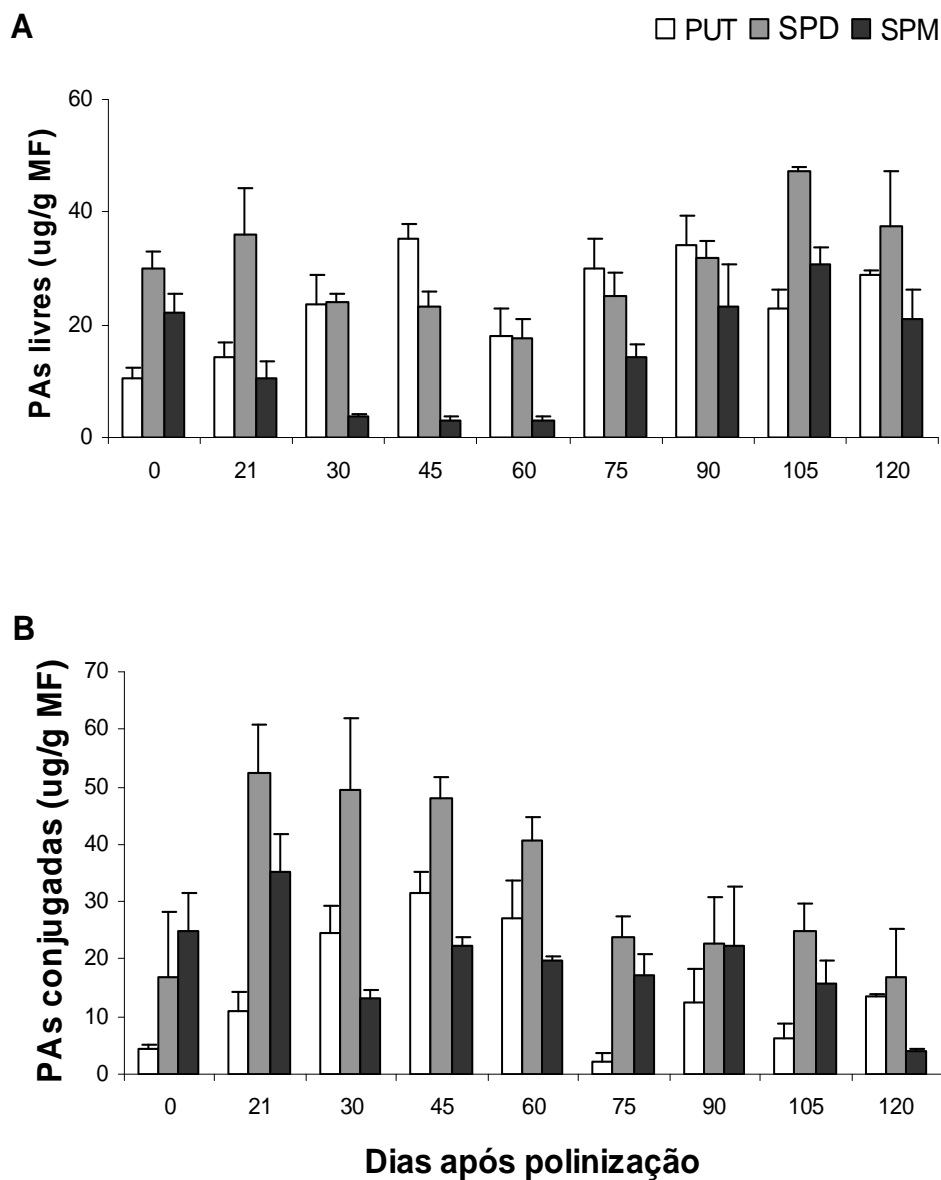


Figura 9. Concentração média de poliaminas: **A)** livres e **B)** conjugadas ($\mu\text{g/g}$) de Matéria fresca (MF) durante o desenvolvimento e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*, (média \pm desvio padrão, $n=3$).

E. AIA e ABA

A relação dos teores dos hormônios AIA e ABA foram inversamente proporcionais entre os estádios avaliados: do cordiforme ao cotiledonar (Figura 10). Durante o desenvolvimento da semente de *A. sellowiana* observaram-se os maiores teores AIA no estágio torpedo (60 DAP), seguido de um decréscimo contínuo até os estádios mais adiantados (Figura 10A).

Os teores mais elevados de ABA foram observados no estágio cotiledonar (90 DAP) (Figura 10B). Nos estádios anteriores os teores deste hormônio foram baixos e posteriormente a este estágio os teores foram decrescendo constantemente.

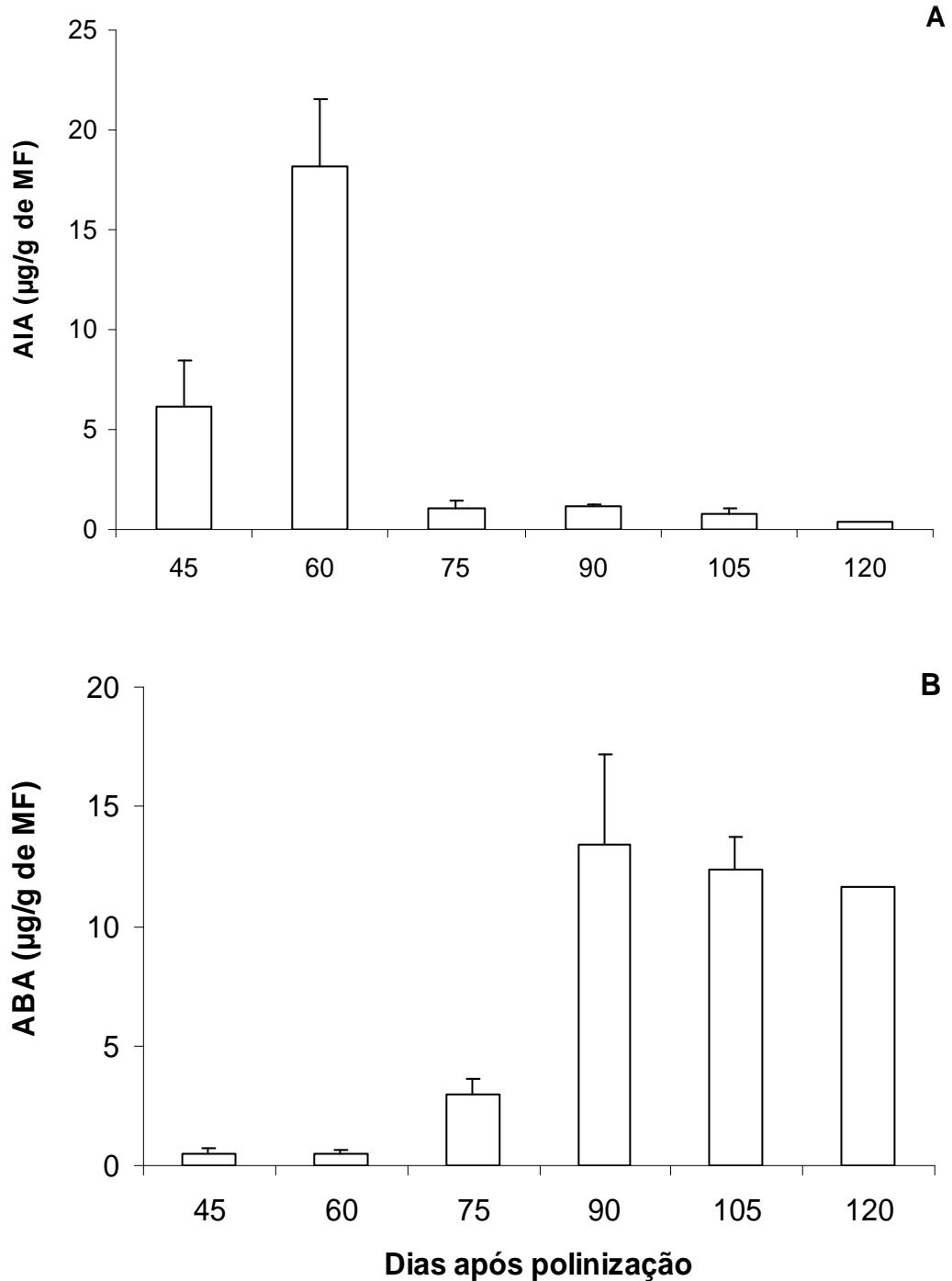
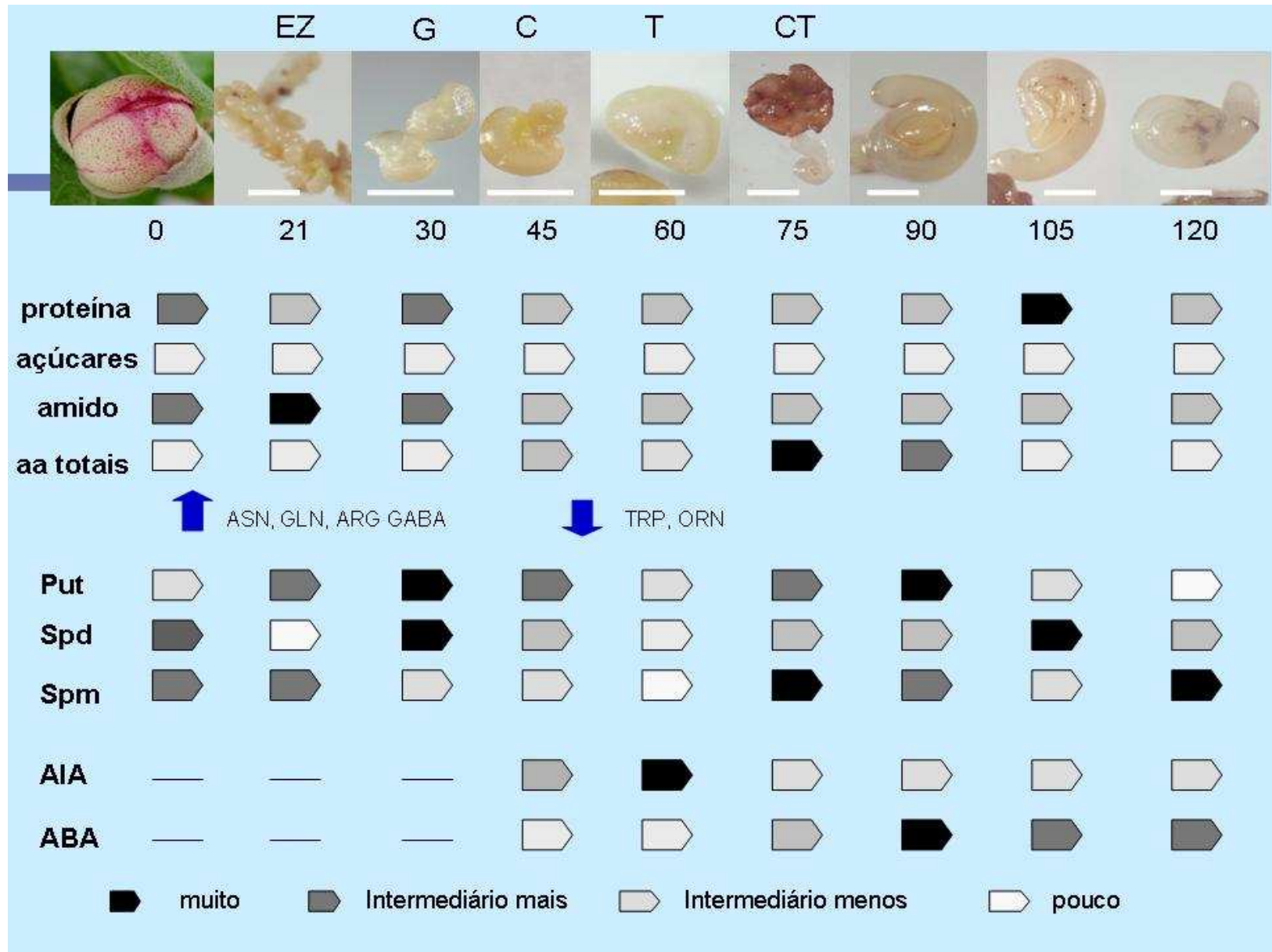


Figura 10. Concentração média de **A)** AIA e **B)** ABA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de matéria fresca (MF) durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *A. sellowiana*, (média \pm desvio padrão, n=3).

Figura 11: Resumo das mudanças bioquímicas da embriogênese zigótica de *A. sellowiana*.



DISCUSSÃO

A. Formação dos embriões zigóticos

No presente trabalho, nossas observações mostraram que os rudimentos seminais são do tipo anátropo, bitegmentados, com placentação axilar, com uma nucela de várias camadas de células com núcleos proeminentes, caracterizando um rudimento seminal crassinucelado. A ordem Myrtales, que inclui as Myrtaceae, se caracteriza por ter um óvulo crassinucelado, micrópila formada por dois tegumentos, tegumento externo e interno com duas camadas de células, células antipodais efêmeras ou ausentes e endosperma do tipo nuclear (TOBE E RAVEN, 1983),

No presente trabalho, o proembrião foi observado aos 21 dias após polinização (DAP), seguido da formação do embrião em estágio globular. De acordo com Dodeman *et al.* (1997), a estrutura do zigoto mostra-se bastante alterada quando comparada à da oosfera, principalmente em relação à organização do vacúolo, disposição do núcleo, quantidade de organelas e mudanças na parede celular. A polarização do zigoto acentua-se ao se aproximar a primeira divisão mitótica assimétrica. Em *Arabidopsis thaliana*, o embrião em fase globular é oriundo de uma seqüência de divisões de células. Estas divisões são bastante rápidas e o embrião logo adquire o formato de cordiforme (MANSFIELD E BRIARTY, 1991).

No presente trabalho, o embrião no estágio cordiforme foi observado aos 45 e posteriormente aos 60 DAP, o estágio torpedo. Segundo Goldberg *et al.* (1994), mudanças dramáticas ocorrem na passagem do estágio globular para o torpedo. Os cotilédones são mostrados em dois domínios laterais, bilobados no ápice do embrião, dando uma condição de simetria bilateral. A seqüência do desenvolvimento continua com o alongamento e a expansão celular, levando à fase de torpedo.

B. Proteínas, açúcares totais e amido

No presente trabalho, os teores de proteínas mantiveram-se constante durante a formação do embrião zigótico. Um incremento da concentração de proteína poderia ser resultado do acúmulo e síntese das proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), as quais são conhecidas por proteger a semente na fase de desidratação (WISE E TUNNACLIFFE, 2004).

O acúmulo de proteínas fornece aminoácidos livres que podem ser usados ao longo do desenvolvimento embrionário até a autotrofia da planta (PREWEIN *et al.*, 2006). Em geral, observa-se acúmulo no conteúdo de proteínas durante o

desenvolvimento do embrião (SALLANDROUZE *et al.*, 2002). Em *Ocotea catharinensis*, observou-se que o conteúdo de proteínas solúveis aumentou continuamente durante o desenvolvimento embrionário, atingindo valor máximo no estágio de embrião maduro (SANTA CATARINA *et al.*, 2006).

No presente trabalho, durante a formação do embrião zigótico os açúcares solúveis totais apresentaram valores crescentes ao longo do período avaliado e os teores de amido mantiveram-se quase constantes durante a formação do embrião zigótico. A deposição de substâncias de reserva é o processo chave para desenvolvimento da semente, uma vez que fornece os compostos que são usados desde os estádios iniciais do desenvolvimento até a autotrofia (MERKLE *et al.*, 1995). Os açúcares possuem papéis de reguladores centrais em muitos processos vitais da planta fotossintética. Diversos estudos utilizando plantas mutantes de *Arabidopsis* têm revelado o papel dos açúcares na regulação da expressão gênica, proliferação e morte celular, no crescimento da plântula, na expansão e senescência da folha e no desenvolvimento da semente (SMEEKENS, 2000; GIBSON, 2005; ROLLAND *et al.*, 2006).

No presente trabalho, a análise histoquímica em corte fresco do embrião zigótico maduro de *A. sellowiana*, após 120 DAP, revelou um baixo acúmulo de amido e a presença de muitos corpos protéicos e lipídeos nas células dos cotilédones (dados não mostrados). Análises anteriores foram coerentes com estes resultados (CANGAHUALA-INOCENTE, 2002). É comumente aceito que as principais substâncias de reserva armazenadas durante o desenvolvimento das sementes são proteínas, carboidratos e lipídios e a proporção dessa composição pode variar de espécie para espécie e até entre espécies de uma mesma família (BEWLEY e BLACK, 1994). Assim, cotilédones de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* apresentaram cerca de 50% de lipídios, 32% de carboidratos solúveis, 7,7% de amido e 6,8% de proteínas solúveis (CORTES *et al.*, 2006). Nos cotilédones de *Anthyrium andraeaman* foi observado que a substância de reserva predominante foi o amido, enquanto que as reservas no endosperma consistiram de amido e proteínas (MATSUMOTO *et al.*, 1998).

C. Aminoácidos

No presente trabalho, observou-se que durante o desenvolvimento embrionário de *A. sellowiana*, o conteúdo de aminoácidos totais analisados até os 30

dias mantiveram-se constantes, aumentando aos 45 dias, período na qual o embrião zigótico encontrava-se no estágio cordiforme. Isto, provavelmente deve-se à necessidade do acúmulo de aminoácidos para a síntese de proteínas específicas, já que neste estágio, o embrião começa a definir sua simetria passando de radial a bilateral pela formação dos cotilédones.

Os aminoácidos são importantes no metabolismo do nitrogênio, representando o produto inicial da assimilação primária deste composto (ORTIZ-LOPEZ *et al.*, 2000). Além da síntese de proteínas, os aminoácidos estão relacionados com o metabolismo primário e secundário nos vegetais, controlando direta e/ou indiretamente vários aspectos ligados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (CORRUZI e LAST, 2000).

No presente trabalho, o conteúdo de aminoácidos totais aos 60 dias decresceu significativamente, sugerindo que estes aminoácidos sintetizados anteriormente estariam sendo utilizados durante a diferenciação e crescimento do embrião neste período. Um acréscimo acentuado no conteúdo de aminoácidos foi observado aos 75 DAP, período no qual o embrião zigótico encontrava-se no estágio cotiledonar. Estes resultados são distintos daqueles observados por Pescador (2004) para esta mesma espécie, cuja autora observou que à medida que o embrião zigótico se desenvolvia, o conteúdo de aminoácidos totais decresceu, sendo o valor do embrião globular quatro vezes maior ao observado no estágio cotiledonar.

Por outro lado, os resultados do presente trabalho corroboram os resultados obtidos em estudos de desenvolvimento embrionário de outras espécies tais como *A. angustifolia* (ASTARITA *et al.*, 2003a), *Pinus taeda* (SILVEIRA *et al.*, 2004) e *O. catharinensis* (SANTA CATARINA *et al.*, 2006). Estes autores também observaram que os embriões no estágio cotiledonar apresentaram os maiores teores de aminoácidos livres.

No presente trabalho, foi observado um decréscimo progressivo nos teores de aminoácidos entre os 90 e 105 DAP. Esse decréscimo do conteúdo de aminoácidos totais deve-se provavelmente a síntese de diversas proteínas, especialmente aquelas de reserva, visto que nesta fase o embrião está preparando-se para a etapa de desidratação, dormência e germinação. Weber *et al.* (1997), ao verificarem a absorção de assimilados em sementes de legumes, propuseram que o transporte de aminoácido para os cotilédones pode ser passivo durante o desenvolvimento inicial, enquanto um sistema adicional de absorção ativa pode ser estabelecido nos

estádios finais, quando grandes quantidades de proteínas são armazenadas para assegurar o desenvolvimento da plântula. Em *O. catharinensis* também foi observado este decréscimo dos teores de aminoácidos totais no embrião maduro (SANTA CATARINA *et al.*, 2006).

No presente trabalho, o Asn foi o aminoácido predominante durante o desenvolvimento dos embriões zigóticos, sugerindo a sua importância para o armazenamento nos tecidos de reserva do embrião. Este resultado corrobora os resultados obtidos por Feirer (1995) e Santa Catarina *et al.* (2006). Esses autores relataram que a Asn foi um dos aminoácidos predominantes durante o desenvolvimento de sementes de *P. strobus* e *O. catharinensis*, respectivamente. O aminoácido Asn é considerado o principal composto para transporte e armazenamento de N nas plantas superiores devido a sua alta solubilidade (LAM *et al.*, 1995). Por outro lado, os resultados do presente trabalho foram distintos daqueles reportados por Pescador (2004) para esta mesma espécie, onde a Asn decresceu conforme o desenvolvimento do embrião zigótico. Devendo-se provavelmente a característica desta espécie de ser genótipo-dependente para o processo de embriogênese somática, característica mantida na embriogênese zigótica.

No presente trabalho, os aminoácidos Gln, Asp, Gaba e Ala, ocorreram em concentrações menores que a Asn, sendo que os maiores valores foram obtidos durante o desenvolvimento completo dos cotilédones. Estes resultados são novamente distintos daqueles reportados por Pescador (2004), onde o conteúdo desses mesmos aminoácidos, com exceção da Ala (não analisado), foram mais elevados no embrião globular (30 DAP), decrescendo progressivamente nos demais estádios.

A glutamina e o ácido glutâmico são considerados os precursores dos demais aminoácidos (GEORGE, 1993; RADWANSKI e LAST, 1995). Em adição, a Gln é um importante aminoácido utilizado para a indução do processo de embriogênese somática para várias espécies (VIANA E MANTELL, 1999; DAL VESCO e GUERRA, 2001), promovendo o desenvolvimento dos embriões somáticos.

Contrariamente aos demais, o Gaba é um aminoácido não protéico, formado a partir da descarboxilação do Glu (SATYA-NARAYAN e NAIR, 1990) sendo acumulado nas plantas sob condições de estresse como choque de frio ou calor, hipoxia, acidificação citosólica, escuro, estresse hídrico por excesso ou falta de água

e em resposta à fitorreguladores, no caso, o 2,4-D (SNEDDEN e FROMM, 1998). Neste trabalho, observou-se que o Gaba foi o quarto maior aminoácido sintetizado especialmente no estágio maduro de embrião zigótico (75 e 90 DAP), decrescendo posteriormente. A presença destes aminoácidos em maior proporção poderia indicar que eles desempenham um papel importante na fase de diferenciação e maturação do embrião zigótico de *A. sellowiana*. Kamada e Harada (1984) mostraram que houve um acúmulo de aminoácidos totais, especialmente de Gaba, durante a proliferação celular e formação de embriões somáticos de cenoura.

No presente trabalho, uma observação relevante foi o fato de que quase todos os aminoácidos apresentaram seus maiores teores no estágio maduro do embrião zigótico, decrescendo após os 90 DAP, período na qual o acúmulo de proteínas de reserva é detectado nos tecidos de reserva. Como afirmado por Lea *et al.* (1989), os aminoácidos são compostos doadores de N para a biossíntese de grande número de substâncias, entre elas as proteínas de reserva. O Glu e Tir foram os únicos aminoácidos que ocorreram em concentrações maiores no estágio cordiforme do embrião zigótico, sugerindo que os mesmos seriam importantes na fase inicial do processo embriogênico e poderiam ser utilizados como marcadores bioquímicos deste estágio de desenvolvimento.

D. Poliaminas (PAs)

O incremento da biossíntese de poliaminas em plantas tem sido correlacionado com o aumento da divisão celular (GALSTON e FLORES, 1991). No presente trabalho, o conteúdo de PAs totais variou significativamente durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *A. sellowiana*. Applewhite *et al.* (2000) mencionam que concentrações endógenas das poliaminas são altas nas flores de *Arabidopsis*.

No presente trabalho, as variações dos teores de PAs totais durante a formação e desenvolvimento do embrião zigótico não foram muito significativas podendo ser consideradas constantes. Contudo, análises posteriores mostraram variações durante este processo associado às classes de PAs: livres e conjugadas assim como na categoria: Put, Spm e Spd. Esta variação foi distinta daquela observada em *P. taeda*, onde o menor conteúdo de PAs totais foi observado no estágio globular, aumentando até o estágio cotiledonar com posterior redução na semente madura (SILVEIRA *et al.*, 2004), bem como em *P. radiata* onde os teores

de PAs aumentaram durante o desenvolvimento da semente, atingindo valor máximo no estágio cotiledonar (MINOCHA *et al.*, 1999). Entretanto, em *A. angustifolia* altos teores de Put e Spd foram observados em embriões pré-cotiledonares, com posterior redução após a formação dos cotilédones (ASTARITA *et al.*, 2003b). Em *O. catharinensis*, observou-se um decréscimo nos teores de PAs totais entre os estádios cordiforme inicial até o estágio cotiledonar, bem como um aumento no conteúdo de PAs totais quando o embrião encontrava-se com os cotilédones completamente desenvolvidos, seguido de decréscimo no embrião maduro (SANTA CATARINA *et al.*, 2006).

No presente trabalho, a relação de PAs $[\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}]$ foi baixa tanto no tempo 0 quanto aos 21 DAP, correspondente a fertilização do gametófito feminino e formação do embrião zigótico. Geoffriau *et al.* (2006) mostraram que as poliaminas estão envolvidas no processo de ginogênese de *Allium cepa*, onde a relação de Put/Spd-Spm foi baixa durante o florescimento, sendo considerada como um marcador inicial da competência para a ginogênese *in vitro*. Já, a relação de PAs $[\text{Put} \cdot (\text{Spd} + \text{Spm})^{-1}]$ foi alta durante o desenvolvimento do embrião zigótico (30, 45 e 60 DAP), correspondentes, respectivamente aos estádios globular, cordiforme e torpedo do embrião zigótico, sendo os maiores valores detectados no estágio cordiforme e decrescendo no estágio cotiledonar. Estes resultados estão de acordo com o observado em *A. angustifolia* (ASTARITA *et al.*, 2003b), *P. taeda* (SILVEIRA *et al.*, 2004) e *O. catharinensis* (SANTA CATARINA *et al.*, 2006), onde a relação de PAs foi alta nos primeiros estádios de desenvolvimento dos embriões zigóticos decrescendo ao final. Assim, essa relação das PAs poderia ser considerada como um marcador do desenvolvimento dos embriões somáticos em *A. sellowiana*.

No presente trabalho, no tempo zero, equivalente ao gametófito antes da polinização, a poliamina livre Spd apresentou os teores maiores em relação às demais. No momento da fertilização e formação do embrião zigótico (DAP 21), correspondente a uma fase de peças florais em senescência, os teores de PAs livres foram altos para Spd, similar à etapa anterior. Em várias espécies, altas concentrações de Spd endógena são associadas com a indução e desenvolvimento floral (ARIBAUD e MARTIN-TANGUY, 1994). Assim, em *Brassica rapa*, a Spd foi a mais abundante PA livre, seguido por Put e Spm (PUGA-HERMIDA *et al.*, 2003). Esses autores também mencionaram que o conteúdo de PAs livres não sofreram

alterações quando a flor esteve fechada, mudando o perfil depois da síntese de carotenóides nas pétalas.

No presente trabalho, os estádios subseqüentes apresentaram padrão de variação semelhante entre as PAs livres, predominando a Put em todos os estádios. Esta predominância poderia ser atribuída à transformação da Put em Spd e Spm devido às atividades das sintetases de Spd e Spm, como sugerido por Puga-Hermida *et al.* (2003). Aos 60 DAP, a relação foi a mesma, mas os teores foram menores, variando para Spd aos 105 e 120 DAP. Os resultados obtidos sugerem que a Put exerce papel importante nos estádios iniciais da embriogênese zigótica em *A. sellowiana*, enquanto que a Spm exerceria seus efeitos no final do desenvolvimento embrionário.

É relevante salientar que os aminoácidos Arg e Orn são precursores diretos, enquanto a Met é um precursor indireto da rota de biossíntese de PAs em plantas (ANTOGNONI *et al.*, 1998; BOUCHEREAU *et al.*, 1999). No presente trabalho, os perfis de PAs conjugadas foram similares aos observados para a PAs livres. No entanto, a diferença com as PAs livres, a Spm conjugada apresentou a concentração mais elevada no tempo 0, equivalente à fase de fertilização. Por outro lado, durante todo o desenvolvimento do embrião zigótico, a Spd apresentou os mais altos teores em comparação com as outras poliaminas, sugerindo que essa PA exerce papel importante durante o desenvolvimento embrionário de *A. sellowiana*.

As PAs conjugadas, que são PAs livres ligadas covalentemente a ácidos hidrocínâmicos, são usualmente produzidas em resposta a condições de estresse (BOUCHEREAU *et al.*, 1999). A função metabólica das PAs conjugadas ainda não está totalmente elucidada. Bais e Havishankar (2002) sugeriram que o conteúdo de PAs livres em plantas pode ser regulado pela formação reversível de PAs conjugadas. Sugere-se também que a conjugação de PAs com ácido cinâmico e compostos fenólicos pode ser uma forma de regulação do “pool” de PAs livres na célula vegetal (MADER e HANKE, 1997).

E. AIA e ABA

No presente trabalho a relação dos teores dos hormônios AIA e ABA foi inversamente proporcional entre os estádios avaliados: do cordiforme ao cotiledonar. Essa mudança nas concentrações deste hormônio poderia estar relacionada com o estabelecimento da simetria bilateral e da polaridade do embrião (MICHALCZUK *et*

al., 1992). De todas as maneiras, o padrão de variação nos teores de AIA observado neste trabalho segue um padrão característico das sementes em desenvolvimento, quando o valor máximo de concentração deste hormônio ocorre durante a fase de crescimento embrionário, seguido de uma redução destes teores na semente madura (BEWLEY e BLACK, 1994).

Postula-se que a auxina ácido indolil-3-acético (AIA) atua de forma proeminente na embriogênese zigótica (RIBNICKY *et al.*, 2002). O AIA é a principal auxina natural e, no entanto, pouco se conhece sobre os seus teores nos tecidos vegetais (BANDURSKI *et al.*, 1995). As auxinas exercem funções nos processos de alongamento celular, início da divisão celular, definição de órgãos e promoção da diferenciação do sistema vascular (GASPAR *et al.*, 1996). Muitos dos seus efeitos são dependentes do transporte nos órgãos e tecidos (FISCHER-IGLESIAS *et al.*, 2001).

Em sementes de *O. catharinensis* observou-se o mesmo padrão de comportamento relacionado com os teores de AIA (SANTA CATARINA *et al.*, 2006). Também, em sementes de *A. angustifolia* os maiores conteúdos de AIA livre ocorreram nos tecidos do eixo embrionário e nas fases iniciais do desenvolvimento (ASTARITA *et al.*, 2003c). Em *P. glauca* e *P. taeda* os altos teores de AIA observados durante o desenvolvimento inicial da semente foram relacionados com o crescimento do embrião zigótico (KONG *et al.*, 1997; SILVEIRA *et al.*, 2004). Em sementes ortodoxas, como é o caso de *A. sellowiana*, a redução nos teores hormonais na semente madura é um fenômeno comum causado pelo alto grau de desidratação da semente. Os hormônios podem ser armazenados em sua forma conjugada para posterior liberação durante da germinação (KONG *et al.*, 1997).

O aminoácido triptofano é considerado o principal precursor da biossíntese de AIA (BANDURSKI *et al.*, 1995). A biossíntese de Trp é importante para o estabelecimento da polaridade do embrião nas fases iniciais do desenvolvimento (ASTARITA *et al.*, 2003c). Em *A. sellowiana*, um decréscimo no conteúdo de Trp no embrião zigótico estágio torpedo (60 DAP) foi observado (Figura 7), coincidindo com o maior nível de AIA, sugerindo que o Trp sintetizado estava sendo utilizado na biossíntese do AIA.

Outro fitorregulador importante que afeta o desenvolvimento embrionário é o ABA. Kermode (1995) postulou que a germinação precoce é prevenida pelo ABA. Também, o ABA promove a acumulação de substâncias de reserva (CAILLOUX *et al.*,

1996), a maturação (BLACK, 1991), e reduz a freqüência de mal formações (ETIENNE *et al.*, 1993). No presente trabalho, os teores mais elevados de ABA foram observados no estádio cotiledonar. Nos estádios anteriores, os teores deste hormônio foram baixos e, posteriormente a este estádio, os teores foram decrescendo constantemente. Os padrões observados são comuns na maioria das angiospermas, as quais exibem um aumento no conteúdo de ABA durante o desenvolvimento da semente, declinando na semente madura (BEWLEY e BLACK, 1994).

Rock e Quatrano (1995) mostraram que no final da embriogênese de cevada ocorreu redução nos teores de AIA paralelamente ao aumento no conteúdo de ABA, bem como acúmulo de substâncias de reserva, caracterizando a fase de maturação do embrião. No presente trabalho observou-se resultado semelhante, sugerindo que esta relação esteja também ocorrendo na embriogênese zigótica de *A. sellowiana*.

Conclusões

No presente trabalho foi obtida informação relevante sobre as mudanças bioquímicas ocorridas durante a formação e o desenvolvimento do embrião zigótico de *A. sellowiana*. Estas informações conduzem a um melhor entendimento das alterações bioquímicas e fisiológicas relacionadas com a síntese e acumulação de aminoácidos, poliaminas, AIA e ABA. Além de fornecer informações básicas sobre as variações bioquímicas e hormonais da embriogênese zigótica, os resultados obtidos podem servir como referência para futuras estratégias relacionadas com a modulação do processo de embriogênese somática em *A. sellowiana*.

Capítulo 2: Variações bioquímicas da embriogênese somática e dos estádios de desenvolvimento do embrião somático de *Acca sellowiana*

INTRODUÇÃO

Existem evidências que a acumulação de proteínas, características de embriões zigóticos é recapitulada na embriogênese somática. Nos embriões somáticos o acúmulo de proteínas totais poderia estar relacionado aos processos de desenvolvimento e maturação. Proteínas poderiam estar também envolvidas na regulação da expansão celular e no estabelecimento de características biofísicas requeridas para a morfogênese (JIMÉNEZ, 2001).

Poucos estudos têm abordado a associação entre o amido e o desenvolvimento de embriões somáticos (MERKLE *et al.*, 1995). Alguns destes estudos evidenciaram aumento no conteúdo de amido durante a maturação de embriões somáticos em concentrações superiores àquelas normalmente encontradas nos embriões, sugerindo que os embriões somáticos são metabolicamente distintos dos embriões zigóticos e incapazes de converter eficientemente carboidratos em lipídios e proteínas de reserva (MERKLE *et al.*, 1995).

Os perfis de poliaminas (PAs) podem ser utilizados como marcadores das alterações metabólicas ocorridas durante a maturação das culturas embriogênicas. 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).

O objetivo do presente trabalho foi quantificar os teores de proteínas, açúcares totais, amido, aminoácidos, poliaminas e os hormônios endógenos, AIA e ABA, durante as fases iniciais da embriogênese somática e ao longo do desenvolvimento dos embriões somáticos da goiabeira serrana (*A. sellowiana*).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Utilizou-se como explantes embriões de sementes maduras os quais, depois de isolados, com o auxílio de um estereomicroscópio, foram inoculados em tubos de ensaio (22 x 150mm) contendo 10 mL de meio de cultura LPm, suplementado com vitaminas de Morel, 3% maltose, 20 μ M 2,4-D e 8 mM ácido Glu. O pH foi ajustado para 5,8 e geleificado com ágar (0,7%) (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007). As culturas foram incubadas no escuro a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para a determinação dos parâmetros bioquímicos utilizaram-se amostras representativas dos estádios iniciais das culturas embriogênicas, coletadas a cada três dias até o 30º dia de incubação. No 70º dia de incubação, período no qual se formou o maior número de embriões foi feito à coleta de embriões nos diferentes estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar). Todo o material coletado foi estocado a -20°C .

Análise bioquímica

Para as análises de proteínas, amido e açúcares totais utilizaram-se amostras de 300 mg de massa fresca em triplicata. Para as análises de aminoácidos e poliaminas foram utilizadas amostras de 200 mg de MF, também em triplicata. Para as análises de AIA e ABA foram utilizadas amostras de 1000 mg de MF e só foi realizado nos estádios torpedo e cotiledonar do embrião somático.

A. Extração e determinação do conteúdo de proteínas totais.

As proteínas totais foram extraídas segundo a metodologia descrita no capítulo 3.1. O conteúdo das proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) e com a utilização de albumina de soro bovino como padrão, de acordo com a metodologia detalhada na Seção III, Capítulo 1.

B. Determinação dos teores de açúcares totais

A extração dos açúcares solúveis totais foi realizada segundo a metodologia de Shannon (1968) descrita na Seção III, Capítulo 1. A dosagem foi realizada pelo método de Umbreit e Burris (1960), também detalhada na Seção III, Capítulo 1.

C. Extração e determinação do conteúdo de amido

A extração e a determinação do conteúdo de amido total foram realizadas através do método de McCready *et al.* (1950), detalhada na Seção III, Capítulo 1.

D. Extração e determinação de aminoácidos

A determinação dos aminoácidos livres: Arginina (Arg), Alanina (Ala), Ácido aspártico (Asp), Ácido glutâmico (Glu), Asparagina (Asn), Serina (Ser), Glutamina (Gln), Histidina (His), Acido γ -aminobutírico (Gaba), Glicina (Gly), Treonina (Ter), Tirosina (Tir), Metionina (Met), Triptofano (Trp), Valina (Val), Fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Lisina (Lis) e Ornitina (Orn) baseou-se na metodologia descrita por Astarita *et al.* (2003a), detalhada na Seção III, Capítulo 1.

E. Determinação de Poliaminas, AIA e ABA

A determinação de PAs: Putrecina (Put), Espermidina (Spd) e Espermina (Spm) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Silveira *et al.* (2004), detalhada na Seção II, Capítulo 2.

A determinação do ácido indol-acético (AIA) e do ácido absícico (ABA) baseou-se na metodologia descrita por Silveira *et al.* (2004), detalhada na Seção III, Capítulo 1.

Análise estatística

Os dados de cada tratamento foram analisados com intervalo de confiança para verificar precisão dos procedimentos adotados durante a condução do experimento e apresentados a partir da média e seu respectivo desvio padrão (SOKAL E ROHLF, 1995).

RESULTADOS

A. Durante a indução da embriogênese somática

A.1 Proteínas, açúcares e amido

Durante os primeiros 30 dias de indução da embriogênese somática, as concentrações de proteínas totais decresceram em relação ao inóculo inicial (0,84 mg/g de MF) (Figura 1). Por outro lado, os teores de amido mantiveram-se constantes durante os primeiro 30 dias em cultura, mas em relação ao inoculo inicial, estes valores decresceram significativamente (de 17.14 mg.g⁻¹ a 1.27 mg.g⁻¹) aos 27 dias em cultura (Figura 1). Já, os teores de açúcares totais até 30 primeiros dias em cultura mantiveram-se relativamente constantes. Aos 30 dias, os teores de açúcares foram aproximadamente o dobro do valor observado no inóculo inicial (Figura 1).

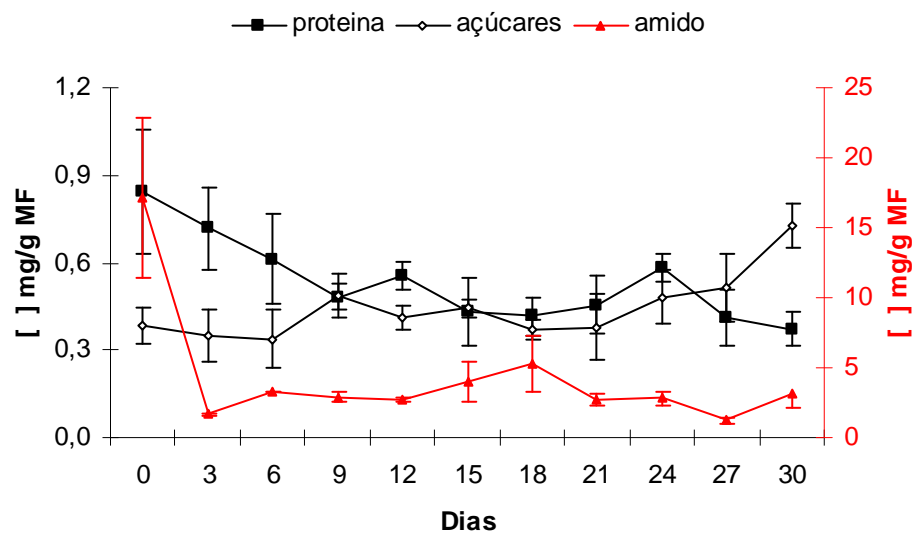


Figura 1. Proteínas totais, amido e açúcares totais durante a indução da embriogênese somática *A. sellowiana* ao longo dos primeiros 30 dias em cultura (média \pm desvio padrão, n=3).

A.2 Aminoácidos

No momento da indução, o conteúdo de aminoácidos livres totais foi baixo, atingindo seu nível máximo aos seis dias em cultura (Figura 2), período na qual os cotilédones do embrião zigótico empregado como explante começaram a se expandir (dados não mostrados).

Teores altos de aminoácidos totais foram observados também aos quinze dias em cultura (Figura 2), período na quais os cotilédones estavam verdes. Posteriormente a este período, os teores de aminoácidos decresceram até os 24 dias, mantendo-se constante até os 30 dias em cultura (Figura 2).

Durante a indução a embriogênese somática, os aminoácidos Gln, Arg, Asn e Gaba apresentaram os maiores teores. Teores intermediários foram observados para Glu, His, Asp, Ala, Ser, Gly, Leu, Lis, Val, Ter, Phe e Ile; e valores baixos foram observados para Trp, Met, Tir e Orn (Figuras 3 e 4).

A.3 Poliaminas

Os teores de PAs totais, durante a indução da embriogênese somática aumentaram no início da cultura atingindo valores máximos aos 9 dias em cultura, e a partir daí, os valores decresceram (Figura 5A).

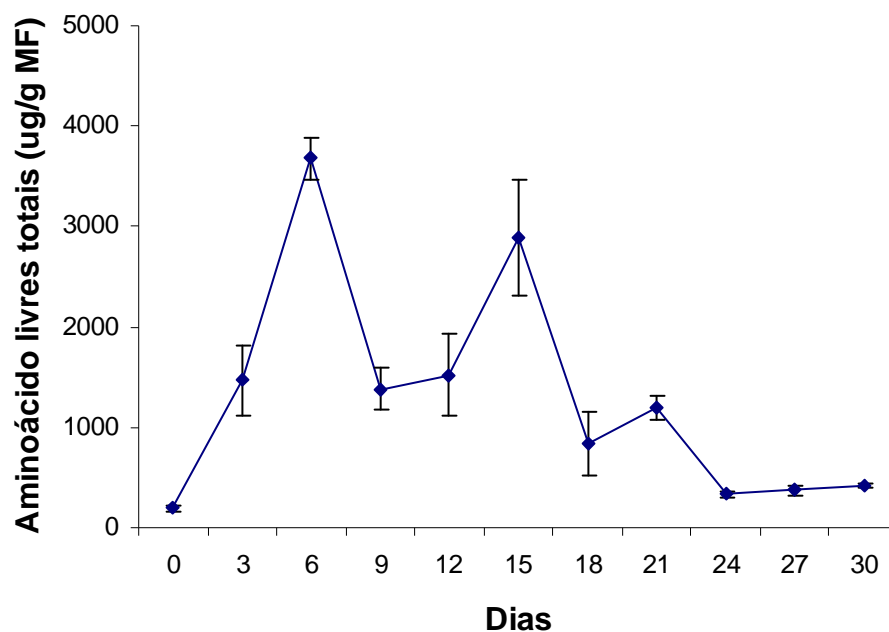


Figura 2. Aminoácidos livres totais durante a indução da embriogênese somática de *A. sellowiana* ao longo dos primeiros 30 dias em cultura (média \pm desvio padrão, n=3).

De maneira similar ao observado com as PAs totais, a relação Put/(Spd+Spm) durante a indução a embriogênese somática foi mais baixa no momento da indução, aumentando até os 9 dias de indução com diminuição posterior constante dos teores até os 30 dias (Figura 5B).

Durante a indução da embriogênese somática as culturas iniciais apresentaram teores intermediários de Put, maiores de Spd e menores de Spm dentro das poliaminas livres. Aos 3 dias em cultura, esta relação foi totalmente invertida, observando-se teores maiores de Put, intermediários de Spd e menores de Spm, onde esta relação foi mantida até o término da avaliação (Figura 6A).

As culturas iniciais não revelaram a presença de PAs conjugadas em teores detectáveis até o terceiro dia em cultura. A partir daí foram registrados teores intermediários de Put, altos de Spd e baixos de Spm. (Figura 6B). Entre 6^o e 15^o dia em cultura novamente não foram registrados valores detectáveis de PAs conjugadas. Já, a partir de 18^o dia somente foi registrada a presença da Put. Nos períodos posteriores observaram-se teores elevados de Put, baixos de Spd e ausência de Spm no grupo das PAs conjugadas. Na última avaliação, aos 30 dias em cultura somente foi registrada a presença da Put (Figura 6B).

Figura 3. Aminoácidos livres durante a indução da embriogênese somática de *A. sellowiana* ao longo dos primeiros 30 dias em cultura. **A.** Gln; **B.** Arg; **C.** Asn; **D.** Gaba; **E.** Glu; **F.** His; **G.** Asp; **H.** Ala; **I.** Ser; **J.** Gly. (média \pm desvio padrão, n=3).

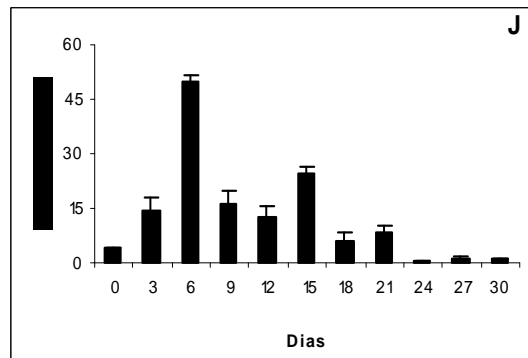
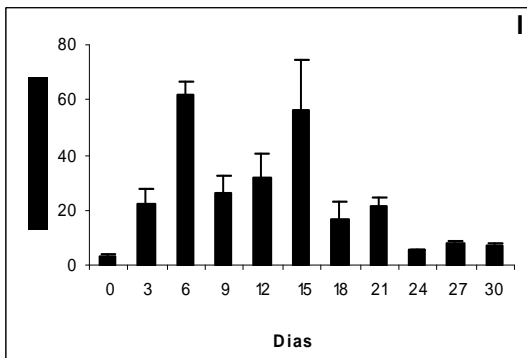
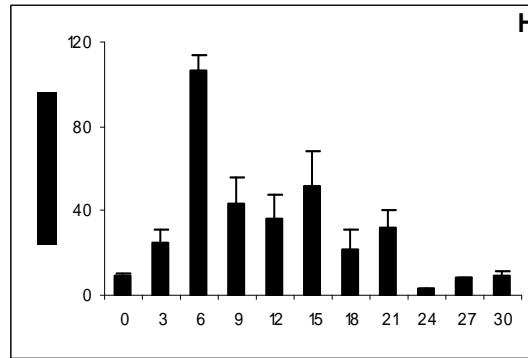
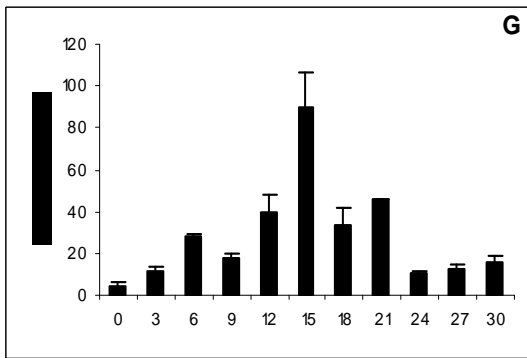
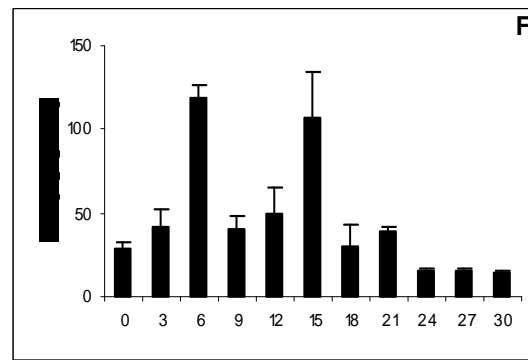
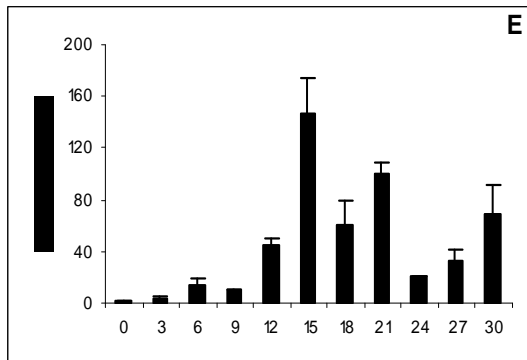
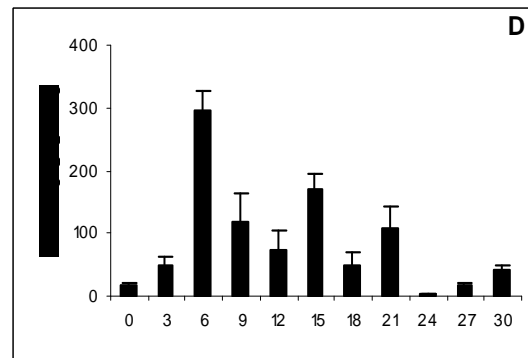
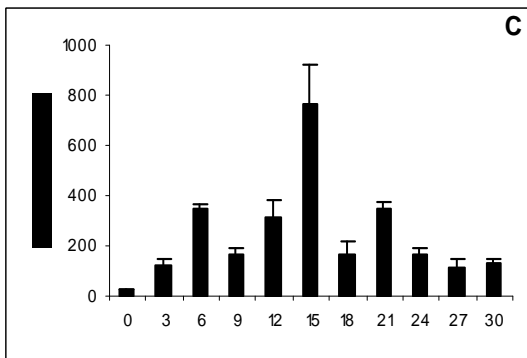
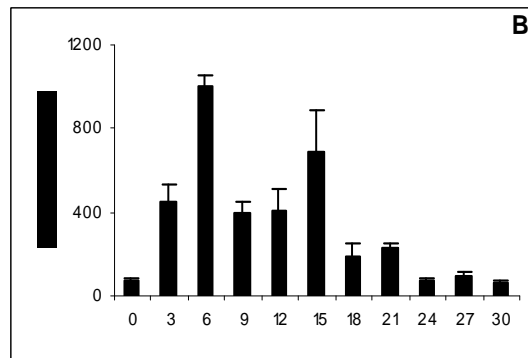
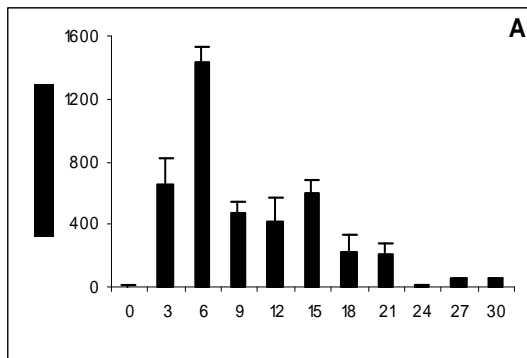
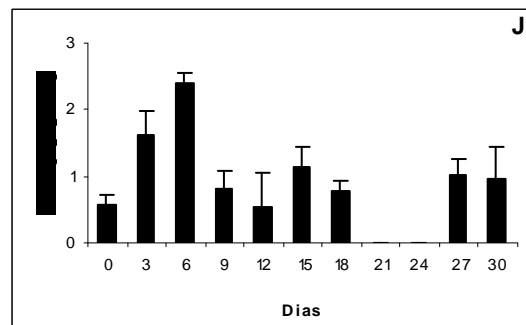
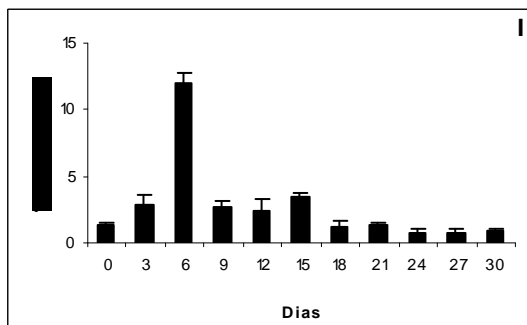
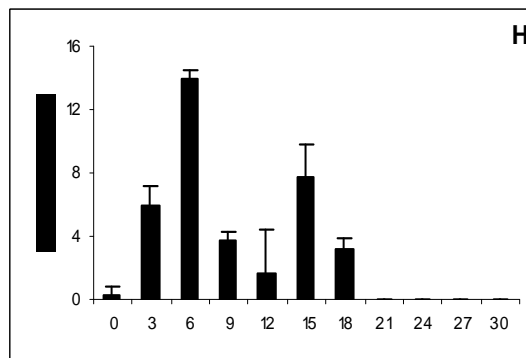
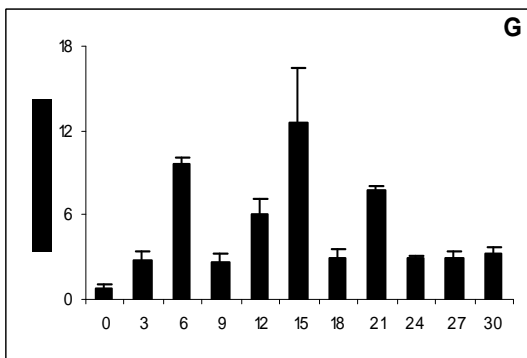
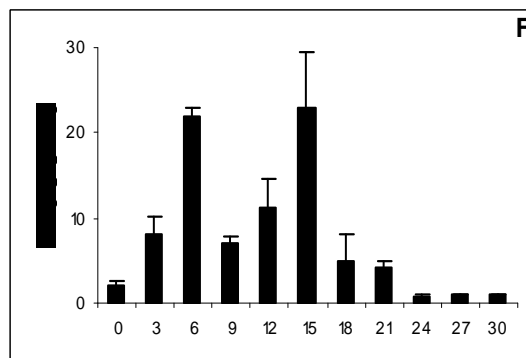
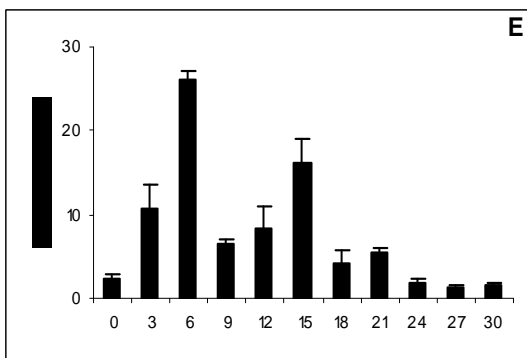
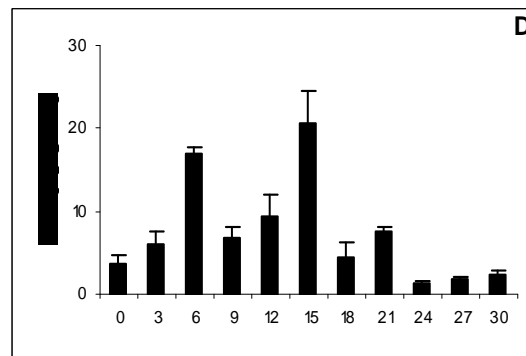
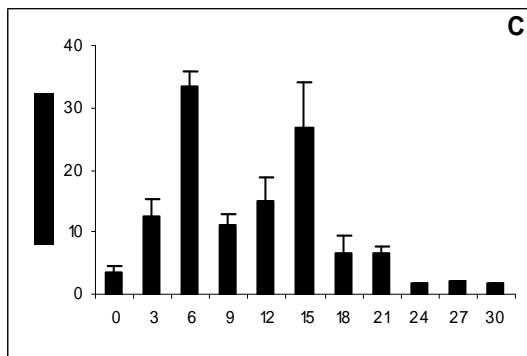
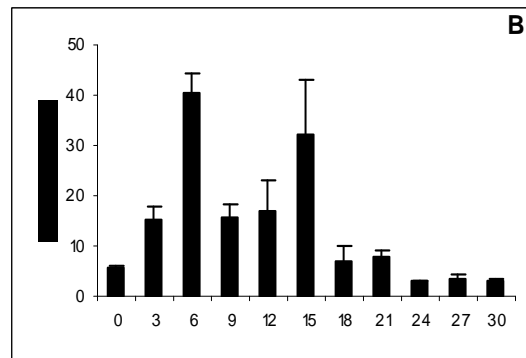
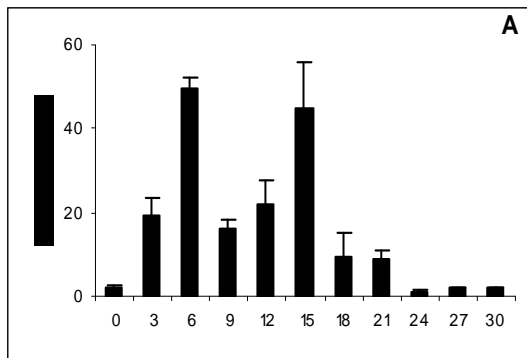


Figura 4. Aminoácidos livres durante a indução da embriogênese somática de *A. sellowiana* ao longo dos primeiros 30 dias em cultura. **A.** Leu; **B.** Lis; **C.** Val; **D.** Tre; **E.** Phe; **F.** Ile; **G.** Trp; **H.** Met; **I.** Tir; **J.** Orn. (média \pm desvio padrão, n=3)



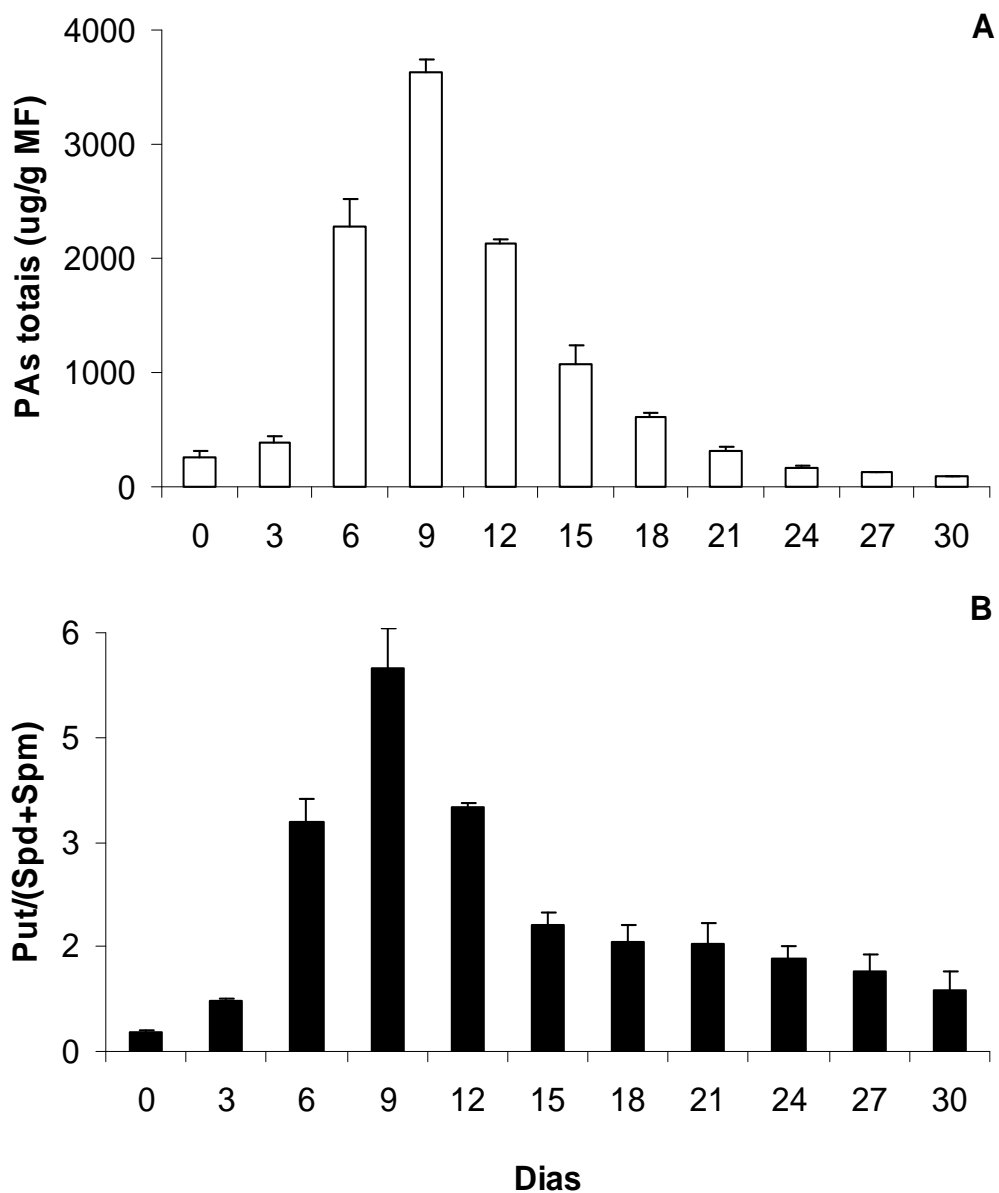


Figura 5. Concentração média de: **A)** poliaminas totais ($\mu\text{g/g}$) de matéria fresca (MF) e **B)** Razão do PAs: Put (Spd+Spm)⁻¹ durante a indução da embriogênese somática de *A. sellowiana*, ao longo de 30 dias em cultura (média \pm desvio padrão, n=3).

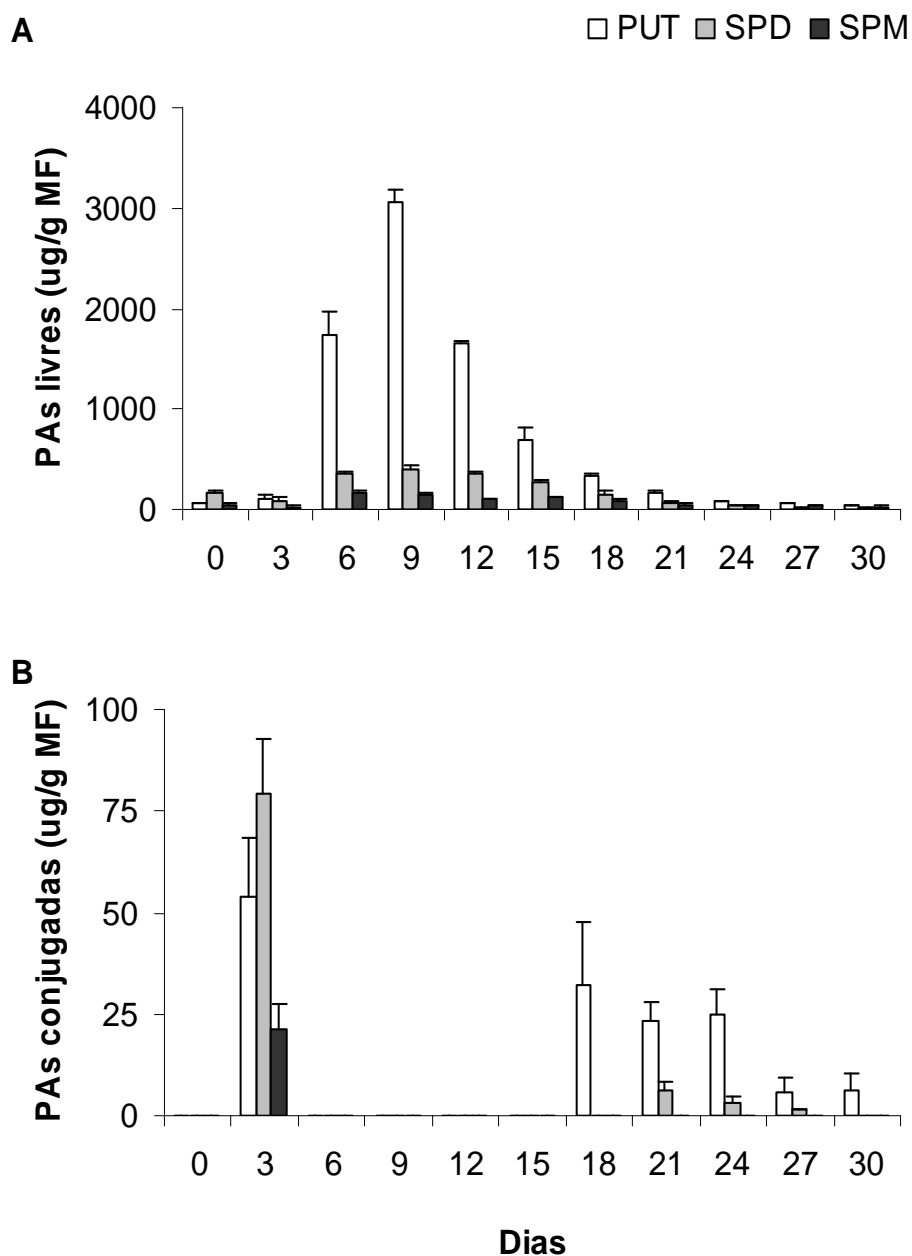


Figura 6. Concentração média de poliaminas: **A)** livres e **B)** conjugadas ($\mu\text{g/g}$) de MF durante a indução a embriogênese somática de *A. sellowiana*, ao longo de 30 dias em cultura (média \pm desvio padrão, $n=3$).

B. Durante os estádios de desenvolvimento do embrião somático

B.1 Proteínas, açúcares e amido

No estágio cordiforme, os embriões apresentaram baixos teores de proteínas totais (Figura 7), com posterior acréscimo constante nos estádios mais avançados. Assim, embriões somáticos no estágio cotiledonar alcançaram $0,7 \text{ mg.g}^{-1}$ MF, valor que foi inferior àquele observado no embrião zigótico ($0,8 \text{ mg.g}^{-1}$).

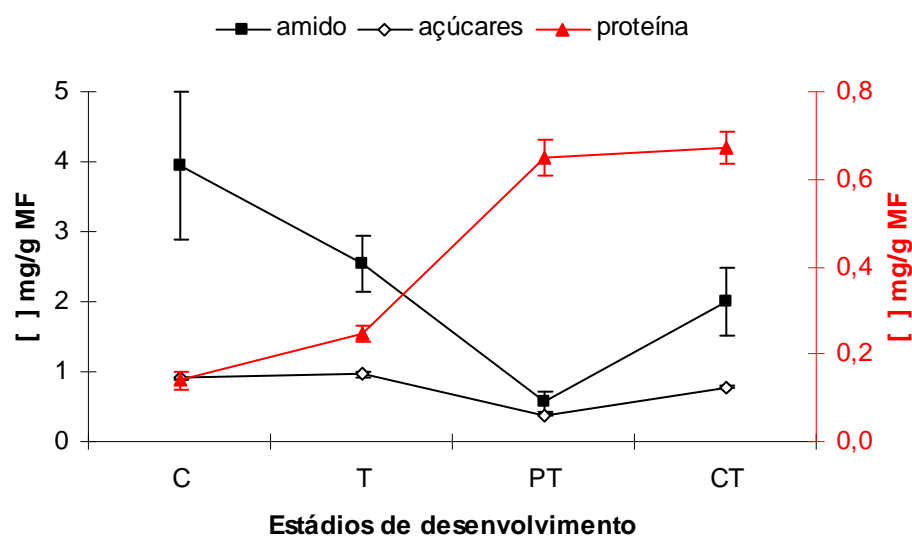


Figura 7. Proteínas totais, amido e açúcares totais (mg/g) de Matéria fresca (MF) nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*; C: cordiforme, T: torpedo, PT: pré-cotiledonar e CT: cotiledonar (média \pm desvio padrão, n=3).

Os teores de açúcares solúveis totais diferiram entre si nos diferentes estádios dos embriões somáticos, com valores similares nos estádios cordiforme e torpedo ($1,0 \text{ mg.g}^{-1}$ de MF), seguido de um decréscimo no estágio pré-cotiledonar (Figura 7).

De igual forma, os teores de amido nos diferentes estádios dos embriões somáticos diferiram significativamente. Os maiores teores foram encontrados no estágio cordiforme ($4,0 \text{ mg.g}^{-1}$), diferindo significativamente dos estádios torpedo e cotiledonar. Contudo, os embriões somáticos em estágio pré-cotiledonar apresentaram um decréscimo nos teores de amido ($0,6 \text{ mg.g}^{-1}$) (Figura 7).

B.2 Aminoácidos

Embrião somático no estágio globular e cordiforme apresentaram baixos teores de aminoácidos livres totais, observando-se um incremento nestes valores até o estágio cotiledonar (Figura 8).

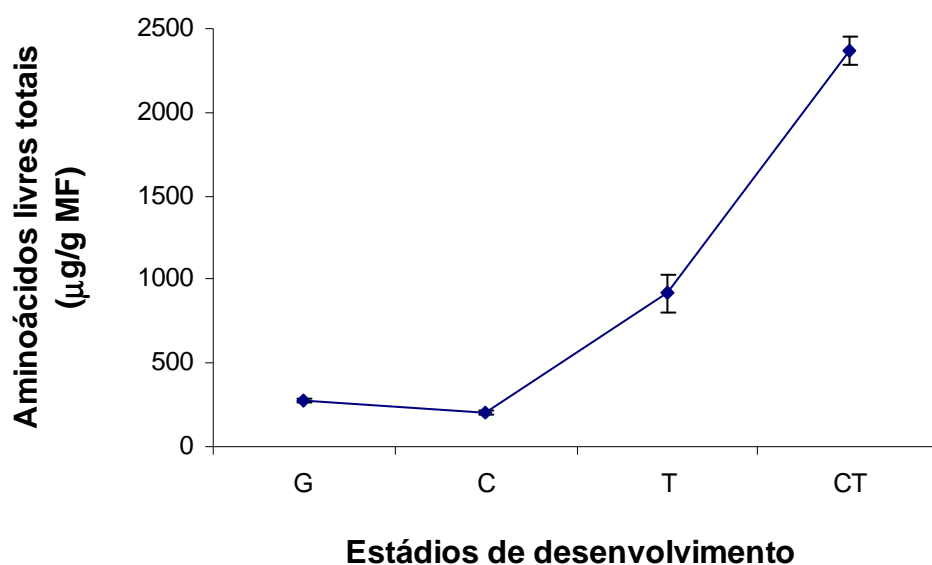


Figura 8. Aminoácidos livres totais nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*; C: cordiforme, T: torpedó, PT: pré-cotiledonar e CT: cotiledonar (média \pm desvio padrão, n=3).

Durante o desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. sellowiana*, os aminoácidos Arg e Asn apresentaram os valores mais elevados (Figura 9). Depois, associada ao desenvolvimento do embrião somático foram observados teores intermediários para Gln, Ser, Glu, Gaba, His, Asp, Ala, Leu, Phe, Lis, Val, Trp, Ile, Gly e Ter. Os menores valores foram registrados para os aminoácidos Met e Tir, sendo o primeiro registrado só no estágio cordiforme e o segundo nos estádios torpedó e cotiledonar. A Orn não foi registrada em nenhum estágio (Figura 9 e 10). No embrião em estágio globular até torpedó, a Asn e Arg apresentaram os maiores teores dentre os aminoácidos analisados, depois esta relação foi invertida no estágio cotiledonar.

B.3 Poliaminas

Nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*, os teores de PAs totais aumentaram de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento, exceto para o estágio cordiforme onde os valores foram baixos. Os teores mais elevados foram registrados no estágio cotiledonar (Figura 11A). Embriões somáticos no estágio globular, cordiforme, e pré-cotiledonar apresentaram teores mais baixos de Put, intermediários de Spd e mais elevados de Spm. A relação Put/(Spd+Spm) nos diferentes estádios de desenvolvimento dos

Figura 9. Aminoácidos livres nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*; C: cordiforme, T: torpedo, PT: pré-cotiledonar e CT: Cotiledonar **A.** Arg; **B.** Asn; **C.** Gln; **D.** Ser; **E.** Glu; **F.** Gaba; **G.** His; **H.** Asp; **I.** Ala; **J.** Leu. (média \pm desvio padrão, n=3).

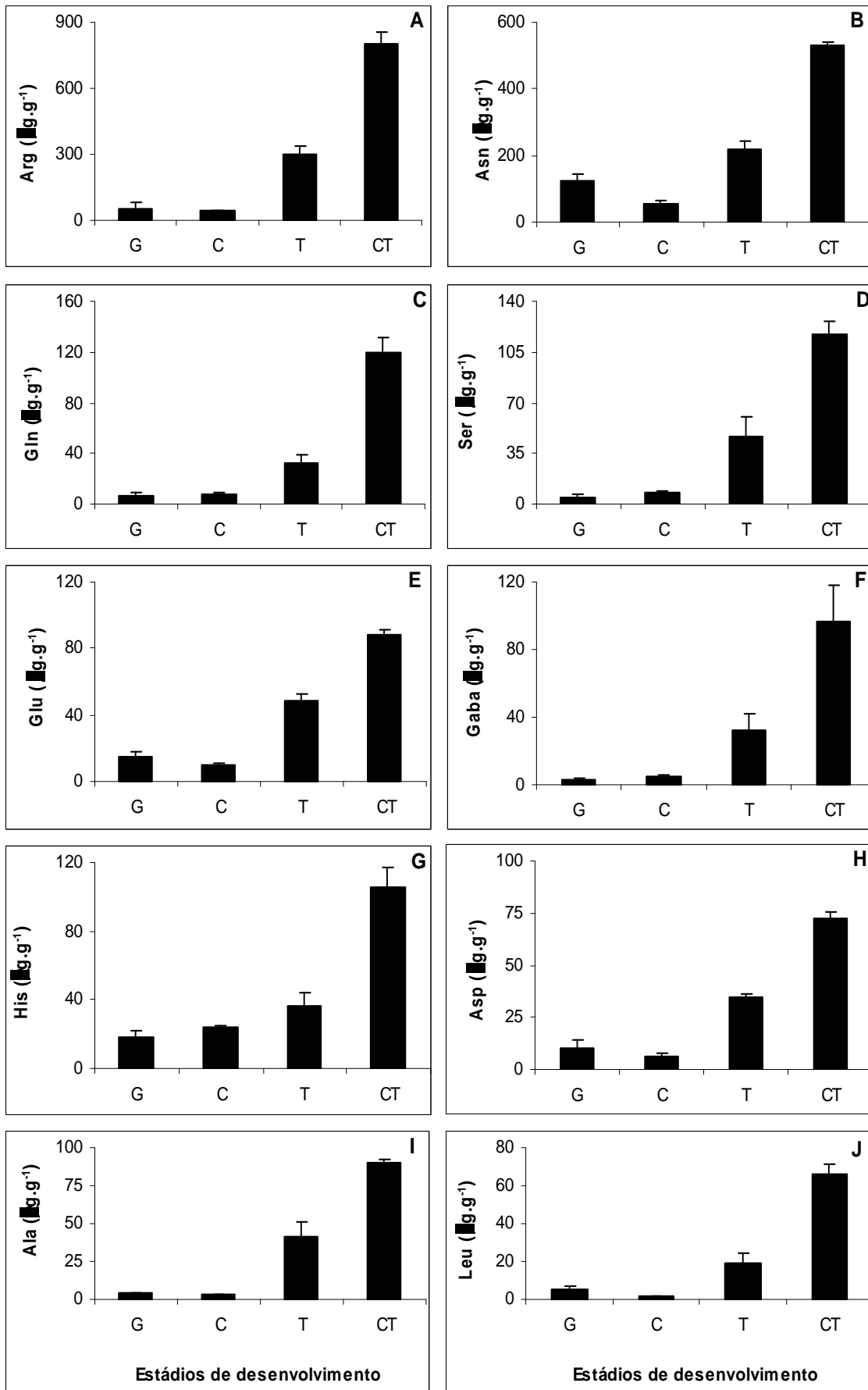
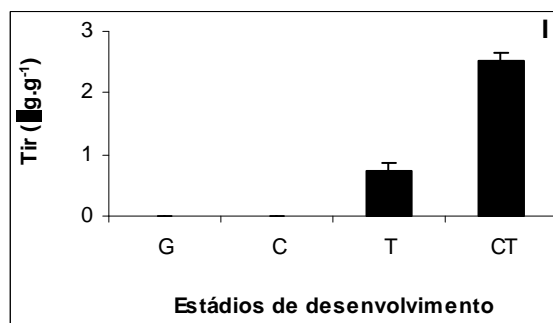
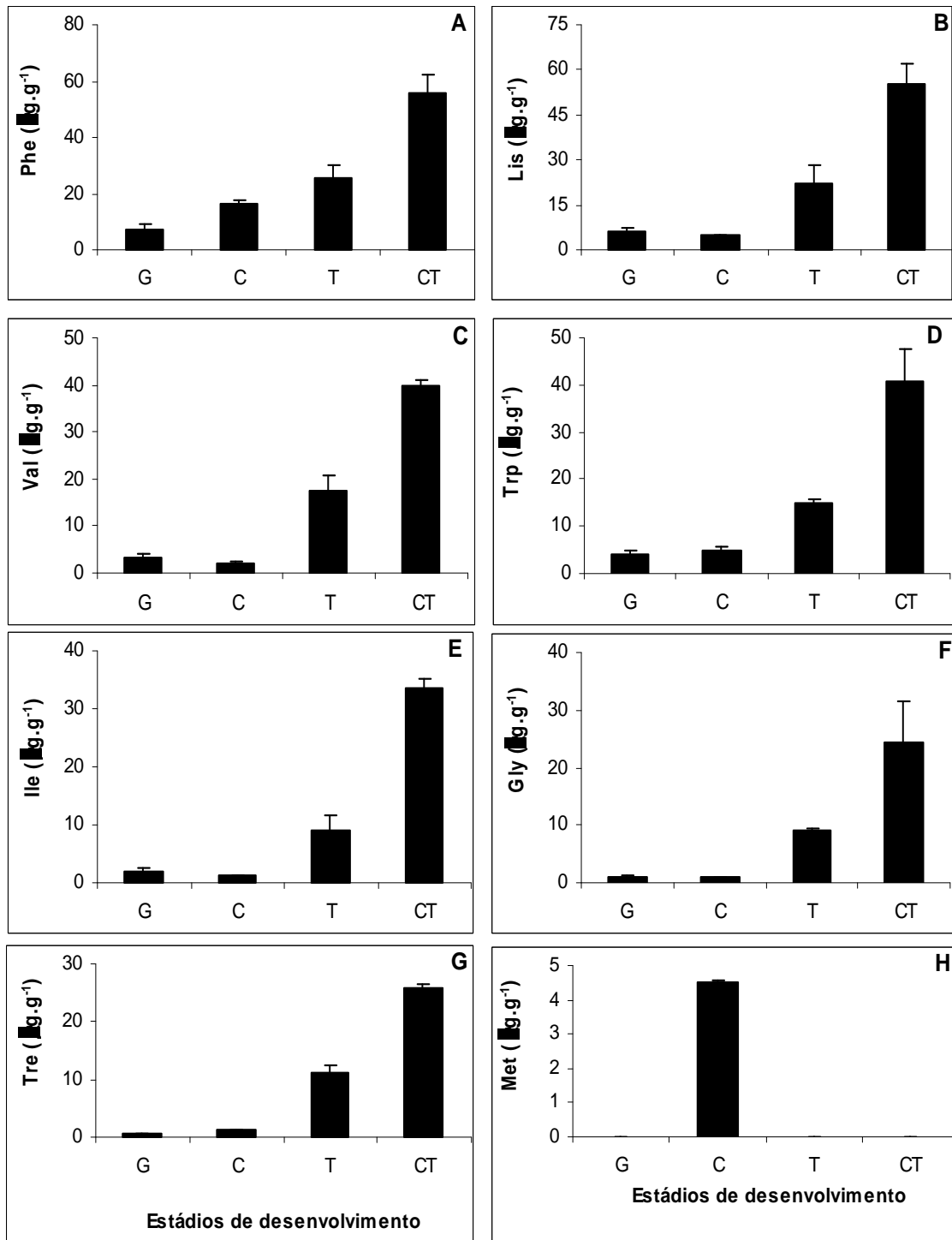


Figura 10. Aminoácidos livres nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*; C: cordiforme, T: torpedo, PT: pré-cotiledonar e CT: Cotiledonar. **A.** Phe; **B.** Lis; **C.** Val; **D.** Trp; **E.** Ile; **F.** Gly; **G.** Tre; **H.** Met; **I.** Tir. (média \pm desvio padrão, n=3).



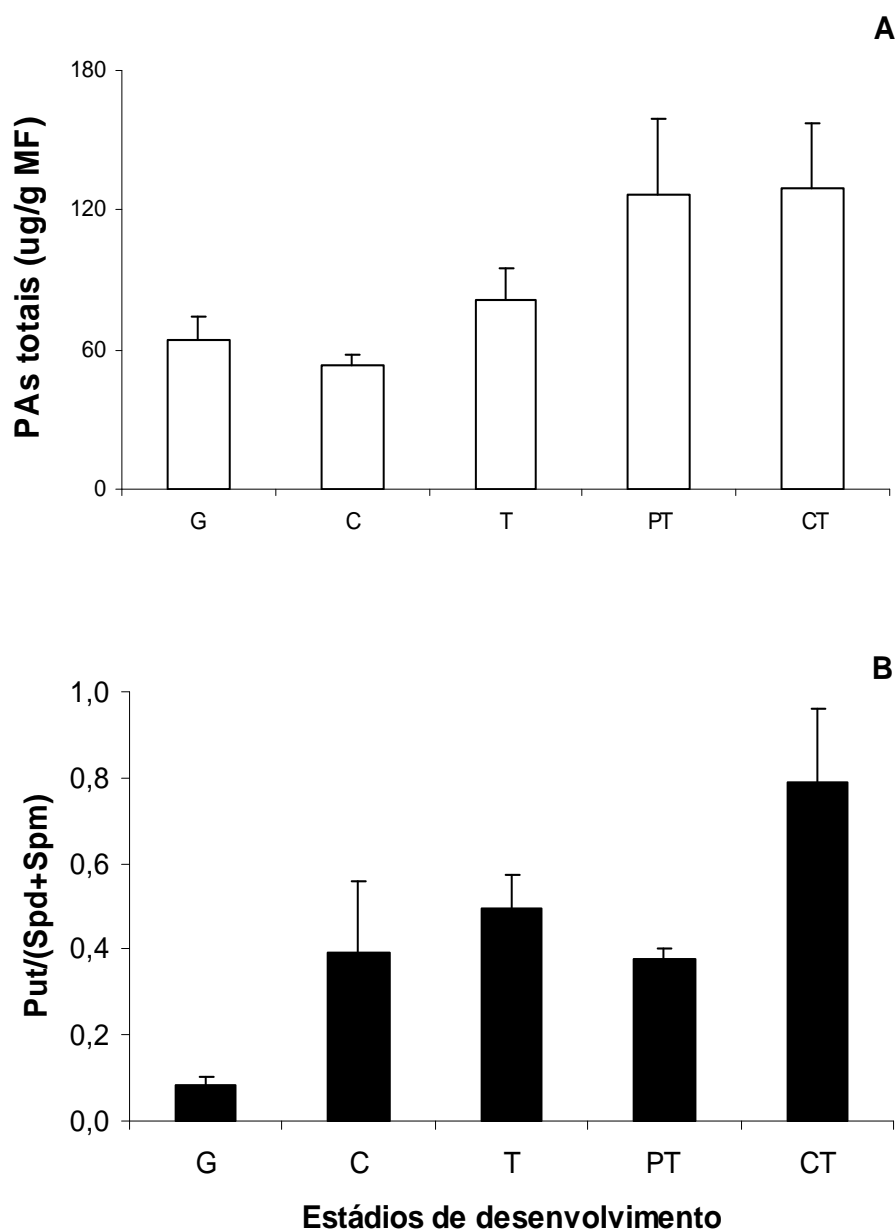


Figura 11. Concentração média de: **A)** PAs totais ($\mu\text{g/g}$) de matéria fresca (MF) e **B)** razão de Put/(Spd+Spm) nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*; C: cordiforme, T: torpedo, PT: pré-cotiledonar e CT: cotiledonar (média \pm desvio padrão, $n=3$).

embriões somáticos de *A. sellowiana* foi baixa nos estádios iniciais, aumentando posteriormente (Figura 11B).

As PAs livres (Figura 12A) ocorrem em teores superiores em relação às conjugadas (Figura 12B). De tal forma que os teores mais elevados de PAs livres totais foi registrado no estágio cotiledonar, sendo na maioria das vezes a Spm, a forma predominante nos estádios do embrião somático (Figura 12A).

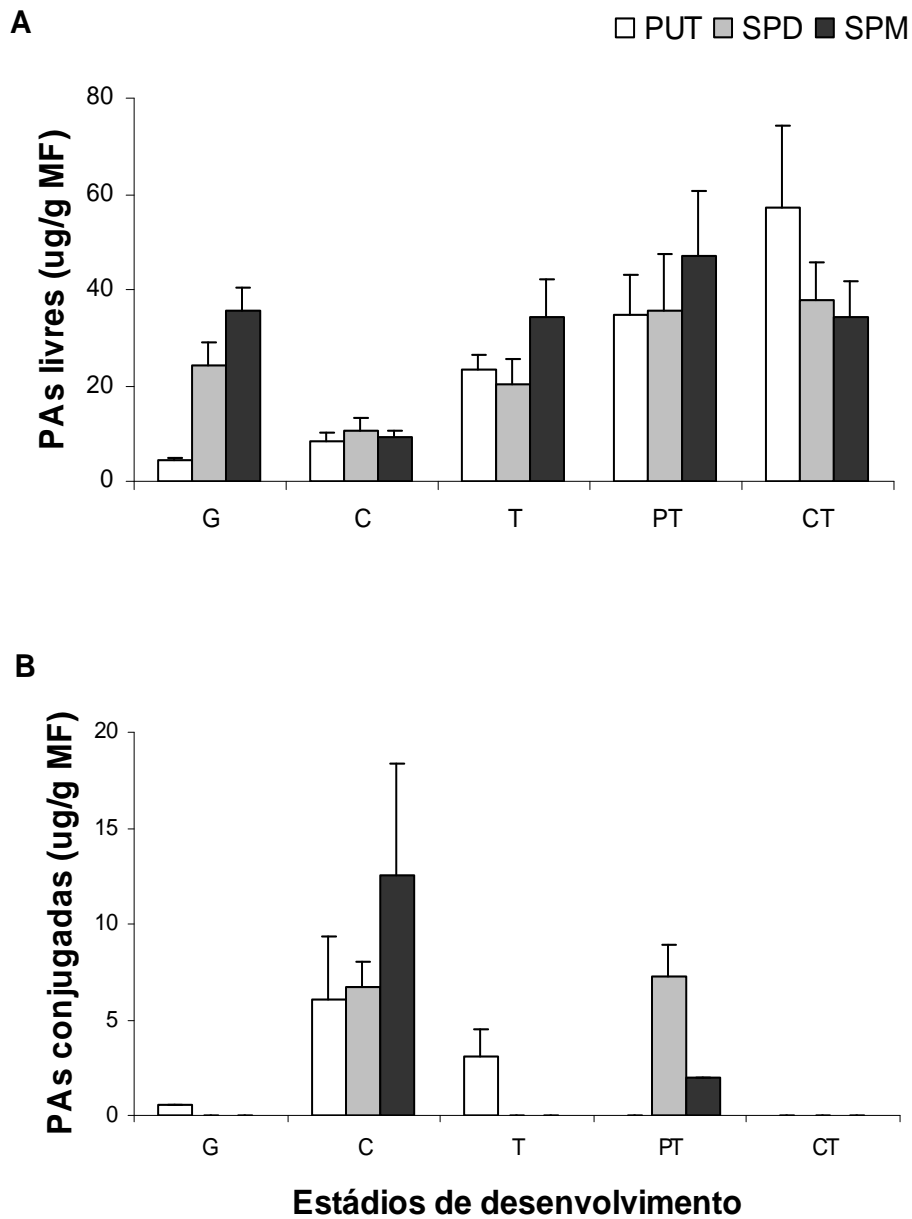


Figura 12. Concentração média de poliaminas: **A)** livres e **B)** conjugadas ($\mu\text{g/g}$) de Matéria fresca (MF) nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*; C: cordiforme, T: torpeda, PT: pré-cotiledonar e CT: Cotiledonar (média \pm desvio padrão, $n=3$).

Os embriões somáticos nos estádios globular e torpeda revelaram somente a presença de Put na classe das PAs conjugadas. Embriões somáticos no estágio cordiforme apresentaram todos os tipos de PAs conjugadas, onde a relação dos teores foi baixa para a Put, intermediária para Spd e alta para Spm. Já, embriões somáticos no estágio pré-cotiledonar apresentaram somente Spd e Spm, com

valores mais altos para a primeira. Embriões somáticos no estágio cotiledonar não apresentaram nenhum tipo de PA conjugada (Figura 12B).

B.4 ABA

Os teores mais elevados de ABA foram registrados no embrião somático no estágio torpedo, decrescendo no estágio cotiledonar (Figura 13).

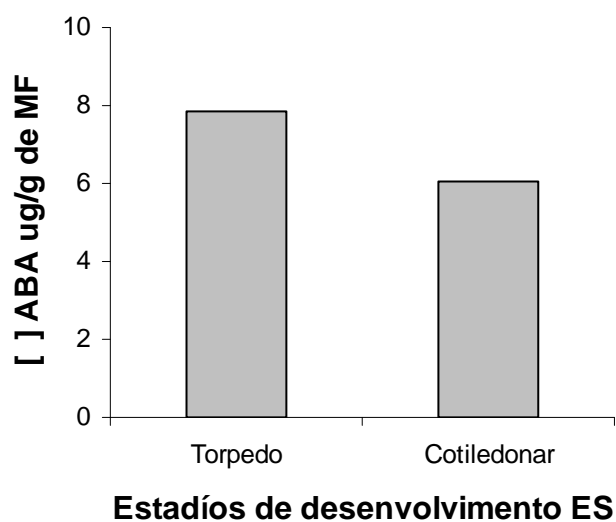


Figura 13. Concentração de ABA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de matéria fresca (MF) nos estádios torpedo e cotiledonar de embriões somáticos de *A. sellowiana*.

Figura 14: Resumo das mudanças bioquímicas durante a indução de embriogênese somática de *A. sellowiana*.

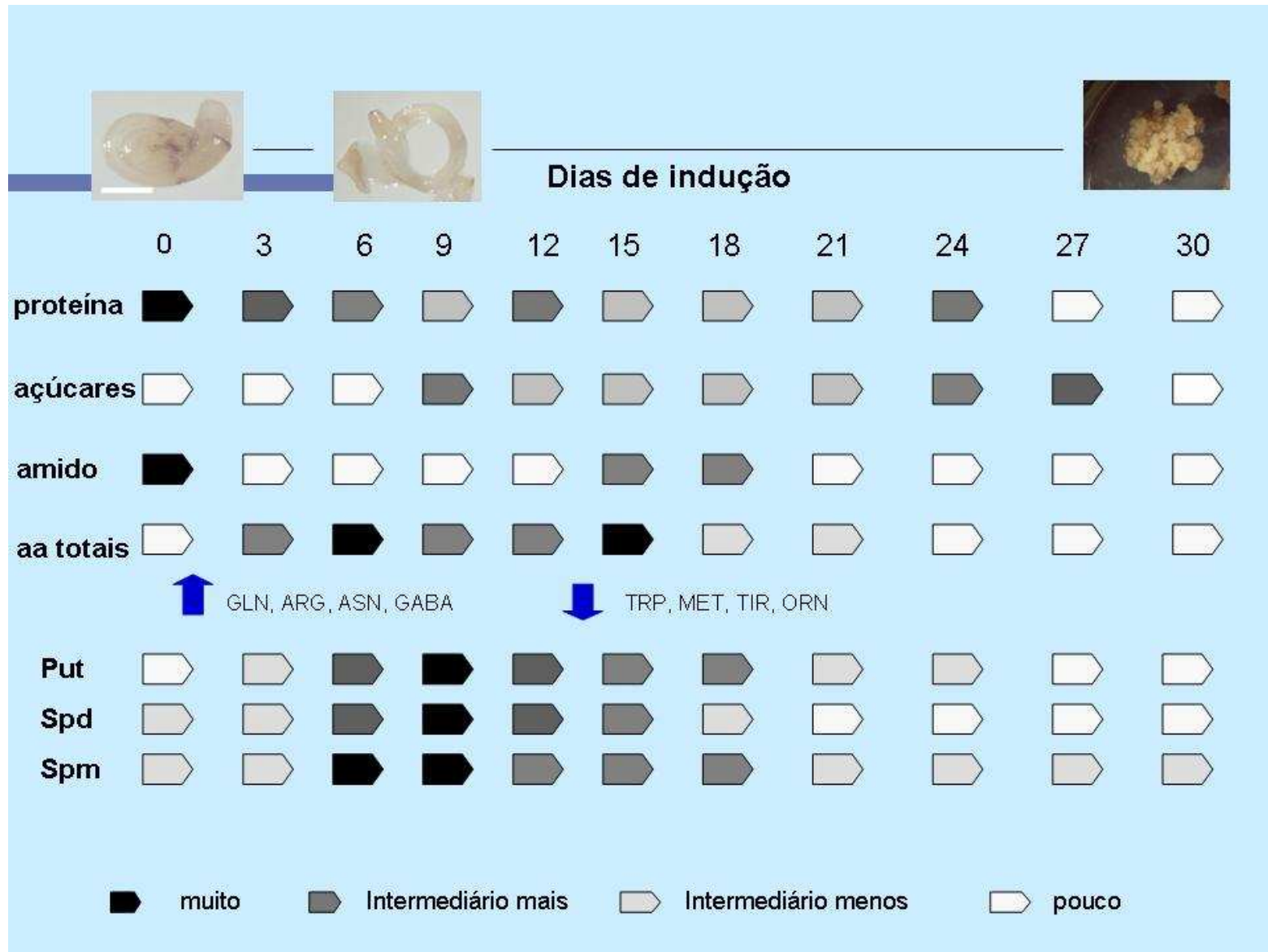
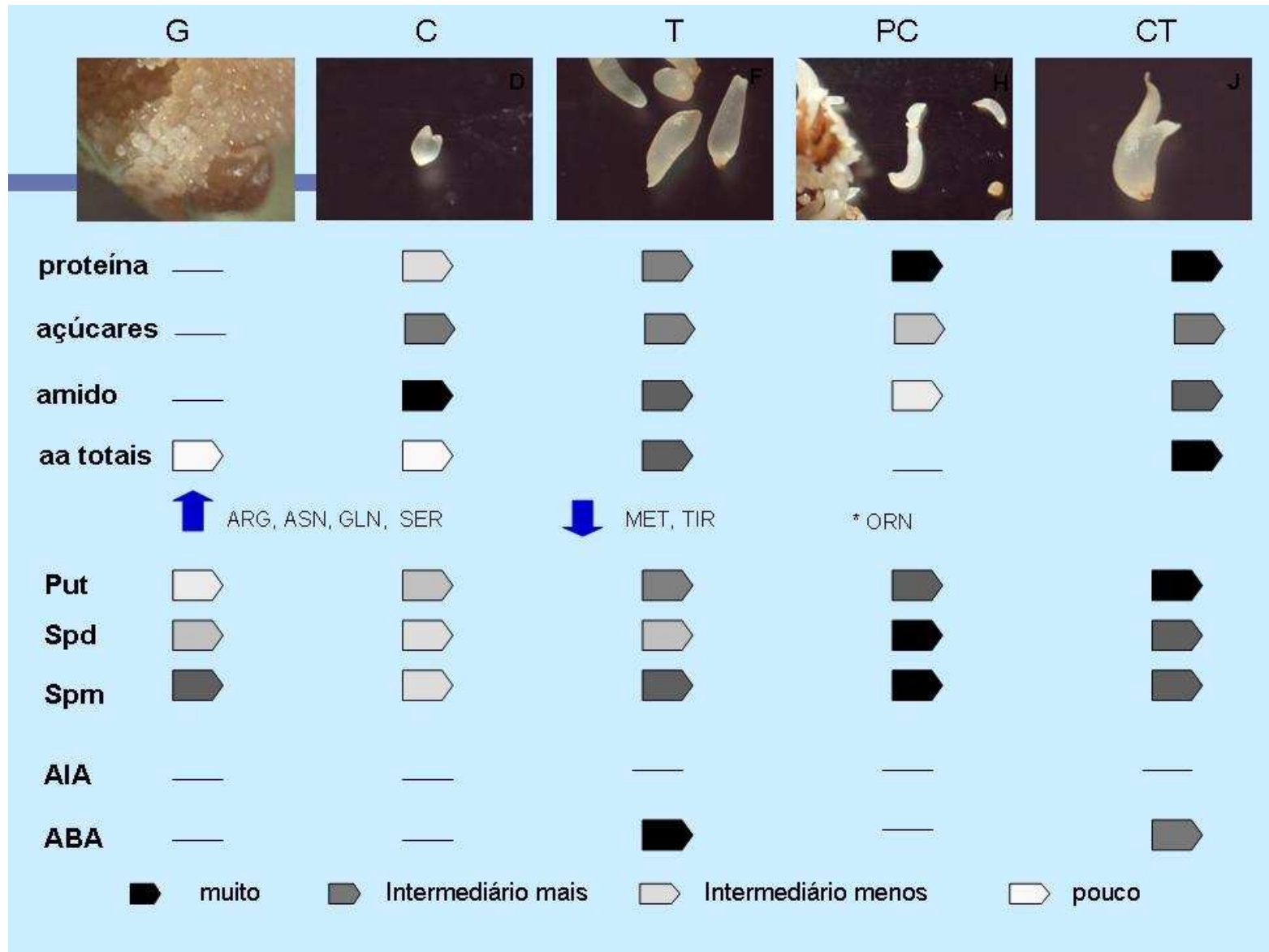


Figura 15: Resumo das mudanças bioquímicas durante os estádios de desenvolvimento do embrião somático *A. sellowiana*.



DISCUSSÃO

A. Durante a indução da embriogênese somática

A.1 Proteínas, açúcares e amido

No presente trabalho, durante os primeiros 30 dias de indução à embriogênese somática, as concentrações de proteínas totais decresceram em relação ao inóculo inicial. Esta diminuição dos teores de proteínas ao longo do tempo poderia ser atribuída ao consumo destas pela ativação do metabolismo celular que ocorreu especialmente nos tecidos do explante onde células simples ou grupo de células são determinantes para o estabelecimento e expressão da competência embriogenética. Gutmann *et al.* (1996) observaram incremento nos teores de proteínas nas culturas embriogênicas do híbrido *Larix x leptoeuropaea* durante as duas primeiras semanas em cultura de cultivo, seguido por um decréscimo deste conteúdo nas semanas seguintes.

O crescimento das culturas embriogênicas geralmente é acompanhado por mudanças na síntese e mobilização das proteínas, carboidratos e lipídios. Os teores destas substâncias são variáveis nas diferentes fases de crescimento das culturas celulares (LULSDORF *et al.*, 1992), onde elas atuam como sinais específicos na cadeia de tradução de sinais ou no fornecimento de substratos e energia necessários para o crescimento celular (NOMURA e KOMAMINE, 1995).

No presente trabalho, tanto os teores de amido como de açúcares totais mantiveram-se constantes durante os dias de avaliação. Na última data de avaliação, os teores de açúcares foram aproximadamente o dobro do valor observado no inóculo inicial. Martin *et al.* (2000) reportaram que o conteúdo diferencial de açúcares redutores e de amido foi uma característica que distinguiu calos embriogênicos dos não embriogênicos de *Medicago arborea*. Altas concentrações de açúcares e baixo conteúdo de amido foram observados em culturas embriogênicas, em contraste com as culturas não embriogênicas. Os resultados do presente trabalho não corroboram estes padrões, mas em trabalhos anteriores com a mesma espécie (CANGAHUALA-INOCENTE, 2002) mostrou-se esse mesmo padrão de síntese, com altas concentrações de açúcares e baixo conteúdo de amido. Este comportamento, contudo, passou a ser observado aos 30 dias onde o conteúdo de açúcares foi praticamente o dobro dos valores observados no inóculo inicial, e o conteúdo de amido foi aproximadamente seis vezes menor do que os valores observados no inóculo inicial.

Segundo Bewley e Black (1994), os açúcares não são utilizados diretamente para o metabolismo energético e sim transformados em amido, como substância de reserva acumulada nos cotilédones, sendo a sacarose a principal fonte para a síntese de amido em sementes. Estes autores também mostraram que, durante a fase de maturação das sementes, ocorre um acúmulo de substâncias de reserva como o amido.

A.2 Aminoácidos

No presente trabalho, no momento da indução, o conteúdo de aminoácidos livres totais foi baixo, atingindo seu nível máximo aos seis e quinze dias em cultura. Isto poderia ocorrer como resposta à suplementação exógena do ácido glutâmico, o qual estaria sendo incorporado aos tecidos do explante e/ou pelas mudanças das rotas metabólicas de diferenciação dos tecidos cotiledonares os quais foram responsivos a este processo. Esses resultados foram contrários àqueles registrados por Pescador (2004) para esta mesma espécie, onde foi registrado um elevado nível de aminoácidos entre o momento da inoculação e o 3º dia em cultura, decrescendo lentamente até o 24º dia, seguido de uma retomada rápida das concentrações no último dia analisado (30º dia). Um rápido incremento da quantidade de aminoácidos totais foi reportado durante a proliferação celular e durante a formação dos estádios iniciais do embrião somáticos de cenoura (KAMADA e HARADA, 1984).

Os aminoácidos são a principal forma de transporte de N nas células, podendo ainda ser utilizados para a síntese de proteínas ou para dar suporte ao crescimento e desenvolvimento nos tecidos com intensa atividade metabólica (ORTIZ-LOPEZ *et al.*, 2000). Na maioria dos estudos sobre embriogênese somática, os aminoácidos adicionados ao meio de cultura são fontes de N orgânico para o estímulo, indução e manutenção deste processo morfogênético. A Gln, por exemplo, é comumente suplementada ao meio de cultura como fonte de N orgânico (FRANKLIN e DIXON, 1994). Assim, poucos trabalhos relacionam a variação endógena dos aminoácidos durante o processo de embriogênese somática com seus efeitos sobre a competência embriogênica adquirida.

Por outro lado, os resultados obtidos no presente trabalho foram similares aos observados nos agregados celulares embriogênicos de *Ocotea catharinensis*, os quais apresentaram um aumento nos teores de aminoácidos livres totais na primeira semana em cultura, seguido de decréscimo significativo até a quinta semana

(SANTA CATARINA *et al.*, 2004). Em *Vigna mungo* foi observado um incremento dos teores endógenos dos diferentes aminoácidos durante a indução da embriogênese somática e organogênese (SEN *et al.*, 2002).

No presente trabalho, durante a indução a embriogênese somática, os aminoácidos Gln, Arg, Asn e Gaba apresentaram os maiores teores. O alto conteúdo de Gln poderia ser atribuído à suplementação do ácido glutâmico ao meio de cultura. Sabe-se que o ácido glutâmico é o principal doador de N durante o anabolismo, sendo também precursor da glutamina (BOHINSKI, 1991), de tal forma que a incorporação desse aminoácido na célula estaria elevando a síntese da glutamina endógena nos tecidos.

Uma observação importante foi o fato de que certos aminoácidos apresentaram teores mais altos em dois momentos durante a indução. Um aos seis dias em cultura, destacando-se Gln, Gaba, Ala, Gly, Tir e Orn e outro aos quinze dias, destacando-se Asn, Glu e Asp. Os outros aminoácidos sempre apresentaram seus valores máximos em ambos os períodos. Isto sugere que importantes eventos bioquímicos e morfogenéticos estariam ocorrendo nesses estádios, o que estaria correlacionado com a síntese de aminoácidos específicos.

Corroborando os resultados obtidos no presente trabalho, Durzan e Chalupa (1976) observaram que calos de *Pinus banksiana* apresentaram maiores valores para os aminoácidos Gln e Asn. Já em *O. catharinense*, estes mesmos aminoácidos apresentaram valores intermediários, sendo o Arg, Gaba, Lis e Glu os aminoácidos com maiores teores (SANTA CATARINA *et al.*, 2004). Em *Cryptomeria japonica* os tecidos embriogênicos apresentaram altos teores de glutamina o que foi correlacionado com a indução de um grande número de agregados embriogênicos (OGITA *et al.*, 2001).

A.3 Poliaminas

No presente trabalho, durante a indução da embriogênese somática os teores de PAs totais aumentaram no início da cultura, decrescendo posteriormente ao final dos 30 dias. Durante a indução de culturas embriogênicas de *Solanum melongena* foi observada uma intensa proliferação destas culturas com incremento no conteúdo endógeno de PAs (FRACASSINI *et al.*, 1980, MAKI *et al.*, 1991). Outros trabalhos demonstraram que o conteúdo endógeno de PAs esteve associado a diferenças na

competência embriogênica das culturas (SHARMA e RAJAM, 1995; YADAV e RAJAM, 1997).

Os resultados obtidos em diferentes sistemas, tais como *Daucus carota* (BASTOLA e MINOCHA, 1995), *Solanum melongena* (YADAV E RAJAM, 1997) e calos embriogênicos de *Oryza sativa* (SHOEB et al., 2001), propõem a existência de uma correlação entre o conteúdo de PAs, expressa pela relação Put/(Spd+Spm), com a competência das células em regenerar embriões somáticos. Assim, no presente trabalho, a relação Put/(Spd+Spm) durante a indução à embriogênese somática foi mais baixa no momento da indução, aumentando até os 9 dias de indução com uma diminuição posterior. Esse acúmulo de PAs se deveu principalmente ao maior nível de Put na forma livre.

No presente trabalho, os valores PAs livres aumentaram nos primeiros dias de cultivo, posteriormente, os valores decresceram. A Put livre foi a que apresentou teores mais elevados durante a indução de embriogênese somática. Resultados semelhantes foram observados em culturas de *Saccharum* sp. cv. CP52-43, *O. catharinensis* e *Vitis vinifera*, onde foi observado maior conteúdo de Put seguido da Spd e Spm (NIEVES et al., 2003b; SANTA CATARINA et al., 2004 e BERTOLDI et al., 2004). O incremento da biossíntese de poliaminas em plantas tem sido correlacionado com o incremento da divisão celular (GALSTON e FLORES, 1991). Altos teores de Put no início da embriogênese somática podem estar relacionados com a capacidade da célula em produzir embriões somáticos (NIEVES et al., 2003b).

No presente trabalho, entre o 6^o e 15^o dia em cultura não foram detectados PAs conjugadas, observando-se a partir de 18^o dia. Na maioria das vezes só foi detectado Put conjugada. Esses resultados sugerem que a síntese e acumulação de PAs conjugadas ocorre no início da embriogênese somática. Para este mesmo sistema embriogênico observou-se entre o 18^o e 39^o dias após inoculação, uma intensa proliferação celular associada à síntese de polifenóis com posterior formação de centros meristemáticos e de massas celulares pró-embriônicas (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004).

B. Durante os estádios de desenvolvimento do embrião somático

B.1 Proteínas, açúcares e amido

No presente trabalho, diferenças significativas entre os teores de proteínas totais foram observadas nos embriões somáticos em diferentes estádios de

desenvolvimento. Este acúmulo de proteína parece estar relacionado com os processos de maturação dos embriões somáticos como sugerido por Cangahuala-Inocente (2002).

No presente trabalho, os teores de açúcares solúveis e do amido foram variáveis nos diferentes estádios dos embriões somáticos. De tal forma que os açúcares totais apresentaram valores similares nos estádios cordiforme e torpedo, sendo menor no estágio pré-cotiledonar. Os elevados teores de açúcares em embriões somáticos de *Medicago sativa* foram associados às altas concentrações de carbono no meio de cultura (HORBOWICZ *et al.*, 1995). Já, os teores de amido foram maiores no estágio cordiforme e menores no estágio pré-cotiledonar. Alguns destes estudos evidenciaram um aumento no conteúdo de amido durante a maturação de embriões somáticos, os quais apresentaram teores mais elevados deste composto do que aqueles observados em embriões zigóticos (MERKLE *et al.*, 1995).

Esses resultados corroboram aqueles obtidos por Cangahuala-Inocente (2002) essencialmente na relação e proporção dos valores encontrados de proteínas, amido e açúcares totais. Assim, pode-se inferir que nesta espécie os processos e parâmetros bioquímicos associados à embriogênese somática se mantêm estáveis e repetitivos.

B.2 Aminoácidos

No presente trabalho, os embriões somáticos nos diferentes estádios de desenvolvimento apresentaram significativa variação dos teores de aminoácidos livres totais. Em tecidos com intensa atividade metabólica, os aminoácidos são translocados para dar suporte ao crescimento e desenvolvimento (ORTIZ-LOPEZ *et al.*, 2000). Assim, sugere-se que os baixos teores de aminoácidos totais nos estádios iniciais de desenvolvimento observados no presente trabalho estariam relacionados com um possível dreno dos mesmos para suportar os processos bioquímicos e morfológicos que acontecem nesse período, tais como a formação do eixo embrionário apical-basal, a formação dos tecidos pró-cambiais, a formação das iniciais dos cotilédones e as divisões celulares relacionadas com estabelecimento da simetria bilateral.

Estes resultados são distintos daqueles reportados por Pescador (2004) nesta mesma espécie, onde os maiores teores de aminoácidos foram detectados no

embrião somático no estágio globular, decrescendo conforme a evolução dos mesmos. Também, em *O. catharinense* os valores mais elevados de aminoácidos totais foram registrados no estágio globular e os menores no estágio cotiledonar (SANTA CATARINA *et al.*, 2006).

No presente trabalho, os resultados obtidos para a análise de aminoácidos ao longo do desenvolvimento do embrião somático coincidem com o padrão observado no embrião zigótico nesses mesmos estádios (Seção III, Capítulo 1), porém em teores relativamente mais baixos. No embrião zigótico os aminoácidos com teores mais elevados foram Asn e Gln. Por sua vez, para os embriões somáticos os valores mais elevados foram observados para a Arg e Asn. No trabalho de Pescador (2004) os aminoácidos que apresentaram os valores mais elevados foram Glu e Asn. No embrião zigótico, a Arg esteve dentro de um grupo de aminoácidos com teores intermediários a baixos, enquanto que no embrião somático os teores deste aminoácido foram 6,5 vezes maiores que os valores observados no embrião zigótico. Isto pode ter ocorrido por dois possíveis mecanismos: 1) existem evidências de que a Orn, dentro do ciclo da uréia, seja convertida em Arg por meio das seguintes reações: Orn→Citrulina (Cit)→Arginina succinato→ Arg→proteína com Arg (MICALLEF e SHELPH, 1989; LUDWIG, 1993). Coincidentemente, durante o desenvolvimento dos embriões somáticos não foi registrado a presença de Orn, sugerindo que toda a Orn sintetizada foi convertida em Arg; 2) O meio utilizado para a indução e desenvolvimento dos embriões somáticos foi suplementado com Glu, o qual estaria sendo convertido em Orn via acetilação de derivados do glutamato como descrito por Davis (1955) e Thompson (1980). Já, a Orn dentro do ciclo da uréia seria convertida em Arg.

A Arg age como uma molécula transportadora de N e é uma importante forma de armazenamento de N em plantas. Na semente, a Arg constitui mais de 40% do N armazenado em proteína, como mostrado por Micallef e Shelp (1989), cujos estudos também evidenciaram que o catabolismo da Arg estaria também acontecendo no desenvolvimento dos cotilédones na soja.

No presente trabalho, todos os estádios de desenvolvendo do embrião somático apresentaram altos teores de Asn e Arg, sendo que essa relação foi invertida para o estágio cotiledonar. Comparativamente aos valores observados para o embrião zigótico, os aminoácidos Asn e Glu ocorreram em maiores concentrações no estágio globular. Já para os estádios cordiforme, torpedo e cotiledonar, os

aminoácidos predominantes continuaram sendo a Asn e a Gln (Seção III, Capítulo 1).

Em plantas, a Asn é importante componente para o transporte de N e seus teores são estritamente regulados pela luz em algumas espécies, incluída *Arabidopsis thaliana* (LAM *et al.*, 1998). A sacarose e aminoácidos, principalmente Asn e Gln, são um recurso primário de C e N disponível para a germinação do embrião de soja (RAINBIRD *et al.*, 1984). Foi também observada uma correlação positiva entre Asn livre no desenvolvimento dos cotilédones e o conteúdo de proteínas de reserva nas sementes de soja (HERNÁNDEZ-SEBASTIÀ *et al.*, 2005)

B.3 Poliaminas

No presente trabalho, nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*, os teores de PAs totais aumentaram de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento, exceto para o estágio cordiforme onde os valores foram baixos. Comparando estes resultados com aqueles observados para os embriões zigóticos, os padrões foram diferentes. No embrião zigótico, as PAs totais se apresentaram em valores similares em todos os estádios de desenvolvimento (Seção III, Capítulo 1); já no embrião somático, as PAs totais aumentaram de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento. Em *O. catarinense* o maior conteúdo de PAs totais ocorreu no embrião somático em estágio globular e os teores mais baixos ocorreram no estágio cotiledonar (SANTA CATARINA *et al.*, 2004).

As PAs são sintetizadas a partir dos aminoácidos Orn, Arg e Lis de forma direta e a partir da Met de forma indireta (BAGNI e TASONI, 2001). No presente trabalho, uma análise relacional entre as poliaminas e os aminoácidos precursores destes revelou que tanto os referidos aminoácidos quanto as PAs apresentaram seus maiores teores no estágio cotiledonar. É provável que a suplementação de Glu ao meio de cultura estaria promovendo um incremento nos teores de PAs. Como afirmado anteriormente, a Glu pode ser convertida a Orn (ver aminoácidos), e esta por sua vez esta associada à síntese de PAs.

No presente trabalho, a relação Put/(Spd+Spm) nos diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. sellowiana* foi baixa nos estádios iniciais, aumentando posteriormente. Já, essa mesma relação durante o desenvolvimento do embrião zigótico (30, 45 e 60 DAP), correspondentes aos

estádios globular, cordiforme e torpedo respectivamente, foi alta sendo maior no estágio cordiforme, decrescendo posteriormente até o estágio cotiledonar (Seção III, Capítulo 1). Portanto, essa relação observada nos embriões somáticos poderia sugerir uma síntese deficiente de PAs cujos teores deveriam ser baixos quando o embrião está maduro. Em *O. catharinensis* observou-se que as menores relações de Put/(Spd+Spm) ocorreram nos embriões somáticos globulares, aumentando posteriormente de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento dos embriões (SANTA CATARINA *et al.*, 2004).

A proporção relativa de PAs livres e conjugadas varia dentro das diferentes espécies de planta (BAGNI e TASONI, 2001). Em tabaco mais de 90% das PAs ocorrem na forma conjugada (TORRIGIANI *et al.*, 1987). No presente trabalho, as PAs livres ocorrem em teores superiores em relação às conjugadas, sendo que esta relação também foi observada em outros trabalhos (SHOEB *et al.*, 2001; SANTA CATARINA *et al.*, 2004).

Dentre as PAs, a Put e a Spd são geralmente as mais abundantes, enquanto que a Spm está presente em traços (BAGNI e TASONI, 2001). Assim, no presente trabalho, nos estádios globular, cordiforme e pré-cotiledonar, as PAs livres apresentaram valores baixos de Put, intermediários de Spd e elevados de Spm. Já, nos estádios torpedo e cotiledonar foram observados diferentes padrões de variação nos teores Put, Spd e Spm. Minocha *et al.* (1999) sugeriram a ocorrência de um decréscimo no conteúdo de Put, concomitantemente a um acúmulo no conteúdo de Spd ou Spm durante o desenvolvimento dos embriões somáticos de *Pinus radiata*.

As PAs vegetais ocorrem como moléculas livres, mas também conjugadas com outras moléculas, tais como as amidas de ácido hidróxi-cinâmico ou proteínas (BAGNI E TASONI, 2001). No presente trabalho embriões somáticos nos estádios globular e torpedo revelaram somente a presença de Put na classe das PAs conjugadas. A função das PAs conjugadas ainda não está totalmente elucidada, ainda quando foi encontrada uma correlação positiva entre o acúmulo destas e a indução floral e/ou formação do botão floral (BAGNI e TASONI, 2001).

No presente trabalho, a Put conjugada esteve presente somente nos três primeiros estádios de desenvolvimento do embrião somático, globular, cordiforme e torpedo. Por sua vez a Spd e Spm conjugadas estiveram presentes nos estádios cordiforme e pré-cotiledonar, em diferentes proporções. Comparando com as poliaminas conjugadas do embrião zigótico, estes apresentaram todos os tipos de

PAs em todos os estádios (Seção III, Capítulo 1). Assim, os padrões de síntese e acumulação de todas as PAs nos embriões somáticos foram contrários aos observados nos embriões zigóticos, mostrando limitações neste processo morfogênético *in vitro* quando comparado com o processo que ocorre *in vivo*.

B.4 ABA

No presente trabalho, os teores mais elevados de ABA foram registrados no embrião somático no estágio torpedo, decrescendo no estágio cotiledonar. O contrário ocorreu para embriões zigóticos, onde, no estágio torpedo foram detectados os menores valores de ABA, seguido de um aumento progressivo até o estágio cotiledonar (Seção III, Capítulo 1). De acordo com Bewley e Black (1994), a maioria das angiospermas exibe um aumento no conteúdo de ABA durante o desenvolvimento embrionário, declinando posteriormente na semente madura. Dessa mesma forma, os embriões somáticos no estágio cotiledonar de *A. sellowiana* estariam prontos para entrar na fase de dessecação favorecida pelo baixo conteúdo da ABA endógeno (TANG *et al.*, 2002). Nos embriões somáticos de *Quercus suber* observou-se que os teores de ABA endógenos foram incrementando do estágio imaturo ao maduro (GARCIA-MARTIN, 2005).

CONCLUSÕES

No presente trabalho foi gerado informações relevantes sobre as mudanças bioquímicas ocorridas durante o processo da embriogênese somática de *A. sellowiana*. Foram detectados variações no conteúdo endógeno de proteínas, amido, aminoácidos e poliaminas ao longo da fase de indução da embriogênese somática direta desta espécie. O padrão de síntese e acúmulo de proteínas e aminoácidos nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático guardou um paralelo com o padrão observado ao longo do desenvolvimento do embrião zigótico. Para as poliaminas observaram-se diferenças nos padrões de síntese e acumulação entre embriões somáticos e zigóticos, revelando a necessidade de ajustes na composição do meio de cultura. Isto é relevante porque as poliaminas podem afetar a síntese de outros compostos endógenos, tais como a auxina AIA, responsável, entre outras pelo estabelecimento da polaridade do embrião.

Capítulo 3: Aspectos bioquímicos e hormonais durante a germinação dos embriões zigóticos e somáticos de *Acacia sellowiana*.

INTRODUÇÃO

A germinação é um processo pelo qual o embrião reassume o crescimento depois de um período de dormência, onde posteriormente a plântula emerge (RAVEN *et al.*, 2005). Absorção de água, frio, calor, disponibilidade de oxigênio e exposição à luz são fatores que afetam e que podem desencadear o processo de germinação. O período de dormência varia e na maioria das plantas a semente germina quase imediatamente, mas outras requerem uma etapa de repouso prévio à germinação (HILHORST, 1995).

Em dicotiledôneas, a parte da planta que emerge da semente primeiro é a raiz embrionária, denominada radícula ou raiz primária. Isto permite que a planta se fixe no solo e comece a absorver água. Posteriormente o ápice embrionário emerge da semente, sendo composto por três regiões: cotilédones, hipocótilo e epicótilo (RAVEN *et al.*, 2005).

A germinação é um evento significativo que permite compreender o papel dos compostos químicos durante a morfogênese vegetal (NIEVES *et al.*, 1997). Depois da germinação, as substâncias de reserva são metabolizadas em açúcares e aminoácidos, os quais são mobilizados à plântula onde darão suporte ao crescimento durante o desenvolvimento inicial (STONE e GIFFORD, 1997).

A conversão dos embriões somáticos é um passo crítico durante todo o processo de embriogênese somática. Muitos sistemas biológicos mostram-se promissores para a propagação clonal por meio da embriogênese somática, mas os embriões somáticos geralmente apresentam baixas taxas de conversão a plântulas. Em soja, os embriões somáticos de seis cultivares apresentaram uma frequência de conversão de 27% a 45% (LI e GRABAU, 1996). Em *A. sellowiana* os valores mais elevados de conversão de embriões somáticos em plântulas foram de 25,9% (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007).

O objetivo do presente estudo foi avaliar as variações bioquímicas, e os teores endógenos de AIA e ABA durante a germinação dos embriões zigóticos e somáticos de *A. sellowiana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Embriões zigóticos maduros e somáticos no estágio torpedo e pré-cotiledonar foram germinados em placas Petri contendo 30 ml de meio de cultura LPmM (Seção II, Capítulo 1) suplementado com 0,5 μM BAP, 1 μM AG₃, 3% sacarose, 1,5 g.L⁻¹ carvão ativado e 0,7% agar. Foram realizadas avaliações a cada cinco dias até a formação das primeiras folhas verdadeiras durante 30 dias.

Análises bioquímicas

Para as análises de proteínas, amido e açúcares totais utilizaram-se amostras de 300 mg de MF em triplicata. Para as análises de AIA e ABA foram utilizadas amostras de 1 g de matéria fresca em duplicata.

A. Extração e determinação do conteúdo de proteínas totais.

As proteínas totais foram extraídas segundo a metodologia descrita na Seção III, Capítulo 1. O conteúdo das proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) e com a utilização de albumina de soro bovino como padrão, de acordo com a metodologia detalhada na Seção III, Capítulo 1.

B. Determinação dos teores de açúcares totais

A extração dos açúcares solúveis totais foi realizada segundo a metodologia de Shannon (1968) descrita na Seção III, Capítulo 1. A dosagem foi realizada pelo método de Umbreit e Burris (1960), também detalhada na Seção III, Capítulo 1.

C. Extração e determinação do conteúdo de amido

A extração e a determinação do conteúdo de amido total foram realizadas por meio do método de McCready *et al.* (1950) detalhado na Seção III, Capítulo 1.

D. Determinação de AIA e ABA

A metodologia para a determinação do AIA e do ABA foram baseadas nos procedimentos descritos Silveira *et al.* (2004), detalhada na Seção III, Capítulo 1.

Delineamento e análise estatística

Os dados de cada tratamento foram analisados com intervalo de confiança para verificar precisão dos procedimentos adotados durante a condução do experimento e apresentados a partir da média e seu respectivo desvio padrão (SOKAL E ROHLF, 1995).

RESULTADOS

A. Proteína, amido e açúcares totais

Os teores de proteínas durante a germinação do embrião zigótico foram relativamente constantes, mantendo-se em um patamar elevado. Nos cinco primeiros dias observou-se decréscimo do conteúdo de proteínas que chegou a ser sete vezes menor do que os teores observados no embrião zigótico antes da germinação (Figura 1A).

Os teores de açúcares totais durante a germinação do embrião zigótico aumentaram progressivamente até o décimo dia. Nos cinco dias seguintes observou-se decréscimo nestes teores que se mantiveram quase constante até os 25 dias. Posteriormente a este período ocorreu um aumento semelhante ao observado no décimo dia (Figura 1A). Já, os teores de amido durante a germinação do embrião zigótico mostraram perfil similar ao observado para os açúcares, sugerindo o consumo desta substância de reserva. Aos 30 dias os teores de amido aumentaram em até quatro vezes em comparação aos teores observados no embrião zigótico antes da germinação (Figura 1A).

Durante a conversão dos embriões somáticos, os teores de proteína se mantiveram constantes, mostrando pequeno acréscimo aos dez últimos dias (Figura 1B). Já, os teores de açúcares totais mostraram um pequeno aumento nos primeiros quinze dias, e posteriormente a este período observou-se queda brusca dos teores em teores até treze vezes àqueles registrados aos quinze dias (Figura 1B). De forma similar ao observado para os açúcares totais, os teores de amido aumentaram ao longo dos primeiros 15 dias e, posteriormente, diminuíram (Figura 1B).

Os teores de proteínas totais durante a germinação dos embriões zigóticos e somáticos foram similares, exceto no tempo 0. Os valores observados para os embriões zigóticos maduros foram quatro vezes maiores do que os valores observados no embrião somático no estágio torpedo – pré-cotiledonar (Figura 2A).

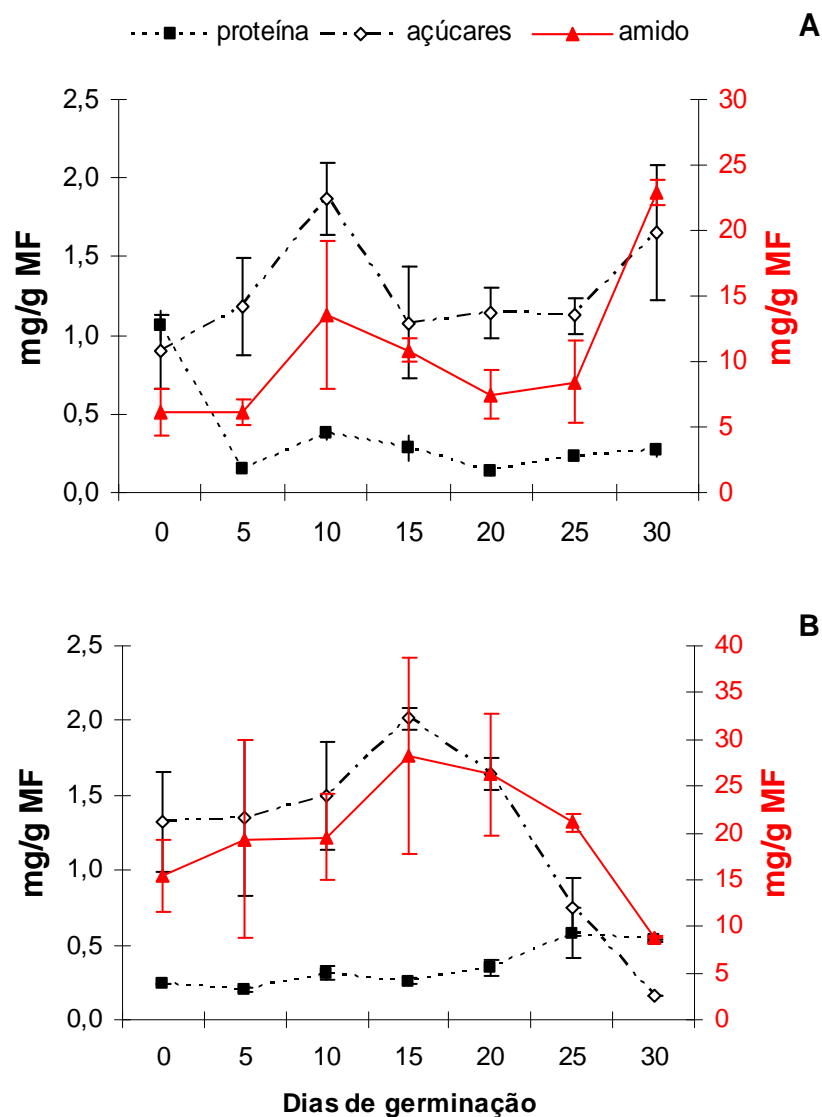


Figura 1. Concentrações médias de proteínas totais, açúcares totais e amido (mg/g) de matéria fresca (MF) durante a germinação do: **A)** embrião zigótico e **B)** somático de *A. sellowiana*.

Durante a germinação do embrião zigótico e somático, os teores de açúcares totais foram diferentes. Nos 20 primeiros dias de cultivo, os teores de açúcares totais na germinação do embrião somático foram maiores do que aqueles observados no embrião zigótico. Esta tendência inverteu-se nos últimos 10 dias, nos quais os teores de açúcares totais do embrião zigótico foram maiores (Figura 2B).

Os teores de amido durante a germinação de ambos os tipos de embriões mostraram-se diferentes. Nos 25 primeiros dias os teores de amido na conversão do embrião somático foram superiores aos valores observados para o embrião zigótico,

invertendo-se nos últimos cinco dias, onde os teores de amido da germinação do embrião zigótico foram maiores (Figura 2C).

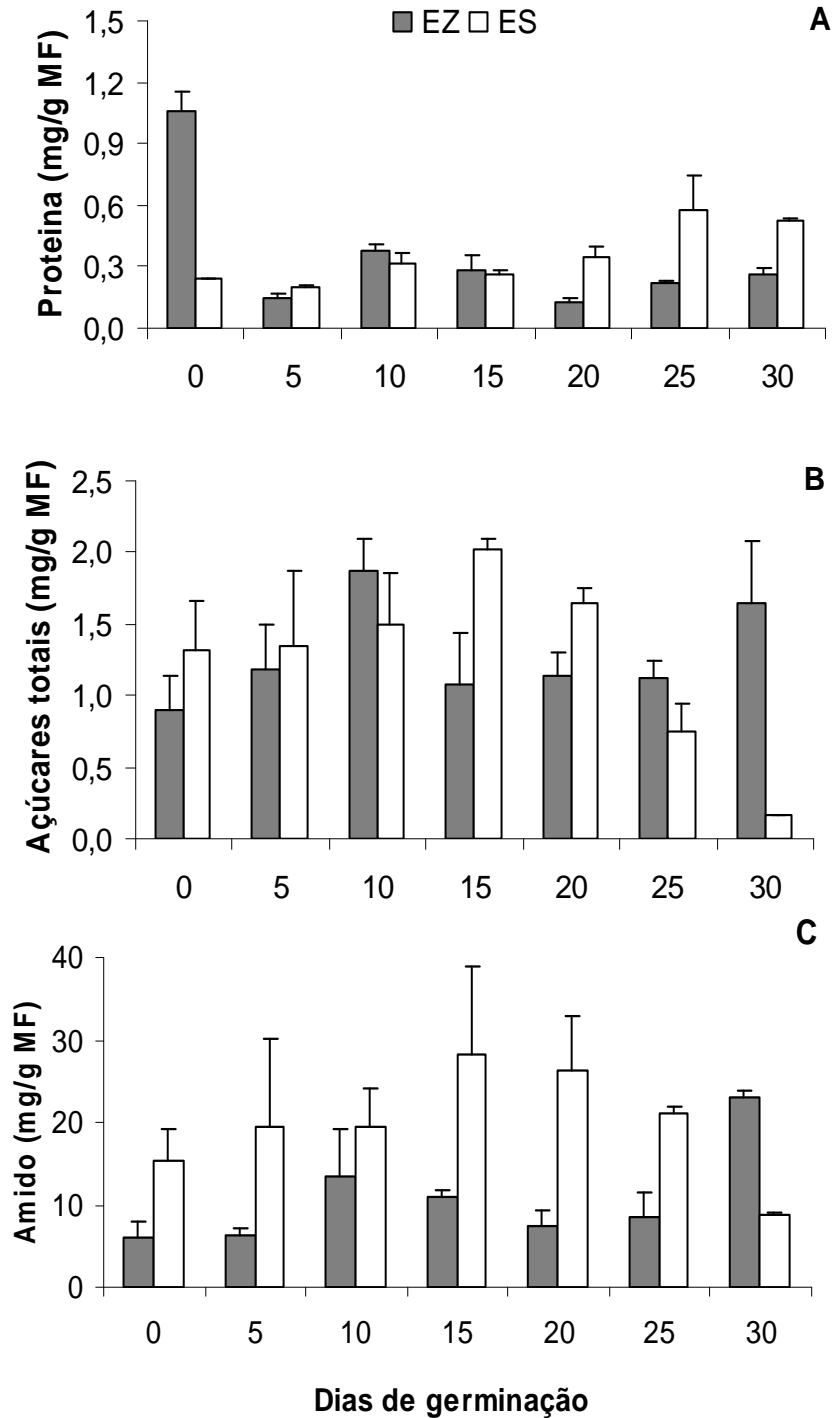


Figura 2. Concentrações médias de: **A)** Proteínas totais, **B)** Açúcares totais e **C)** Amido (mg/g) de matéria fresca (MF) durante a germinação e conversão dos embriões zigóticos e somáticos de *A. sellowiana*.

B. AIA e ABA

Os teores endógenos de AIA durante a germinação dos embriões zigóticos e somáticos de *A. sellowiana* foram diferentes na quantidade e no padrão de desenvolvimento (Figura 3A). Embriões zigóticos apresentaram baixos teores de AIA nos primeiros dias de germinação, aumentando progressivamente até os 15 dias, período na qual o eixo embrionário encontrava-se expandido, com os cotilédones fotossinteticamente ativos e uma raiz principal três vezes o tamanho do embrião. Já nos embriões somáticos, os teores de AIA foram altos no início da germinação, aos quinze dias e posteriormente a este período esses teores decresceram (Figura 3A).

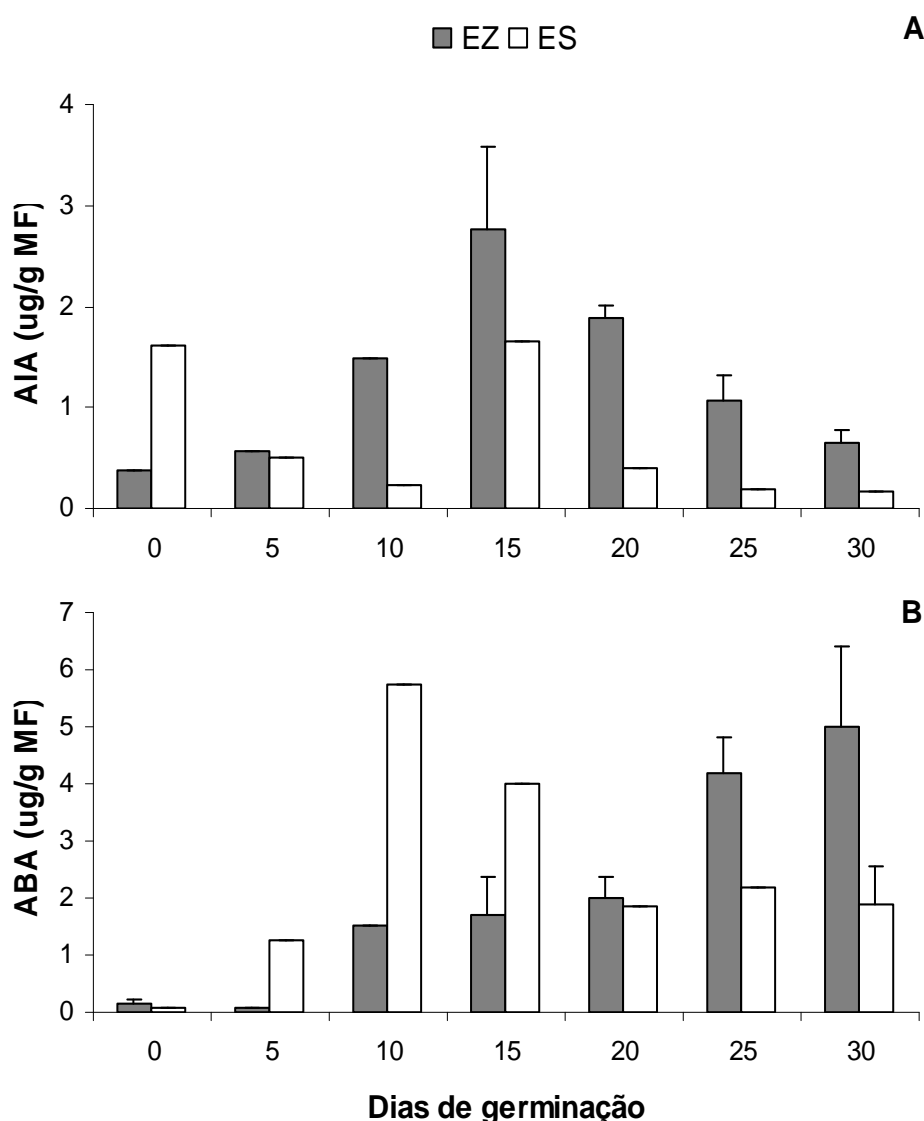


Figura 3. Concentrações médias de: **A)** AIA e **B)** ABA ($\mu\text{g/g}$ de matéria fresca) endógenos durante a germinação e conversão dos embriões zigóticos e somáticos de *A. sellowiana*.

Os teores de ABA endógenos durante a germinação dos embriões zigóticos e somáticos foram diferentes. Nos embriões somáticos, os teores de ABA endógenos no início da germinação foram baixos, aumentando mais de cinquenta vezes aos dez dias de germinação. Subsequentemente, o conteúdo de ABA decresceu até os vinte dias mantendo-se constante até o final da avaliação, correspondente ao período inicial de crescimento da plântula (Figura 3B). Já, nos embriões zigóticos, os teores de ABA apresentaram-se baixos no início da germinação, aumentando progressivamente até os 30 dias (Figura 3B).

DISCUSSÃO

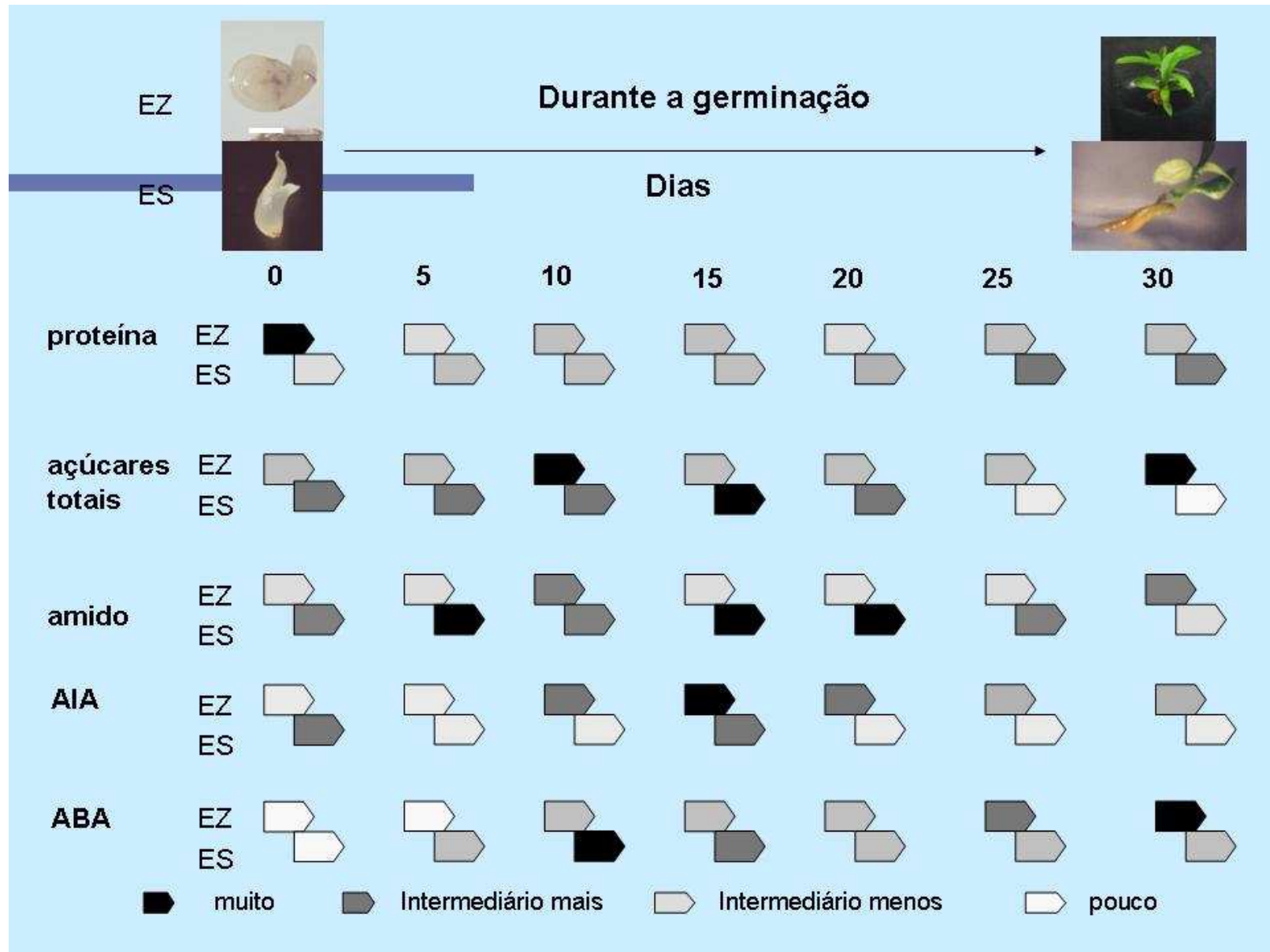
A. Proteína, amido e açúcares totais

No presente trabalho, os teores de proteínas durante a germinação do embrião zigótico foram relativamente constantes, mantendo-se em um patamar elevado. Mas nos cinco primeiros dias observou-se decréscimo do conteúdo de proteínas, o que sugere a mobilização das proteínas de reserva nos primeiros dias de germinação. Ressalta-se que os embriões zigóticos estavam sem seus tegumentos de proteção, uma vez que as sementes maduras foram embebidas em água por 12h. É provável que nesse período de 12h tenham sido ativadas diversas enzimas proteolíticas acentuando ainda mais a mobilização das proteínas aos tecidos em desenvolvimento.

A germinação é um evento que compreende uma série de reações químicas que permite o crescimento e desenvolvimento da planta. A primeira fase da utilização de reservas nitrogenadas envolve a hidrólise de proteínas a aminoácidos livres que são então transportados e incorporados ao desenvolvimento (BEEVERS e GUERNSEY, 1986). Em *Citrus limon*, a mobilização das proteínas de reserva começou aos 4 dias depois da embebição. O período principal da hidrólise ocorreu entre 8 e 24 dias do início da germinação (GARCÍA-AGUSTIN e PRIMO-MILLO, 1989).

Observações bioquímicas e ultraestruturais nas sementes de *Podocarpus henkelii* depois de 9 dias da escarificação sugerem que a transição entre a maturação e a germinação é caracterizada pela continuidade da atividade enzimática inicial e a inter-conversão das substâncias de reserva (DODD *et al.*, 1989). Em sementes de *Senna macranthera* a embebição causou alongamento do eixo embrionário com maior intensidade para aqueles embriões sem os tegumentos. Para

Figura 4: Resumo das mudanças bioquímicas durante a germinação do embrião zigótico e conversão do embrião somático de *A. sellowiana*.



a germinação da semente não se observou a mobilização de reservas armazenadas, como o amido, mas detectou-se aumento nos teores de açúcares redutores no eixo embrionário (LIMA E BORGES *et al.*, 2002).

Em sementes de *Gossypium hirsutum* observou-se redução no peso seco do embrião e consumo mais alto de lipídios, proteínas e carboidratos depois do oitavo dia de germinação (EL-NOCKRASHY *et al.*, 1974). Durante a germinação de sementes de *Cuscuta campestris*, o conteúdo de proteínas aumentou dentro das 48h de germinação e depois decresceu (CHARLES *et al.*, 1982). Nieves *et al.* (1998b) observaram que os teores das proteínas solúveis nos cotilédones das sementes de tangerina Cleópatra decresceram durante todo o processo de germinação. Por outro lado, sementes que não germinaram mostraram aumento no conteúdo de proteínas solúveis depois de 21 dias, quando a plântula começou a desenvolver.

No presente trabalho observou-se ao longo dos 15 primeiros dias a síntese de carboidratos nos embriões zigóticos germinados. Posteriormente a este período, as reservas de carboidratos estocadas nos cotilédones foram consumidas, para logo serem novamente sintetizadas. Neste caso a estocagem destas substâncias de reserva deveria ocorrer em diversos tecidos da planta. Como observado por Toyooka *et al.* (2001), os cotilédones das sementes de dicotiledôneas são folhas especializadas para armazenar substâncias de reserva, e eles mudam de órgãos senescentes a órgãos vegetativos entre o período de germinação da semente e o crescimento da plântula. Nas plantas, os açúcares estão associados às seguintes propriedades: recurso de carbono e energia, osmorreguladores, protetores do estresse e sinais moleculares. Em geral, os papéis dos sacarídeos solúveis são de difícil distinção sugerindo-se a existência de uma interconexão mutualista (LIPAVSKÁ e HANAKONRÁDOVÁ, 2004).

Stone e Gifford (1999) observaram que as sementes maduras de *Pinus taeda* tinham poucas reservas de carboidratos e que durante a germinação os teores de carboidratos no megagametófito e na plântula decresceram 80%. Observaram também que o megagametófito foi importante para o crescimento e nutrição da plântula e sua presença estimulou o acúmulo de sacarose durante o crescimento da plântula. Pelo contrário, na ausência do megagametófito, a plântula não conseguiu acumular carboidratos em nenhum tecido.

No presente trabalho, o meio de cultura onde foram induzidos os embriões somáticos de *A. sellowiana* foi suplementado com sacarose, assim como o meio onde estes embriões somáticos foram convertidos em plântulas. A fonte de carbono suplementada durante a indução e formação dos embriões somáticos gerou acúmulo deficiente de proteínas de reserva, do tipo 11S globulina (Seção IV, Capítulo 1), sugerindo que a síntese das proteínas embrionárias antecede a histodiferenciação dos embriões, como mencionado por Sung e Okimoto (1981). Por outro lado, as reservas de carboidratos foram observadas em teores maiores que as proteínas, como já observado em estudos anteriores (CANGAHUALA-INOCENTE, 2002; Seção III, Capítulo 2).

A sacarose é fonte de carbono mais comumente usada na cultura de tecidos vegetal, servindo de suporte para o crescimento das culturas *in vitro* (GEORGE, 1993). Seus efeitos durante a indução, manutenção e maturação dos embriões somáticos têm sido objeto de investigação por vários autores (TREMBLAY e TREMBLAY, 1991; SCHÜLLER e REUTHER, 1993).

No presente trabalho, durante a conversão dos embriões somáticos as concentrações de proteínas mostraram-se constantes. Ao contrário, as reservas de carboidratos foram mobilizadas, tanto para continuar sendo sintetizadas quanto para serem degradadas durante o crescimento da plântula. A conversão de embriões somáticos, assim como no desenvolvimento do embrião a plântula de *Picea abies*, a sacarose foi requerida em concentrações de 1% a 3,4%, mostrando que estes embriões somáticos não foram capazes de germinar autotroficamente. (GUPTA e GROB, 1995).

No presente trabalho, os teores de proteínas totais durante a germinação dos embriões zigóticos e somáticos foram similares, exceto no início da germinação. Isto revela que os embriões somáticos armazenam poucas proteínas de reserva, o que poderia ocorrer por vários fatores, entre eles as fontes e teores de N suplementado ao meio de cultura; o estresse provocado pelos fitorreguladores indutores, entre eles o 2,4-D; ou a ausência de uma fase de desidratação dos mesmos.

Durante o processo de desenvolvimento e maturação, quando ocorre a desidratação natural, as sementes acumulam tRNA e proteínas numa concentração relativamente alta e, por esta razão as proteínas encontradas foram denominadas de *'late embryogenesis abundant'* (LEA) (BEWLEY e BLACK, 1994). Por outro lado, foi

observado que os tRNA das proteínas LEA diminuíram durante o processo de germinação do milho e feijão (CAMPOS-ALVARES *et al.*, 2002).

No presente trabalho, o comportamento das substâncias de reserva durante a conversão dos embriões somáticos se mostrou parecido ao comportamento dos embriões zigóticos, com algumas diferenças. As concentrações de açúcares e de amido nos embriões somáticos foram maiores àquelas dos embriões zigóticos, o que poderia ser atribuído à suplementação de sacarose no meio de cultura durante o desenvolvimento dos mesmos.

Por outro lado, os teores de açúcares e amido aos 30 dias de germinação foram maiores no embrião zigótico, período no qual a plântula estaria armazenando essas substâncias nos demais tecidos para o crescimento inicial. Já, no embrião somático, essas mesmas substâncias decresceram significativamente, mostrando que não existe um acúmulo de açúcares e amido nos tecidos da plântula convertida, o que seria uma das causas prováveis pela baixa taxa de sobrevivência das plântulas derivadas de embriões somáticos desta mesma espécie, observada após 30 dias de germinação (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007).

A utilização de amido ou de açúcares solúveis é variável, dependendo da espécie, podendo ocorrer durante a germinação ou na fase inicial de desenvolvimento da plântula (PONTES *et al.*, 2002). Nas sementes de *Apuleia leiocarpa* quantificou-se a mobilização de reservas no eixo embrionário, nos cotilédones e no tegumento durante a germinação, observando-se um aumento significativo nos teores de amido, ácido esteárico e proteínas nos cotilédones durante o processo de embebição (PONTES *et al.*, 2002).

Nossos resultados comparativos sugerem que a baixa taxa de germinação dos embriões somáticos não se deveu à falta de acúmulo de substâncias de reserva, já que, como citado, os mesmos ocorrem em significativas concentrações e sim por uma possível qualidade deficiente das substâncias de reserva tais como proteínas, açúcares, amido e lipídeos. Outras possibilidades incluem a mobilização inadequada dessas substâncias dos cotilédones ao eixo embrionário, a inibição de enzimas e hormônios endógenos envolvidos no processo de germinação, ou a ausência de uma fase de dessecação, semelhante àquela que ocorre nos embriões zigóticos. Normalmente, a falta de acúmulo de reservas durante a fase de maturação do embrião somático e ausência de sua mobilização é reportada como a maior causa

da baixa taxa de conversão dos embriões ou ao deficiente estabelecimento das plântulas de *Camellia sinensis* na fase inicial (MONDAL *et al.*, 2002).

B. AIA e ABA

No presente trabalho, o mais alto conteúdo de AIA nos embriões zigóticos de *A. sellowiana* aconteceu aos 15 dias de germinação, período que antecedeu o crescimento da plântula. Resultados similares foram observados nas sementes de *Lycopersicon esculentum*, detectando-se alto conteúdo de AIA na fase que precedeu a alongação dos tecidos, seguida de um declínio progressivo concomitante ao acúmulo de substâncias de reserva e prosseguindo com um incremento progressivo dos teores de ABA (HOCHER *et al.*, 1992).

O AIA é um hormônio vegetal que controla o crescimento e o desenvolvimento da planta (GARZAYAN *et al.*, 1999). Altos teores de AIA são associados com a alongação celular nas fases de crescimento da semente e do fruto (CLELAND, 1995). Na célula vegetal somente 5% do AIA encontra-se livre na forma ativa (COHEN e BANDURSKI, 1982). O resto do AIA é armazenado como conjugado que é liberado na forma livre quando a célula assim o demanda (BIALEK *et al.*, 1992). O AIA conjugado serve como fonte de auxina durante o processo inicial da germinação (EPSTEIN *et al.*, 1980) e poderia mobilizar-se ou hidrolisar em respostas aos câmbios ambientais e de desenvolvimento (BARTEL, 1997).

No presente trabalho, na germinação do embrião somático, aos 15 dias, o conteúdo de AIA endógeno foi alto e similar aos valores observados no AIA inicial. Este alto conteúdo de AIA endógeno registrado nos embriões somáticos antes da germinação poderia ser resultado da síntese de altos teores de triptofano (Trp) nos últimos estádios de desenvolvimento, como mostrado na Seção III, Capítulo 2. O Trp é considerado o principal precursor do AIA (BANDURSKI *et al.*, 1995). Em *Araucaria angustifolia* durante o desenvolvimento da semente a concentração de Trp variou inversamente com o AIA livre e diretamente com o AIA conjugado (ASTARITA *et al.*, 2003c).

Outro hormônio que afeta o desenvolvimento da semente é o ABA. No presente trabalho, os teores de ABA nos embriões zigóticos no início da germinação apresentaram-se baixos e inversamente proporcionais aos teores de AIA endógena, coincidindo com o padrão de comportamento destes hormônios na semente, onde os teores de AIA são inversamente proporcionais aos de ABA, cujos teores declinam

drasticamente na semente madura antes da germinação (HOCHER *et al.*, 1992; BEWLEY e BLACK, 1994).

Nos embriões somáticos o ABA promove o acúmulo de substâncias de reserva necessárias para um alto vigor (FUJII *et al.*, 1990; SREEDHAR E BEWLEY 1998). No presente trabalho, os teores de ABA durante a conversão dos embriões somáticos foram diferentes do padrão observado durante a germinação do embrião zigóticos. Estes teores foram, contudo, inversamente proporcionais ao teor de AIA. O ABA é um importante hormônio vegetal e associado à regulação de características importantes do desenvolvimento da planta, incluindo a síntese de proteínas de reserva e lipídios, e a tolerância à dessecação da semente e dormência (LEUNG e GIRAUDAT, 1998; ROCK, 2000; ROHDE *et al.*, 2000).

Os efeitos do ABA na germinação também são antagônicos aos das giberelinas, do etileno e dos brassinosteróides (FINKELSTEIN *et al.*, 2002). Em *Medicago sativa*, a suplementação de ABA ao meio de cultura durante a maturação dos embriões somáticos levou a um maior acúmulo do ABA endógeno, de tal forma que inibiu ou retardou a conversão dos mesmos em plântulas (KĘPCZYŃSKA e ZIELIŃSKA, 2006).

Conclusões

No presente trabalho foi gerado informações relevantes sobre as mudanças bioquímicas e fisiológicas ocorridas durante a germinação e conversão dos embriões zigóticos e somáticos de *A. sellowiana*. Foram detectadas variações no conteúdo endógeno de açúcares e amido durante a germinação do embrião zigótico, observando-se que as principais substâncias de reserva mobilizadas durante este processo foram carboidratos, amido e açúcares, enquanto que os teores de proteínas mostraram-se estáveis. O padrão de síntese e degradação de proteínas e carboidratos durante a conversão dos embriões somáticos guardou um paralelo com o padrão observado durante a germinação do embrião zigótico. Para os hormônios endógenos AIA e ABA observaram-se diferenças nos padrões de síntese e degradação entre embriões somáticos e zigóticos, revelando que um dos fatores para a baixa taxa de germinação dos embriões somáticos é o alto conteúdo de ABA endógeno a partir do décimo dia de germinação, provavelmente inibindo a ação das giberelinas e essa a sua vez afetando negativamente a ação da α -amilase para a mobilização do amido. Estas informações conduzem a um melhor entendimento das

alterações bioquímicas e fisiológicas relacionadas com a síntese e acumulação de proteínas, carboidratos e hormônios endógenos nos embriões de *A. sellowiana* e permitem o ajuste das composições dos meios de cultura visando uma melhor eficiência dos protocolos de embriogênese somática.

SEÇÃO IV

Análise proteômica da
embriogênese somática da
goiabeira serrana

Resumo:

Nesta seção, estudaram-se as proteínas expressas em embriões somáticos de *A. sellowiana* em diferentes estádios de desenvolvimento. O objetivo foi detectar e identificar proteínas diferencialmente expressas durante os diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático. Usando a alta resolução do gel bidimensional de poliacrilamida (2-DE) observaram-se diferenças entre as proteínas expressas nos estádios iniciais e similaridade entre as proteínas expressas nos últimos estádios. Foram detectadas 29, 32, 51, 61 e 57 proteínas para o estágio globular, cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar, respectivamente. Das 230 proteínas visualizadas por 2-DE, 62 foram identificadas por MALDI TOF/MS. Quatro proteínas foram expressas unicamente no estágio globular, uma no estágio cordiforme, duas no estágio torpedo e quatro no estágio pré-cotiledonar. As proteínas identificadas nos diferentes estádios da embriogênese somática foram agrupadas nas seguintes categorias: metabolismo de carboidratos, biossíntese de purinas, divisão celular, metabolismo secundário, reserva, chaperonas, formação e transporte celular. Os estudos de proteoma com esta espécie são inéditos e permitem avançar no conhecimento do metabolismo embrionário desta espécie, bem como possibilitam uma adequação dos protocolos de embriogênese somática visando sua propagação massal e conservação.

Abstract

In this section it was studied the expressed proteins in different developmental stages of *A. sellowiana* somatic embryos. The aim was to detect and identify differentially expressed proteins during different developmental stages of somatic embryos. Using the high resolution 2-DE it was observed differences among the expressed proteins in the initials stages and similarities among the proteins observed in the late developmental stages. It was detected 29, 32, 51, 61, and 57 proteins in the globular, heart, torpedo, pre-cotyledonary and cotyledonary stages. Out of 230 proteins, 62 were identified by MALDI TOF/MS. Four proteins were expressed solely in globular staged somatic embryos, one in the heart stage, two in the torpedo, and four in the pre-cotyledonary stage. The proteins identified in the different developmental stages were grouped in the following categories: proteins of carbohydrate metabolism, biosynthesis of purines, cell division, secondary metabolism, storage, chaperones, formation and cell transport. The proteomic studies in this species are innovative and the results here obtained allow the advancement in the knowledge of protein metabolism during the embryony development and generated relevant information on the optimization of culture media composition for somatic embryogenesis.

Capítulo 1: Obtenção dos mapas protéicos nos estádios de desenvolvimento do embrião somático de *Acca sellowiana*.

INTRODUÇÃO

Os estudos proteômicos buscam analisar o perfil das proteínas totais de células específicas, organelas ou tecidos (BLACKSTOCK E WEIR, 1999). A proteômica permite avaliar várias propriedades das proteínas, tais como o perfil das modificações pós-tradução ou a interação com outras biomoléculas. Um dos objetivos dos estudos contemporâneos é a caracterização das diferenças entre os teores de expressão das proteínas em diferentes tecidos (FITZGERALD, 2001).

Na expressão proteômica as proteínas de células específicas são separadas e quantificadas e assim identificadas e caracterizadas. O gel de eletroforese de poli(acrilamida) bidimensional (2-DE) é a ferramenta usada para separar proteínas em expressão proteômica. Na 2-DE, o enfoque isoelétrico (IEF) é usado para separar proteínas na primeira dimensão em base a seu ponto isoelétrico. As proteínas são separadas com base em seu peso molecular por meio do gel de eletroforese de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). Em alguns protocolos experimentais, 2-DE é usada para decompor as proteínas extraídas de uma célula completa ou uma amostra de tecido. Em outros casos, as proteínas são pré-fracionadas, antes do 2-DE, baseado nas suas características físico-químicas (solubilidade ou massa molecular) ou propriedades biológicas (ligação com seus anticorpos ou distribuição subcelular). A visualização das proteínas é geralmente feita por o corante Coomassie Brillante Blue, nitrato de prata, radioatividade ou por fluorescência (FITZGERALD, 2001).

A embriogênese somática é uma das principais técnicas de cultura *in vitro* na qual uma célula isolada ou um pequeno grupo de células somáticas são os precursores dos embriões (TAUTORUS *et al.*, 1991). Nos últimos anos foram estabelecidos avanços no desenvolvimento de protocolos visando à indução e controle desta rota morfogênica *in vitro* para plantas perenes tais como, *Carya illinoensis* (RODRIGUEZ E WETZSTEIN, 1998) *Eucalyptus nitens* (BANDYOPADHYAY E HAMILL 2000), *Holostemma adakodien* (MARTIN, 2003), *Ocotea catharinensis* (MOSER *et al.*, 2004), entre outras espécies.

Embora tenham ocorrido avanços notáveis na elucidação dos mecanismos associados à modulação de sistemas embriogênicos ainda é limitada à

compreensão sobre os marcadores associados aos pontos críticos deste processo. Estudos básicos do metabolismo celular durante a embriogênese zigótica e somática de *Acca sellowiana*, a partir da reconstituição *in vitro* dos eventos fisiológicos e bioquímicos envolvidos podem permitir a elucidação dos pontos de controle desta rota morfogênica *in vitro*.

Dupire *et al.* (1999) utilizando a 2-DE analisaram as proteínas expressadas nas culturas embriogênicas de tecidos mutantes e de tipos selvagens de *Asparagus officinalis* L., classificando 116 proteínas em 20 grupos potencialmente relacionados com a embriogênese somática. Seis polipeptídeos foram específicos para o tipo mutante e poderiam estar relacionados com a competência dos tecidos à embriogênese somática. Onze proteínas foram detectadas especificamente nos tecidos do tipo selvagens e sua presença poderia estar relacionada com a inibição da embriogênese somática.

O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar proteínas expressadas ao longo dos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *Acca sellowiana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Para a obtenção dos embriões somáticos foram utilizadas sementes maduras do acesso 101 x 458 de *Acca sellowiana*. Depois de isolados com o auxílio de um estereomicroscópio, os embriões zigóticos foram inoculados em tubos de ensaio (22 x 150 mm) contendo 10mL do meio de cultura LPmM (Seção II, Capítulo 1), 3% maltose, 20 μ M 2,4-D e 8mM Glu. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e geleificado com ágar (0,7%) de acordo com a metodologia de Cangahuala-Inocente *et al.* (2007). As culturas foram incubadas no escuro a 25 \pm 1°C.

No 70^o dia de incubação, foi feita a coleta de embriões nas diferentes fases de desenvolvimento: globular, cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar. Todo o material coletado foi estocado a -20°C.

Protocolos de extração compatíveis com a 2DGE de proteínas.

TCA precipitação

O protocolo de extração por tricloroacético (TCA) / precipitação foi baseado na metodologia de Damerval *et al.* (1986) com algumas modificações. O material

fresco (300 mg) foi macerado no cadinho com nitrogênio líquido. O homogeneizado foi precipitado *overnight* com 2ml de acetona/20% TCA/0,2% DTT (-20°C). Depois centrifugado a 16000 x g por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado duas vezes com acetona gelada/0,2% DTT. No intervalo das lavagens as amostras foram incubadas por 60 min a -20°C. O precipitado foi seco em temperatura ambiente, ressuspendido em 100 µL de tampão lise (7M uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 0,8% *IPG-buffer*, 1% DTT) e homogeneizado no vortex por 1h a temperatura ambiente.

Fenol extração metanol / precipitação acetato de amônio

O material coletado (300mg) foi macerado com nitrogênio líquido e em seguida ressuspendido em 500 µL de Tampão de extração gelado [50 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 mM EDTA, 100 mM KCl, 1% (w/v) DTT, 30% (w/v) sacarose e um inibidor de protease (Protease inhibitor Mix 80-6501-23 GE Healthcare)] e homogeneizado em vortex por 30 s. Adicionou-se 500µL de fenol tamponado com Tris gelado (pH 8,0) e incubou-se o material por 15 min a 4°C. Depois da centrifugação (3 min, 8000 rpm 4°C) a fase fenólica (orgânica) foi coletada e o precipitado novamente re-extraído com 500µL do tampão de extração e homogeneizado por 30 s. Depois da centrifugação (3 min, 8000 rpm, 4°C) a fase fenólica foi coletada e adicionado à coleta anterior para ser precipitada durante a noite com cinco volumes de 100 mM acetato de amônio em metanol a -20°C. Depois da precipitação, o precipitado foi seco no ambiente, ressuspendido em 100µL de tampão de lise (7M uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 0,8% IPG-Buffer, 1% DTT) e homogeneizado no vortex por 1h a temperatura ambiente.

Quantificação de proteína

As proteínas extraídas foram quantificadas segundo o método de Bradford (1976) utilizando-se a albumina de soro bovino como padrão.

Eletroforese bidimensional (2DGE) de proteínas

O volume correspondente a 100 µg de proteína foi retirado e as proteínas foram fracionadas com acetona usando o Kit 2-D Clean Up (Amersham Biosciences).

A eletroforese bidimensional foi realizada como foi descrito por Carpenter *et al.* (2005). As amostras foram ressuspensas no tampão de reidratação (6 M Ureia, 2 M tiouréia, 0,5% CHAPS, 10% glicerol, 0,002% de azul de bromofenol, 0,5% *IPG-Buffer*, 0.28% DTT) em 125 µL para as tiras desidratadas (IPG Drystrip) de 7cm pH 3 – 10 por 12hrs. As tiras hidratadas foram carregadas no Multiphor II (Amersham Biosciences) a 20°C com um limite de corrente de 1mA/strip: 0:01h a 500V, 1:30h a 3500V, 9:00h a 3500V em gradiente, totalizando 31.5 kVh a 3500V.

Na análise da segunda dimensão as tiras individualmente foram tratadas por 15 min em 10 ml de solução de equilíbrio (6 M uréia, 30% glicerol 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 50 mM Tris pH 8.8) contendo 1% (w/v) de DTT e seguido por 15 min de 10ml do tampão de equilíbrio contendo 4,5% (w/v) iodoacetamida. A separação da segunda dimensão foi realizada no sistema MINI PROTEAN (BioRad) com gel de poliacrilamida SDS 12%, 1,5mm de espessura a 15mA/gel por 15min e 30mA/gel por 90min. Utilizou-se um marcador protéico padrão de peso molecular conhecido (Precision Plus Protein Standards) 10 a 250 kD (BioRad).

Visualização das proteínas

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R250 por 12h e descorados com 45% ácido acético em 45% etanol. Os géis corados foram armazenados em ácido acético 1% a temperatura de 4°C.

Análise dos géis

Os géis corados foram digitalizados com ImageScanner II e calibrados com Labscan 5 software (Amersham Biosciences). As análises de imagem foram realizadas com Image Master 2-D Platinum (Amersham Biosciences). A detecção dos spots foi realizada pelo programa e quando requerido foram editados. Os spots foram quantificados usando o % de volume. Somente os spots que foram reproduzidos nas três replicatas biológicas foram incluídos nas análises seguintes. Nas comparações pareadas dos proteomas dos tecidos diferentes, observou-se a abundância relativa das diversas proteínas.

RESULTADOS

A. Estádios de desenvolvimento da embriogênese de *A. sellowiana*

O protocolo descrito por Cangahuala-Inocente *et al.* (2007) foi eficiente para a produção de embriões somáticos sobre a superfície cotiledonar dos embriões zigóticos (Figura 1a). Aos 70 dias de cultivo no meio de indução foram observados todos os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos: globular (Figura 1b), cordiforme (Figura 1d), torpedo (Figura 1f), pré-cotiledonar (Figura 1h) e cotiledonar (Figura 1j).

As avaliações histológicas revelaram características morfológicas típicas de cada estágio (Figura 1). No estágio globular observou-se a formação de uma camada protodérmica bem definida e a presença de células isodiamétricas com citoplasma denso e núcleo central (Figura 1c). No estágio cordiforme observou-se uma depressão na camada protodérmica, definindo a região apical caulinar (Figura 1e). No estágio torpedo observou-se as regiões apical caulinar e radicular, assim como a presença de fileiras centrais de células relacionados ao procâmbio (figura 1g). O estágio pré-cotiledonar não sofreu maiores modificações morfológicas, a não ser um maior alongamento e a definição das folhas cotiledonares (Figura 1i). Por último, no estágio cotiledonar os embriões apresentavam-se completos com as folhas cotiledonares expandidas (Figura 1j). As células dos cotilédones eram diferentes daquelas observadas no corpo do embrião e mostravam acúmulo de corpos protéicos e poucos grãos de amido (Dados não mostrados).

B. Protocolos de extração compatíveis com a 2DGE de proteínas.

Para a determinação do melhor método de extração foram utilizadas amostras de embriões zigóticos do acesso 101x458 coletados em 2003. A quantificação realizada pela metodologia de Bradford não revelou diferença na quantidade de proteína extraída pelos dois métodos, assim observou-se que o método de extração por TCA/acetona deu 6,9 $\mu\text{g/g}$ de proteína e o a extração por Fenol deu 6,2 $\mu\text{g/g}$ de proteína. Observou-se também que as quantidades de proteínas extraídas por esses dois métodos foram superiores às extraídas por etanol (protocolo descrito na extração de proteínas totais, Seção III).

Figura 1: Embriogênese somática de *Acca sellowiana*. **A)** Embriões somáticos sobre os cotilédones expandidos do embrião zigótico. **B, C)** embrião somático no estágio globular; **D, E)** embrião somático no estágio cordiforme; **F, G)** embrião somático no estágio torpedo; **H, I)** embrião somático no estágio pré-cotiledonar e **J)** embrião somático no estágio cotiledonar.

B, D, F, H e J: Estádios de desenvolvimento *in vivo* do embrião somático.

C, E, G e I: Seções histológicas dos estádios de desenvolvimento do embrião somático.

C e G: Seções histológicas coradas com o reativo de Shiff;

E: Seção histológica corada com azul brilhante de Coomassie;

I: Seção histológica corada com azul de toluidina.

Bar: 1mm



O gel de poliacrilamida SDS 12% mostrou que o método de extração por fenol revelou proteínas mais limpas com bandas mais definidas que as obtidas por meio de TCA/acetona (Figura 2). A coloração como Coomassie mostrou-se adequada para a concentração de 100 µg de proteína, assim como para quantidades 10 vezes menores (Figura 2).

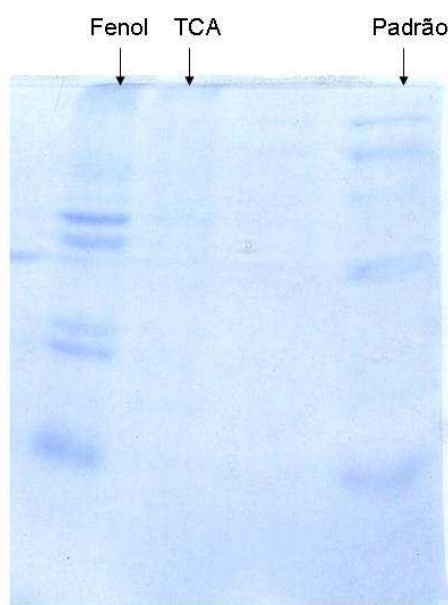


Figura 2: Gel unidimensional de poliacrilamida SDS 12% com os dois métodos de extração fenol e TCA/acetona.

C. Similaridade e diferença entre os estádios de desenvolvimento

A complexidade celular crescente dos embriões em vias de desenvolvimento foi claramente evidenciada em nível molecular. A quantificação de proteína nos estádios revelou 2,9 vezes mais de proteína total, baseado na matéria fresca entre os estádios globular e cotiledonar (Figura 3).

Por meio do gel unidimensional SDS 12% foram observadas bandas definidas e limpas para cada estágio de desenvolvimento (Figura 4). A expressão de cada conjunto de proteínas foi diferente para cada estágio, observando-se maior expressão na maioria nos estádios tardios.

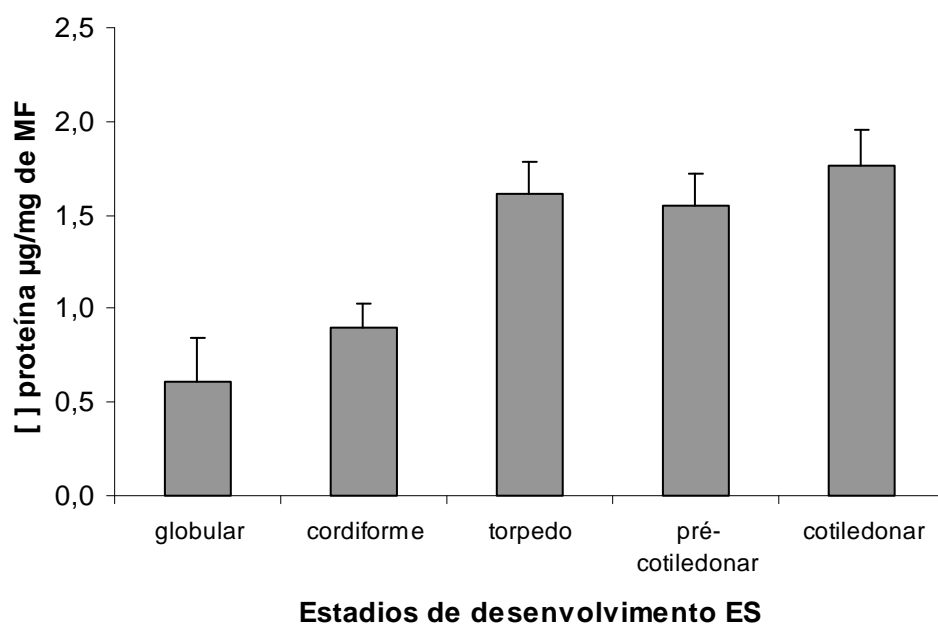


Figura 3. Proteínas totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MF) ao longo de diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático (ES) do acesso 101x458 de *A. sellowiana* segundo a metodologia de Bradford.

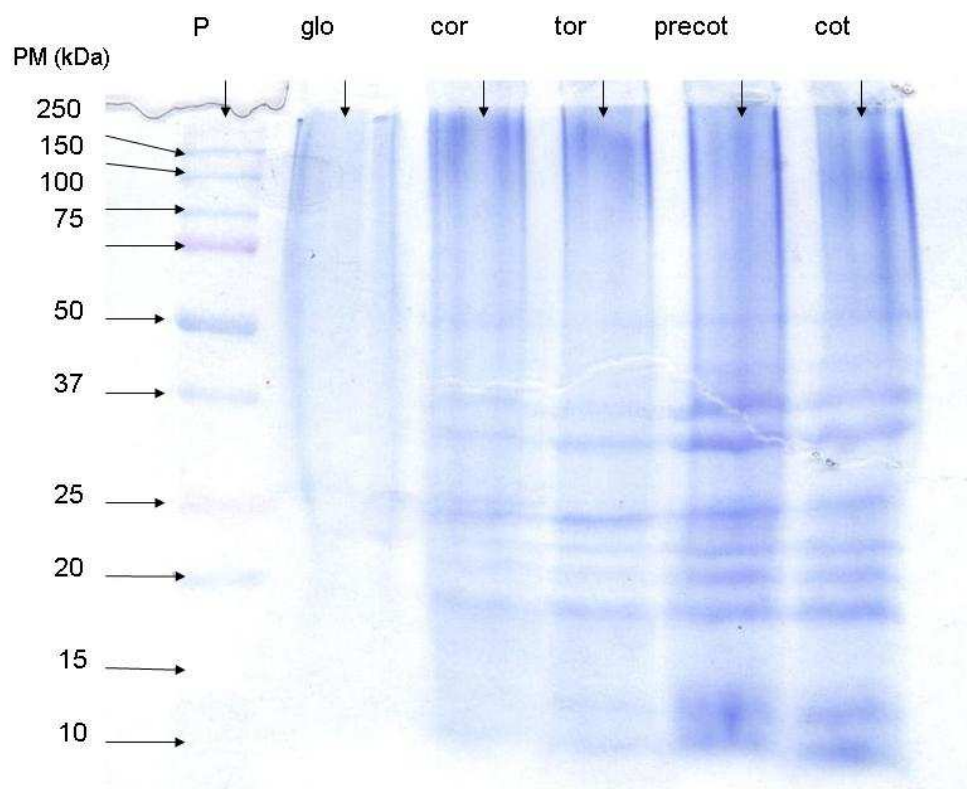


Figura 4: Estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana* em gel unidimensional de poliacrilamida SDS 12% extraídos pelo método de fenol.

Por esta metodologia não foi possível diferenciar as proteínas características de cada estágio já que as mesmas foram somente separadas por seu peso molecular. O passo seguinte foi separá-las por seu ponto isoelétrico por meio da eletroforese bidimensional.

Os géis 2DE detectaram 29, 32, 51, 61 e 57 spots para os estágios globular, cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar, respectivamente (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9). No total foram detectados 230 spots entre todos os géis, na escala de pI experimental de 4-10, sendo observadas mais proteínas ácidas, destacando-se o intervalo de 5-7 (58,9%) (Figura 10A). Observou-se também que os embriões somáticos nos diferentes estágios de desenvolvimento apresentaram pesos moleculares baixos (entre 20-40 kDa), representando 50% das proteínas detectadas (Figura 10B).

A análise dos embriões somáticos maduros por 2DE mostrou um aumento no número total de proteínas distintas, bem como na expressão das proteínas que poderiam estar envolvidas com o desenvolvimento e maturidade dos embriões (Figura 11). Assim, foi possível observar regiões em que a expressão da proteína foi mais intensa em determinados estágios (círculo vermelho), outras regiões que apareceram a partir de um determinado estágio (círculo azul), bem como spots únicos para cada estágio (setas pretas) ou spots diferenciais para um estágio específico (setas laranja) (Figura 11).

Quantificando os spots com maior intensidade estimou-se que as proteínas mais abundantes para o estágio globular, cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar corresponderam a 26%, 29%, 38%, 36% e 32% respectivamente das proteínas totais extraídas nos embriões somáticos. Como as amostras iniciais foram igualadas na mesma concentração de proteína total aplicada no gel, a presença de poucas proteínas expressadas fortemente teria o efeito adverso de reduzir a intensidade do sinal total no resto do gel.

Observações dos géis 2DE dos embriões somáticos mostraram que houve aumento concomitante à progressão nos estágios de desenvolvimento dos mesmos, sugerindo que as mesmas poderiam estar envolvidas com o desenvolvimento dos embriões. Das 230 proteínas detectadas entre todos os estágios, 90 proteínas foram analisadas. Assim, observou-se que as proteínas apresentaram padrões diversos de comportamento de sua expressão ao longo dos estágios de desenvolvimento.

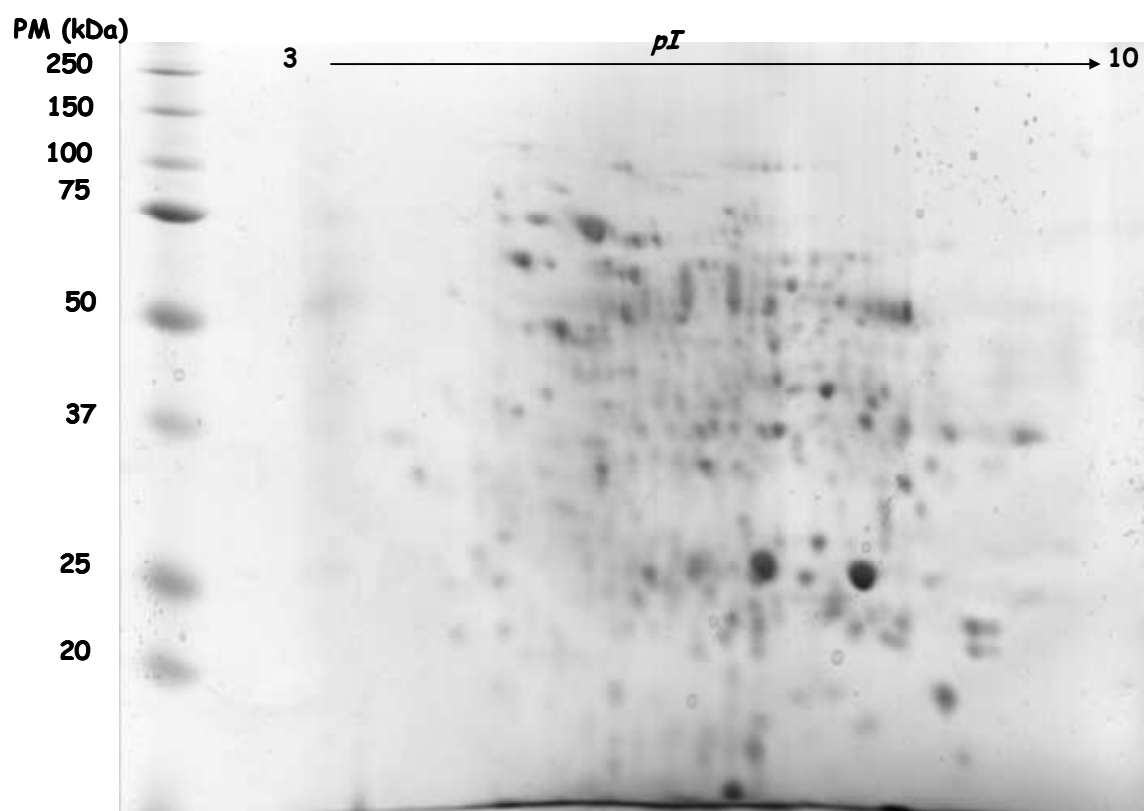


Figura 5: Gel 2-D do estágio globular do embrião somático de *A. sellowiana* mostrando os 47 spot detectados entre as três repetições feitas.

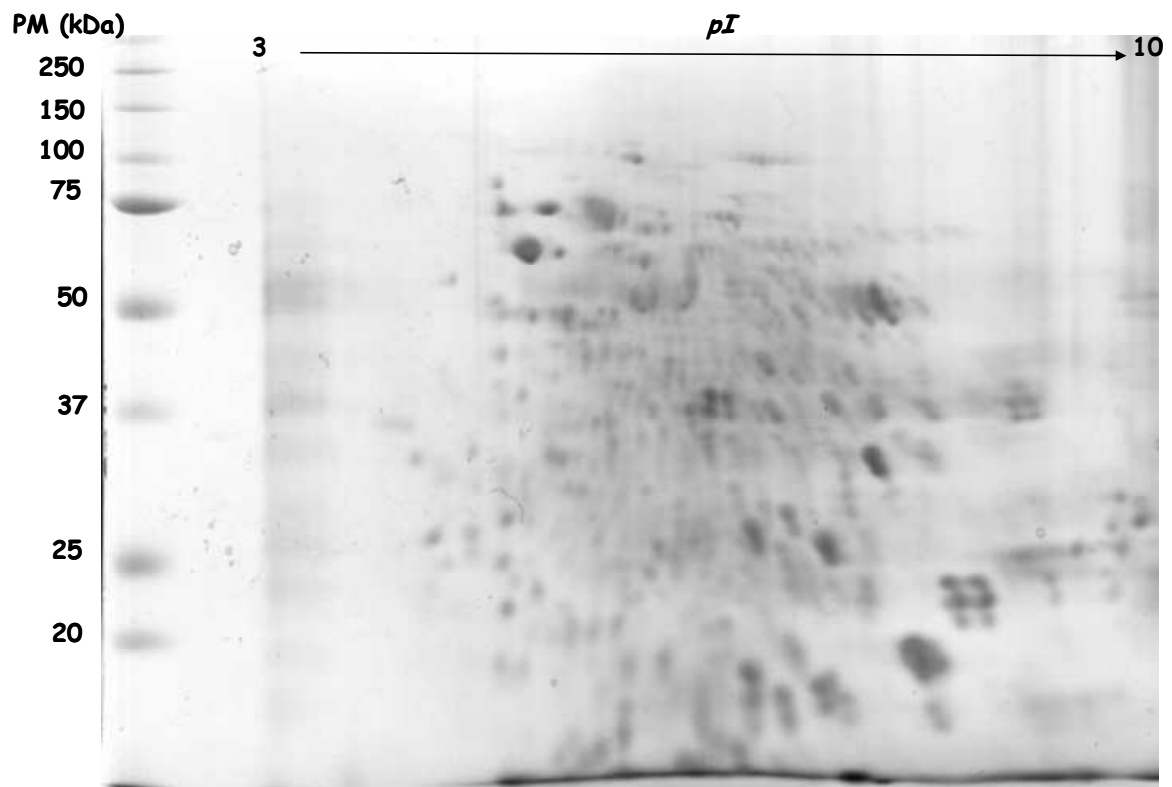


Figura 6: Gel 2-D do estágio cordiforme do embrião somático de *A. sellowiana* mostrando os 50 spot detectados entre as três repetições feitas.

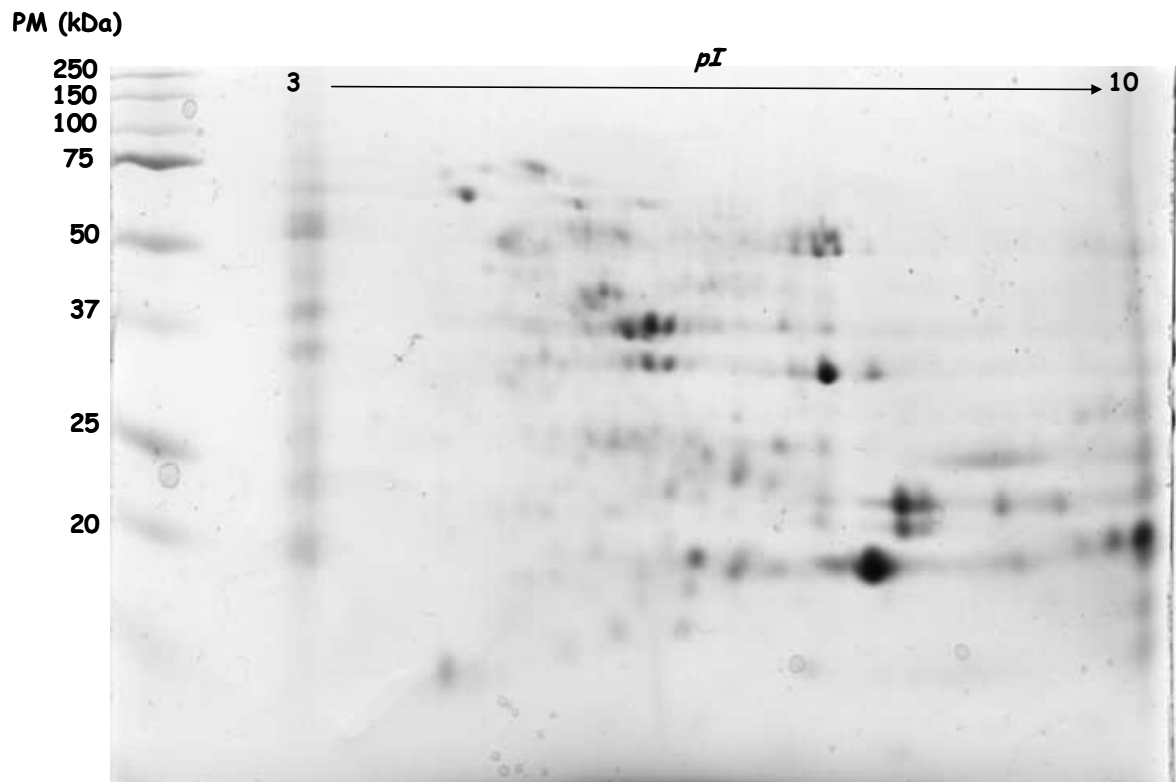


Figura 7: Gel 2-D do estágio torpedo do embrião somático de *A. sellowiana* mostrando os 43 spot detectados entre as três repetições feitas.

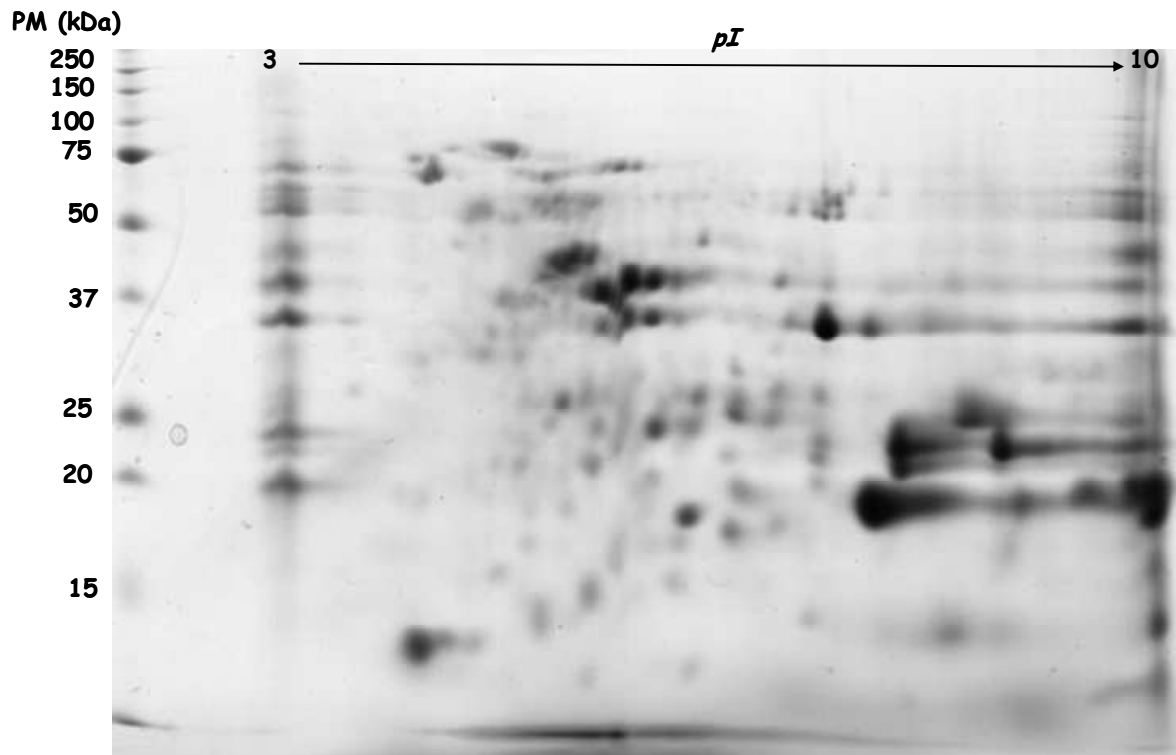


Figura 8: Gel 2-D do estágio pré-cotiledonar do embrião somático de *A. sellowiana* mostrando os 48 spot detectados entre as três repetições feitas.

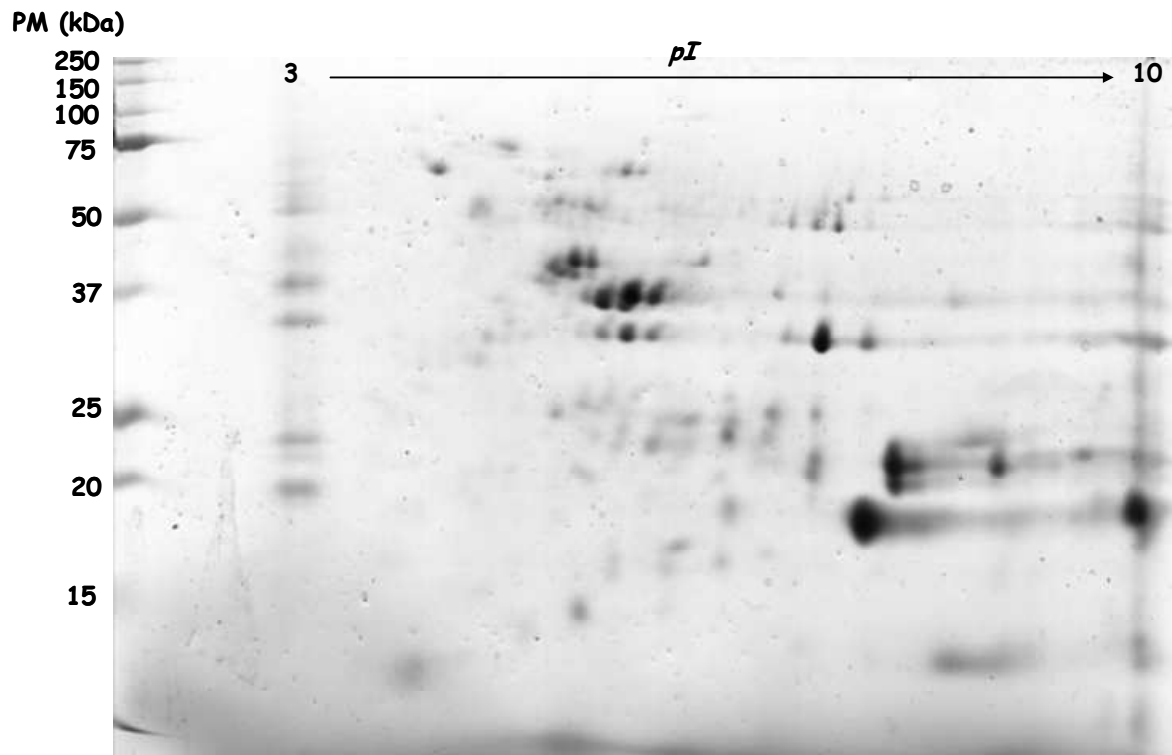


Figura 9: Gel 2-D do estágio cotiledonar do embrião somático de *A. sellowiana* mostrando os 28 spot detectados entre as três repetições feitas.

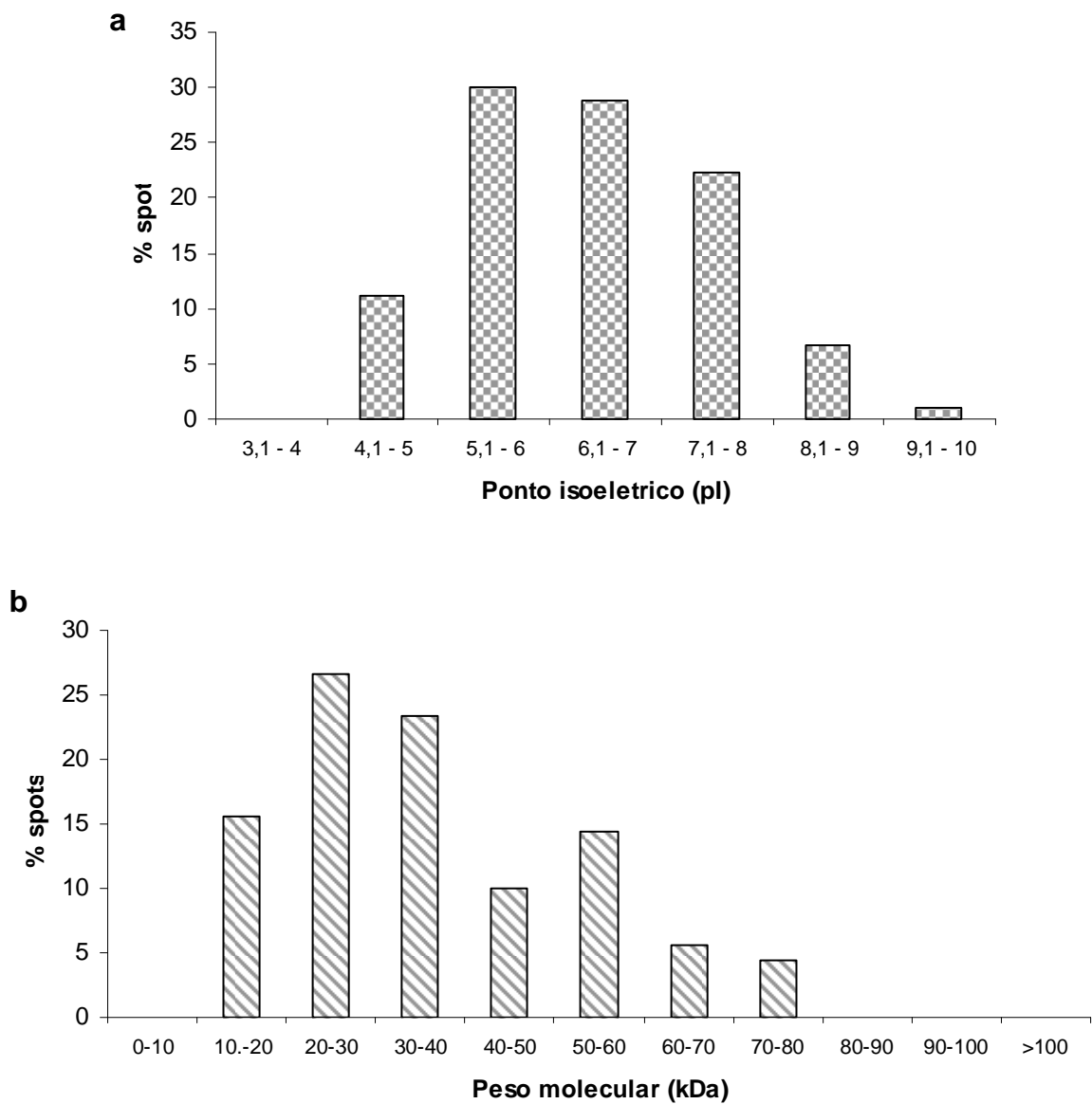


Figura 10: Distribuição dos pI e PM das proteínas detectadas nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*.

Foram identificadas quatro formas de expressão: a) spots que diminuiram sua expressão paralelamente a evolução dos embriões somáticos (grupo 1); b) spots que aumentaram sua expressão conjuntamente com o desenvolvimento do embrião (grupo 2); c) spots que se mantiveram constantes ao longo dos estádios de desenvolvimento (grupo 3); e d) spots que variaram sua expressão

preferencialmente a favor de um estágio, quando comparado entre três ou mais estádios (grupo 4).

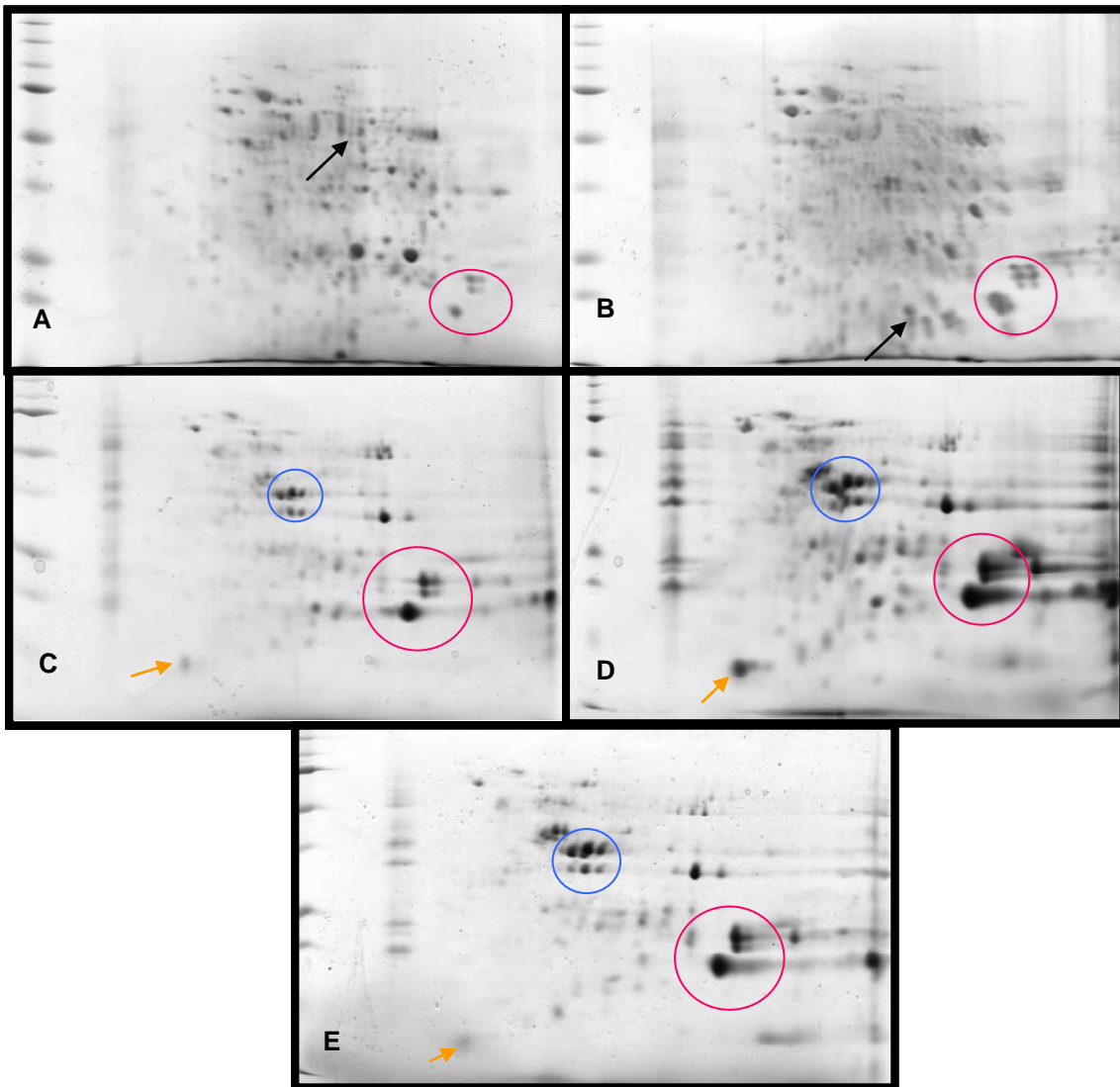
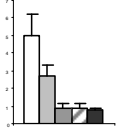
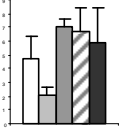
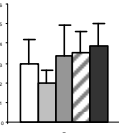
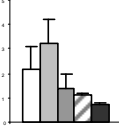
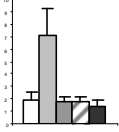
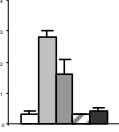


Figura 11: Spot e regiões diferenciais nos estádios de desenvolvimento do embrião somático. **A)** estágio globular, **B)** estágio cordiforme, **C)** estágio torpedo, **D)** estágio pré-cotiledonar e **E)** estágio cotiledonar.

Desta maneira foram detectadas 12 proteínas expressadas nos cinco estádios de desenvolvimento (Tabela 1), das quais cinco spots apresentaram sua expressão maior a 5% do volume normalizado. A maioria destes spots apresentou sua expressão no estágio torpedo. O spot P apresentou sua maior expressão no estágio globular, diminuindo de acordo a evolução dos embriões (pertencente ao grupo 1). Ao contrario, o spot O (grupo 2) aumentou sua expressão concomitantemente à progressão nos estádios de desenvolvimento dos embriões.

Tabela 1: Spots localizados entre os cinco estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*. Globular , Cordiforme ■, Torpedo ■, Pré-cotiledonar □, Cotiledonar ■





letra	Spot ^a	PMe	ple	%sig	PMt	plt	%volume	identificador	% cobertura	N° matches	nome	espéc
A	4t	72	4,9	33	70	6,2		Q9LDF1_ARATH	10	4	Limonene cyclase (1,8-cineole synthase)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
B	7p	69	4,4	35	62	5,8		Q2HTG9_MEDTR	10	3	Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase PfpB	<i>Medicago truncatula</i>
G	11t	51	4,7	44	51	6,4		Q9FHQ0_ARATH	15	4	Calmodulin-binding heat-shock protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>
K	27ct	37	5,8	39	40	5,5		T10963 / P52424	12	4	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase, (Precursor)	<i>Vigna unguiculata</i>
N	32T	32	7,3	24	35	8,6		S05426	11	2	Endochitinase precursor	<i>Solanum tuberosum</i>
O	31p	34	7,8	35	38	6,8		Q5EAF0_ARATH	13	4	At5g20450	<i>Arabidopsis thaliana</i>

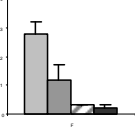
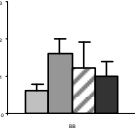
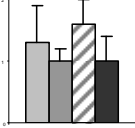
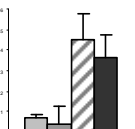
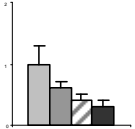
P	44c	25	6,9	30	26	5,2		S25538 / P35512	21	3	Phenylalanine ammonia-lyase (fragment)	<i>Malus domestica</i>
S	40t	22	7,9	32	18	8,4		S22496 / P35627	19	2	peptidylprolyl isomerase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
T	45p	22	8,0	34	18	8,4		S22496 / P35627	24	3	peptidylprolyl isomerase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
U	45t	19	6,2	23	22	6,6		Q1RW78_MEDTR	17	2	TdcA1-ORF2-related	<i>Medicago truncatula</i>
V	46t	18	7,7	10	19	7,6		Q5VNW3_ORYSA	5	1	Hypothetical protein P0039G05.27	<i>Oryza sativa</i>
AH	66p	18	7,5	37	18	8,5		T46110 / Q9H2N6_ARATH	21	3	Hypothetical protein T27B3.30	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Onze proteínas foram expressas em quatro estádios: cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar (Tabela 2). O maior volume de expressão foi do spot L no estágio pré-cotiledonar. Três proteínas diminuíram sua expressão de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento dos embriões, não sendo expressas no embrião globular e começando sua expressão a partir do estágio cordiforme (spot F, R e W). Ao contrário, o spot AT começaram sua expressão no estágio cordiforme, aumentando continuamente até o estágio cotiledonar, localizado no grupo 2.

Poucas proteínas foram exclusivamente expressas nos estádios iniciais até o estágio intermediário (torpedo) em relação aos estádios mais tardios (Tabela 3). Assim, somente três proteínas foram observadas no estágio globular, cordiforme e torpedo. Duas delas apresentaram maior expressão no estágio globular diminuindo até o estágio torpedo e a outra foi expressa em maior volume no estágio cordiforme. Nos estádios cordiforme, torpedo e pré-cotiledonar observou-se somente uma proteína expressa em maior volume no estágio cordiforme, diminuindo sua expressão nos estádios seguintes (Tabela 3).

Nos estádios maduros, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar (embriões somáticos com o eixo ápice-radícula bem definida e formação dos cotilédones), foram observadas mais proteínas expressas em relação aos estádios anteriores num total de 21 proteínas (Tabela 4). Aqui foram observados com maior clareza esses quatro grupos descritos anteriormente. Assim, cinco proteínas foram localizadas no grupo 1 as quais foram expressas a partir do estágio torpedo em intensidade maior e diminuindo posteriormente (ex. spot M). Quatro proteínas foram localizadas no grupo 2, as quais começaram sua expressão a partir do estágio torpedo e cuja intensidade aumentou de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento dos embriões (ex. spot J). Somente uma proteína foi localizada no grupo 3, o spot BE, esta proteína se manteve constante nos estádios torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar. Por último, onze proteínas foram localizadas no grupo 4, as quais apresentaram expressão diferencial, podendo ser para mais ou menos, no estágio pré-cotiledonar (ex. spot BD) (Tabela 4).

Tabela 2: Spots localizados entre os estádios Cordiforme , Torpedo , Pré-cotiledonar  e Cotiledonar do embrião somático de *A. sellowiana*. 

letra	spot	PMe	ple	%sig	PMt	plt	%volume	identificador	%cob	N° matches	nome	espécie
F	11p	56	7,3	28	57	6,7		S49422 / Q38712_AMAHP	6	3	11S globulin seed storage protein	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
BB	58p	56	7,5	29	57	6,7		S49422	6	3	11S globulin seed storage protein	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
Q	35t	23	6,6	30	23	6,8		CAJ76579	16	2	CS258356 NID	<i>Arabidopsis thaliana</i>
L	22p	39	5,7	78	62	5,2		S18181 / Q40511_TOBAC	13	6	dnaK-type molecular chaperone Nthsp70, Heat shock protein 70 [Fragment]	<i>Nicotiana tabacum</i>
R	24c	40	6,9	29	39	8,7		Q2HSJ7_MEDTR	13	3	Tetratricopeptide-like helical	<i>Medicago truncatula</i>

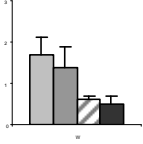
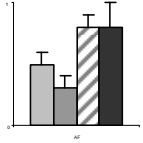
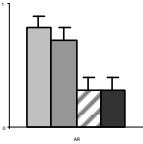
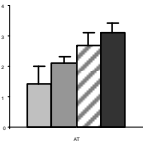
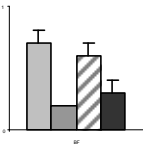
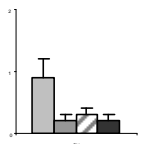
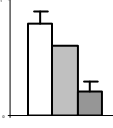
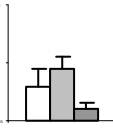
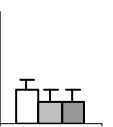
W	66p	18	6,6	25	18	6,1		O04957_HELAN	26	2	Cytosolic glutamine synthetase (fragment)	<i>Helianthus annuus</i>
AF	88t	22	7,3	33	19	6,7		Q5XNL8_PONTR	18	2	Resistance protein-like protein (Fragment)	<i>Poncirus trifoliata</i>
AR	23p	46	6,4	47	44	6,3		T14580	11	4	SIEP1L protein precursor	<i>Beta vulgaris</i>
AT	29c	36	5,9	31	36	8,3		Q94F07_ARATH	17	3	Hypothetical protein F7H2.8	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BF	73p	21	5,5	27	19	5,0		Q1SIZ3_MEDTR	15	2	KNOX1; KNOX2	<i>Medicago truncatula</i>
BV	83t	19	6,2									

Tabela 3: Spots localizados entre três estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*.

Entre Globular □, Cordiforme ■, Torpedo ■

letra	spot	PMe	ple	%sig	PMt	plt	%vol	identificador	% cob	N° matches	nome	espécie
Z	67t	73	4,6	23	73	9,0		Q2HVA1_MEDTR	6	3	KH, type 1	<i>Medicago truncatula</i>
AK	45t1	34	5,0	30	34	5,9		Q6PVY8_ORYSA	18	3	Zinc finger protein	<i>Oryza sativa</i>
AL	66t	55	6,6	33	60	6,4		Q5N7Y7_ORYSA	8	3	Putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6 interacting protein	<i>Oryza sativa</i>

Entre Cordiforme ■, Torpedo ■, Pré-cotiledonar □

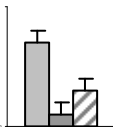
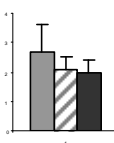
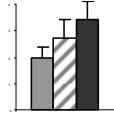
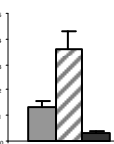
letra	spot	PMe	ple	%sig	PMt	plt	%vol	identificador	% cob	N° matches	nome	espécie
AA	68t	71	4,3	37	76	8,8		Q8LIY0_ORYSA	7	4	Putative CSLC9 (Cellulose synthase-like C1)	<i>Oryza sativa</i>

Tabela 4: Spots localizados entre os estádios Torpedo ■, Pré-cotiledonar □ e Cotiledonar ■ do embrião somático de *A. sellowiana*.

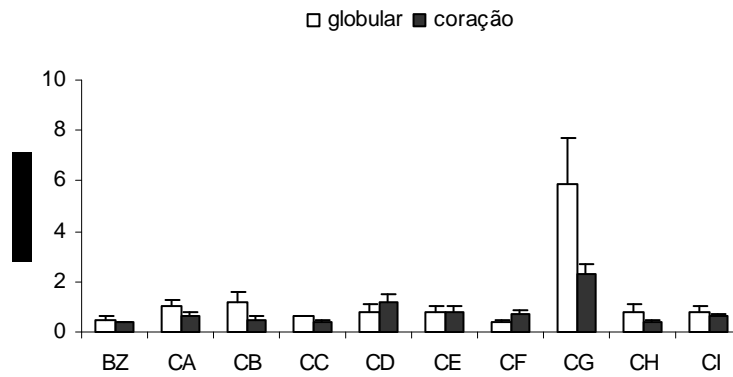
	letra	spot	PMe	ple	%sig	PMt	plt	%Volg	%Volc	%Volt	identificador	% cob	N° matches	nome	espécie	
GRUPO 1 	D	8p	69	5,3	31	74	5,1	0,9	0,3	0,3	Q9S943_VITVI	5	3	Vacuolar invertase 2, GIN2	<i>Vitis vinifera</i>	
	E	7t	55	5,7	30	54	6,0	1,3	0,5	0,5	Q66PF2_FRAAN	8	3	Putative UDP-rhamnose:rhamnosyltransferase	<i>Fragaria ananassa</i>	
	H	14c	49	7,1	41	47	8,6	1,1	0,3	0,2	S00933 / P08036	14	4	DNA-directed RNA polymerase beta chain (fragment)	<i>Saponaria officinalis</i>	
	M	28p	34	5,9	26	35	5,8	2,7	2,1	2,0	Q6L467_SOLDE	7	3	Homeobox-leucine zipper protein HAT7 , putative	<i>Solanum demissum</i>	
	AQ	9p	60	5,4	41	61	9,4	1,0	0,7	0,5	Q507N4_9MAGN	4	3	Maturase K	<i>Ranunculus kochii</i>	
GRUPO 2 	C	6t	61	5,9	20	51	5,4	0,3	0,4	0,5	AAC14453	8	3	ACTPOLYGAL NID, Polygalacturonase [Precursor]	<i>Actinidia deliciosa</i>	
	J	11t	45	5,5	35	43	6,0	2,0	2,7	3,4	Q69K99_ORYSA	12	3	Membrane protein-like	<i>Oryza sativa</i>	
	BG	85p	15	5,6	29	14	6,7	0,2	0,2	0,9	Q2XNS6_ASPOF	31	2	Hypothetical protein	<i>Asparagus officinalis</i>	
	BY	45p	34	5,6					0,8	0,9	0,9					
GRUPO 3	BE	74p	33	4,8	37	36	5,0	0,2	0,2	0,2	BAD38007 /Q40634	13	3	AP005393 NID, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1	<i>Oryza sativa</i>	
	I	20c	41	5,1	28	41	5,3	0,7	2,6	1,5	Q2ACE2_SILLA	9	3	Chalcone synthase	<i>Silene latifolia</i>	
	X	46c	25	5,2	38	23	6,0	0,4	0,8	0,3	Q1SYN8_MEDTR	24	3	RNA-directed DNA polymerase (Clone AmLi2)	<i>Medicago truncatula</i>	
GRUPO 4 	Y	109c	28	5,4	34	30	5,3	0,3	0,2	0,3	Q949S9_ARATH	11	3	Hypothetical protein At3g18165	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
	AM	55p	27	6,3					0,7	0,9	0,6					
	AD	108c	38	4,7	38	39	5,1	0,2	0,5	0,1	C96799 / O49288_ARATH	13	3	hypothetical protein F22K20.12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
	AE	87t	25	7,3	42	26	5,2	0,2	0,7	0,5	S25538 / P35512	21	3	phenylalanine ammonia-lyase	<i>Malus domestica</i>	
	AG	50t	23	6,9	29	25	7,0	0,3	0,9	0,3	Q949G5_MEDFA	17	2	Mob1-like protein.	<i>Medicago falcata</i>	
	AW	26p	34	7,1	37	27	7,5	0,6	1,0	0,6	Q61VU7_ARATH	8	3	Beta-expansin 6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
	AY	29p	34	6,0	32	37	6,4	1,4	1,0	1,3	Q6K9T9_ORYSA	17	3	Metallo-beta-lactamase-like	<i>Oryza sativa</i>	
	BD	68p	13	4,1	31	14	6,7	1,3	3,6	0,3	Q2XNS6_ASPOF	22	2	Hypothetical protein	<i>Asparagus officinalis</i>	
	BQ	64c	21	9,3	35	25	9,2	1,0	2,4	1,2	T46058 / Q9M2W6_ARATH	23	3	porin-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	

Na comparação entre dois estádios contínuos, observou-se que dez proteínas foram expressas entre o estágio globular e cordiforme (Tabela 5). Uma observação relevante foi que todas as proteínas tiveram sua maior expressão no estágio globular, sendo mais expresso o spot CG, superior a 5%. Entre os estádios cordiforme e torpedo foram detectadas quatro proteínas (Tabela 6) e dessas três foram expressas em maior volume no estágio cordiforme e uma no estágio torpedo. Para os estádios torpedo e pré-cotiledonar foram observados quatro proteínas (Tabela 7), as quais foram expressas em maior volume no estágio torpedo. Por último, entre os estádios pré-cotiledonar e cotiledonar foram observadas 13 proteínas (Tabela 8), das quais três começavam sua expressão a partir do estágio pré-cotiledonar, aumentando no embrião cotiledonar. Somente uma proteína foi expressa em intensidade superior a 4%, o spot BI, sendo este volume expresso no estágio cotiledonar.

Uma observação importante de todas as percentagens de volume analisados, foi que à medida que as proteínas foram expressas em menos grupos de estádios (a partir três), os volumes de expressão foram menores a 1%. Somente duas proteínas foram maiores de 5%, característica observada nas proteínas expressas em todos os estádios de desenvolvimento do embrião somático. É provável que essas proteínas de volumes menores cumpram um papel específico nesses grupos de estádios, sendo essa intensidade de expressão suficiente para desencadear uma ação ou cumprir sua função na célula.

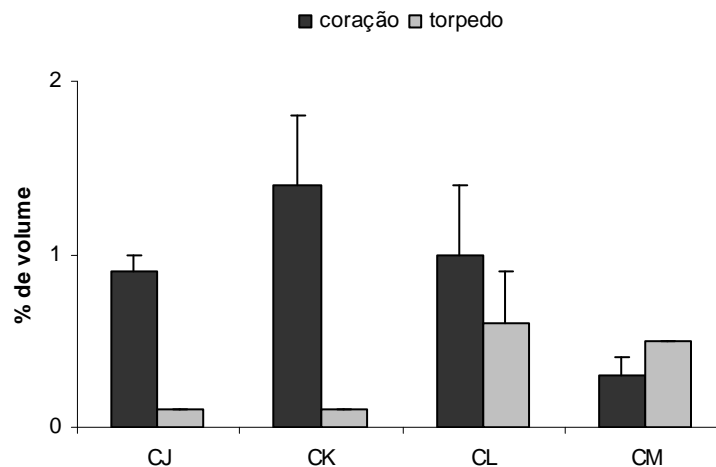
Nos diferentes estádios de desenvolvimento poucas proteínas foram expressas exclusivamente em cada estágio (Tabela 9). Assim somente quatro proteínas foram observadas no estágio globular, uma no estágio cordiforme, duas no estágio torpedo e quatro no estágio pré-cotiledonar. No estágio cotiledonar, não foi observada nenhuma proteína exclusiva para esse estágio. Das quatro proteínas observadas no estágio globular, duas apresentaram pesos moleculares baixos com pI relativamente alcalinos. No estágio pré-cotiledonar, todas tiveram peso molecular baixo, mas o pI foi ácido e alcalino em proporções iguais.

Tabela 5: Spots localizados entre o estágio globular e cordiforme do embrião somático de *A. sellowiana*



letra	N° spot		pl/g	pl/c	PM/g	PM/c
	globular	cordiforme				
BZ	21	12	5,6	5,8	63	64
CA	24	14	5,8	6,0	60	61
CB	27	101	6,3	6,4	53	56
CC	36	18	6,2	6,3	50	51
CD	46	26	7,0	7,0	42	44
CE	62	166	6,9	6,9	37	36
CF	69	140	6,7	6,7	34	35
CG	76	43	6,9	6,9	26	27
CH	80	147	7,2	7,1	26	26
CI	165	164	5,6	5,9	70	72

Tabela 6: Spots localizados entre os estádios cordiforme e torpeda do embrião somático de *A. sellowiana*



letra	N° spot		pl/c	pl/t	PM/c	PM/t
	cordiforme	torpedo				
CJ	22	96	5,2	4,6	49	46
CK	32	21	7,9	7,4	37	39
CL	36	24	7,1	6,5	37	38
CM	103	77	6,1	5,4	38	38

Tabela 7: Spots localizados nos estádios torpedo □ e pré-cotiledonar ■, do embrião somático de *Acca sellowiana*.

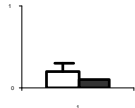
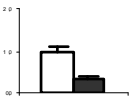
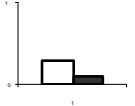








letra	N° spot	% Volume	PMex	plex	% sig	PMt	plt	identificador	% cobertura	N° matches	nome	espécies
AB	69t		50	5,1	36	52	5,2	Q9ZTY7_9SOLN	11	3	Glucose acyltransferase.	<i>Solanum berthaultii</i>
AC	9t		52	4,9	44	55	5,5	Q42990_ORYSA	11	4	Beta-amylase	<i>Oryza sativa</i>
AO	81t		16	6,2								
AP	87p		14	7,2	52	14	7,7	BAC23053	39	3	AB061267 NID Protein yippee-like	<i>Solanum tuberosum</i>

Tabela 8: Spots localizados nos estádios pré-cotiledonar ■ e cotiledonar □ do embrião somático de *Acca sellowiana*.

letra	N° spot	% Volume	PMex	plex	% sig	PMt	plt	identificador	% cob	N° matches	nome	espécies
AS	27p		43	5,5	33	39	5,3	Q53ZN1_ARATH	16	3	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AZ	41p		22	8,7	24	26	8,6	Q1T1W1_MEDTR	14	2	Hypothetical protein	<i>Medicago truncatula</i>
BA	44p		21	7,3	37	18	8,4	S22496	27	3	Peptidylprolyl isomerase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BH	88p		22	6,6	30	18	6,1	O04957_HELAN	26	2	Cytosolic glutamine synthetase	<i>Helianthus annuus</i>
BI	96p		13	8,3	39	14	7,7	BAC23053	39	3	AB061267 NID, Protein yippee-like	<i>Solanum tuberosum</i>
BJ	7p		71	5,9	50	77	5,7	Q8S562_PHAVU	11	5	KAP-2	<i>Phaseolus vulgaris</i>
BK	128p		60	7,5								

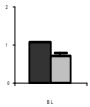
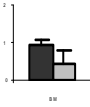
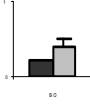
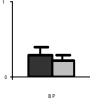
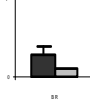
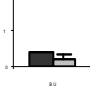
BL	63p		24	6,3															
BM	62		24	5,5															
BO	134p		39	8,3															
BP	18		54	5,1															
BR	72c		16	6,0	28	19	6,5	Q6DMZ2_EUCGL	11	2	Cinnamoyl CoA reductase (Fragment)	<i>Eucalyptus globulus</i>							
BU	96p		19	6,7															

Tabela 9: Spots exclusivos dos estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*.

Estádio	N° spot	PMex / PMt	plex / plt	% Vol	Desvio padrão
Globular	28	53	6,7	4,2	1,3
Globular	29	53	6,9	1,4	0,2
Globular	85	24	7,5	1,9	0,7
Globular	91	22	7,9	1,2	0,2
Cordiforme	66	17	6,9	1,7	0,6
Torpedo	39	21/21	8,7/5,4	1,6	0,3
Torpedo	103	24/24	5,3/6,7	0,2	0,1
Precotiledonar	21	39/37	6,2/6,2	0,7	0,3
Precotiledonar	59	24/26	6,1/5,2	0,3	0,0
Precotiledonar	81	19/17	8,9/5,1	1,8	0,8
Precotiledonar	39	34/37	8,7/6,0	0,3	0,1

DISCUSSÃO

Estudos sobre a embriogênese somática em *Acca sellowiana* mostraram que esta rota morfogenética pode ser induzida a partir de dois tipos de explantes: embriões zigóticos (CANHOTO E CRUZ, 1990; DAL VESCO E GUERRA, 2001; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007) e tecidos florais (STEFANELLO *et al.*, 2005). Além disto, esta rota mostrou-se genótipo-dependente, tendo acessos mais responsivos que outros. Utilizando os embriões zigóticos como explantes observou-se que nem todos os tecidos do explante foram responsivos aos estímulos indutivos e os tecidos mais responsivos corresponderam às camadas epidérmicas do cotilédone (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2004).

No presente trabalho, a embriogênese somática foi induzida a partir dos embriões zigóticos do acesso 101x458 de *Acca sellowiana*. Em estudos anteriores, a utilização do acesso 101 individualmente (DAL VESCO E GUERRA, 2001; GUERRA *et al.*, 2001; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2004), assim como o uso do acesso 458 como progenitor masculino (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007), resultou em elevadas taxas de indução embriogenética. No presente trabalho, o cruzamento

destes dois acessos conjuntamente com o protocolo utilizado de indução resultou em uma elevada taxa de formação de embriões somáticos, o que favoreceu a obtenção e coleta dos embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento.

Trabalhos anteriores com esta mesma espécie com o emprego do sistema de gel unidimensional revelaram diferenças qualitativas entre os padrões protéicos dos embriões somáticos nos diferentes estádios de desenvolvimento (CANGAHUALA-INOCENTE, 2002). Uma análise comparativa entre os diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático e zigótico de *Cyclamen persicum*, por meio da análise proteômica, revelou que 74% das proteínas expressas nos embriões zigóticos foram encontradas em abundância similar nos embriões somáticos desenvolvidos em meio de cultura contendo sacarose a 6% (WINKELMANN *et al.*, 2006). No presente trabalho utilizou-se a alta resolução de 2-DE conjuntamente com as análises do Software Platinum e análises prévias no Maldi-Tof para detalhar a expressão das proteínas totais durante os estádios de desenvolvimento do embrião somático de *Acca sellowiana*.

A. Metodologia utilizada para a 2-DE

Uma etapa crítica em estudos proteômicos é a extração e preparação da amostra. Esta análise em plantas implica na superação de desafios práticos que normalmente mais problemáticos do que para outros organismos. Tecidos vegetais têm relativamente baixas concentrações de proteínas e são normalmente ricos em protease e materiais que interferem com a separação e a análise das proteínas, tais como a parede celular, polissacarídeos de reserva, lipídeos, compostos fenólicos e os produtos do metabolismo secundário (TSUGITA E KAMO, 1999).

No presente trabalho os ensaios prévios de extração realizados com os embriões zigóticos revelaram que o método de extração por fenol foi o mais adequado para este sistema. A concentração de proteínas obtidas pelos dois métodos testados: TCA/acetona e fenol foram semelhantes, contudo a quantidade obtida com o TCA foi levemente superior. Já, o gel unidimensional SDS 12% mostrou que as proteínas extraídas com fenol foram mais limpas e definidas em comparação com o método de TCA.

Saravanan e Rose (2004) mostraram que o método com fenol dá uma alta produção de proteínas e uma maior resolução e intensidade dos spots,

especialmente com extrato de tecidos que continham altos teores de polissacarídeos solúveis. Esse método também gerou géis 2-DE mais definidos para os spots padrões. Seus resultados sugerem que o protocolo com fenol é altamente efetivo com tecidos mais recalcitrantes e que a combinação dos métodos TCA/acetona e fenol proporcionou uma análise proteômico, baseado na 2-DE, mais depurada para os tecidos avaliados.

Igualmente, Carpentier *et al.* (2005) avaliaram vários métodos de extração para o gel de eletroforese bidimensional. Esses autores aperfeiçoaram o método de extração por fenol para pequenas quantidades de amostra e concluíram que o método clássico de TCA/acetona e a extração de fenol são métodos padrões. Ambos, os métodos foram associados com uma menor, mas reproduzível perda de proteínas. Estes autores sugerem avaliar os dois métodos antes de selecionar um protocolo apropriado.

Uma característica importante das culturas embrionárias de *Acca sellowiana* foi à produção de um exudado fenólico antes da produção dos embriões somáticos. Avaliando os teores de fenóis excretados no meio de cultura durante a indução de embriogênese somática de *A. sellowiana*, observou-se que esta exsudação ocorreu com maior intensidade nas primeiras semanas de indução e se manteve constante até os 75 dias de indução, período na qual a cultura embriogenética atinge o nível mais alto de produção de embriões somáticos (dados não publicados).

Depois da extração, o objetivo seguinte consiste em obter informação qualitativa e quantitativa sob a população constitutiva de proteína como seja possível. A utilização do gel bidimensional 2-DE implica na separação das proteínas na primeira dimensão baseada em sua carga (ponto isoelétrico) e na segunda dimensão baseada em sua massa molecular (ROSE *et al.*, 2004), e atualmente, sua utilização aumentou devido às melhoras significativas na resolução e reprodutibilidade dos resultados (RABILLOUD, 2002).

No presente trabalho, para a obtenção das informações qualitativas e quantitativas das proteínas totais existentes nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático foi utilizado o método de separação através do gel bidimensional. Na primeira dimensão utilizou-se tiras desidratadas de 7 cm com pH de 3-10 e na segunda dimensão foi utilizado o gel de eletroforese SDS 12%. Os géis gerados foram corados com Coomassie brilhante blue R250, obtendo-se géis limpos, com spots definidos e reproduzíveis.

O corante Coomassie é relativamente fácil de trabalhar e compatível com a identificação das proteínas por espectrômetro de massa (MS), mas é moderadamente sensível, com o limite da proteína de aproximadamente 10 ng. O outro corante alternativo tem sido o nitrato de prata, que é mais sensível, detectando proteínas de 0,5 ng (HEAZLEWOOD E MILLAR, 2003) sendo, contudo menos conveniente para a identificação com o MS (LOPEZ, 2000). Recentemente, vários corantes fluorescentes foram desenvolvidos, tais como SYPRO *Ruby* e SYPRO *Orange*. Esses corantes combinam as vantagens dos outros corantes, mostrando sensibilidade similar ao nitrato de prata, facilidade de uso e compatibilidade com o MS do Coomassie (LAUBER *et al.*, 2001). Entretanto, os altos custos desses corantes podem ser proibitivos, particularmente com estudos nos quais são utilizados muitos géis (ROSE *et al.*, 2004).

As metodologias utilizadas e os protocolos selecionados no presente trabalho proporcionaram um número razoável de spots (230), os quais permitiram observar as similaridades e diferenças na expressão das proteínas durante os diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. sellowiana*.

B. Comparação proteômica dos embriões somáticos

No presente estudo foi possível localizar 90 spots com expressão nos diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. sellowiana*. Doze deles foram encontrados em todos os estádios de desenvolvimento, onze entre quatro estádios, vinte e cinco entre três estádios, trinta e um entre dois estádios e onze exclusivamente de algum estádio de desenvolvimento.

Proteínas comuns a todos os estádios

Foram identificadas proteínas envolvidas em diversos processos metabólicos, entre elas a **proteína limonena ciclase** (spot A) envolvida com o processo biossintético de monoterpenóides, controlando a atividade da sintase mircene/(E)-beta-ocimene no citoplasma (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>).

A **proteína precursora de endoquitinase** (spot N) age como uma proteína de defesa ao ataque de fungos, encontrada no vacúolo (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>), pertence a família de proteínas relacionadas com patógenos (PR). Essa proteína apresentou-se no volume maior aos 5% nos últimos dois estádios: pré-cotiledonar e cotiledonar. A expressão dos genes quitinase e

glucanase na ausência de ataque de patógeno ou por indução de estresse foi observada em vários tecidos da planta (HOJ E FINCHER, 1995), podendo estar implicada no crescimento e desenvolvimento normal da planta. Uma evidência direta que associa as quitinases ao desenvolvimento da planta foi obtida em estudos da embriogênese somática em cenoura (de JONG *et al.*, 1992). O ácido endoquitinase 32kDa foi identificado no desenvolvimento do embrião somático de cenoura sensível à temperatura (de JONG *et al.*, 1995). Dong e Dunstan (1997) reportaram a presença de dois genes PR-like protein altamente abundantes nos tecidos dos embriões somáticos de *Picea glauca* mostrando uma regulação no seu desenvolvimento durante o desenvolvimento do embrião.

No presente trabalho, a expressão das proteínas PR-like durante o desenvolvimento dos embriões somáticos poderia ser considerada como uma programação do mecanismo de defesa contra um possível ataque microbiano durante o desenvolvimento da semente e germinação, como proposto por Hoj e Fincher (1995) e Dong e Dunstan (1997). Também poderia ser atribuída ao estresse associado ao cultivo *in vitro*. Os fitorreguladores exógenos poderiam também alterar a expressão das proteínas PR-like, como observado pelo acúmulo de mRNA endoquitinase em culturas de tabaco (SHINSHI *et al.*, 1987).

A **Proteína fosforibosil formilglicinamidina ciclo-ligase** (spot K) envolvida com o processo de biossíntese dos nucleotídeos purinas nos cloroplastos e mitocôndrias (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) é considerada uma proteína conservativa de todo o processo de formação celular. Essa proteína apresentou as maiores percentagens de volume, o qual diminuiu de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento do embrião somático indicando que sua atividade é regulada quando o embrião somático amadurece, pode estar associada à fase de latência do embrião.

A proteína homóloga **fenilalanina amônia liase** (PAL) (spots P) diminuiu sua expressão, medida pelo volume, de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento do embrião somático. Também foi observada a presença de um isômero desta proteína (spot AE) presente nos estádios torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar. Essa proteína é uma enzima exclusiva de plantas superiores e pertencentes a uma família de genes que catalisa a deaminação não oxidativa da fenilalanina ao ácido trans-cinâmico (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>), de tal maneira que a presença de isoformas de PAL é uma observação comum (KUMAR E ELLIS,

2001). Por outro lado, ela é também precursora de vários fenilpropanóides como a lignina, flavonóides e cumarinas (HAHLBROCK E SCHEEL, 1989).

O **peptidilproil isomerase** (PPlases) catalisa a isomerização cis/trans de peptídeos com enlaces prolina, o qual é um processo intrinsecamente lento (LANDRIEU *et al.*, 2002), levada a cabo em bactérias e células eucariontes (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). No presente trabalho essa proteína apresentou-se na forma de dois isômeros podendo ser homóloga dos spots T e S. O isômero S teve sua maior expressão (7%) no estágio torpedo, sendo menores nos demais estádios. Já o spot T teve sua maior expressão (entre 2 e 3,9% de volume) entre os estádios cordiforme a cotiledonar. O incremento dos mRNA da expressão das PIN1At (*A. thaliana*) e MdPIN1 (*M. domestica*) em células em divisão sugere que os homólogos PIN1 de plantas poderiam estar envolvidos no processo de divisão celular (LANDRIEU *et al.*, 2000; YAO *et al.*, 2001).

No presente trabalho, outra proteína que se expressou em todos os estádios e que teve uma expressão maior do que 7%, foi o spot V, possível homólogo da **Proteína Hipotética P0039G05.27** de *Oryza sativa*. Essa proteína não tem função nem processo biológico definidos. Nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana* foi à proteína que mais volume de expressão teve (7,1%), de todas as localizadas e identificadas. Essa expressão foi observada no estágio cordiforme, etapa na qual, modificações morfológicas se iniciam como a orientação bipolar dos embriões somáticos.

Outro tipo de proteína presente em todos os estádios foi à **Proteína de choque térmico ligadura de calmodulina** correspondente ao spot G. A expressão desta proteína mostrou-se constante nos estádios mais avançados de desenvolvimento do embrião somático. Essa proteína participa do processo metabólico de lipídeos, onde sua função molecular é catalizar a atividade do triacilglicerol lipase (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). A calmodulina (CaM) influencia muitos processos celulares por interação com várias proteínas, entre elas a família das “Heat Shock Proteins”, as quais são somente expressadas sob condições de estresse induzido. Outras, por sua vez, estão presentes na célula em condições normais, podendo ser encontradas em diferentes compartimentos celulares tais como o núcleo, citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático, entre outros (FLAHERTY *et al.*, 1990).

Kalenba e Pukacka (2005) observaram que o estresse induz proteínas como LEA-2 e HSPs, as quais protegem estruturas celulares e previnem a agregação de proteínas desnaturadas. Pequenas HSPs, de aproximadamente 22 a 36 kDa, foram detectadas em sementes recalcitrantes de *Acer saccharinum* e *A. pseudoplatanus*, em sementes ortodoxas de *A. platanooides* e sub-ortodoxas de *Fagus sylvatica* L.. Proteínas LEA e HSPs são essenciais no estresse hídrico e durante a maturação, na dessecação e no armazenamento de sementes de plantas lenhosas.

Proteínas comuns a quatro estádios

No presente estudo os spots F e BB, presentes nos estádios cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar do embrião somático, são possíveis isômeros da proteína homóloga **Proteína de reserva 11S globulina**. O isômero F apresentou sua maior expressão no estádio cordiforme, sendo maior do que 2,5 %, diminuindo sua expressão nos estádios seguintes. O isômero BB apresentou sua maior expressão no estádio torpedo, sendo menor sua expressão nos estádios seguintes, bem como no estádio cordiforme. A presença desta proteína nos embriões somáticos evidencia o preparo do embrião em armazenar compostos de reserva antes da germinação, etapa na qual o gasto de energia é alto. As proteínas de reserva em sementes são provedoras dos maiores recursos de N para a germinação e desenvolvimento inicial da plântula (KROCHKO *et al.*, 1994).

De acordo com Shewry *et al.* (1995) as principais proteínas de reserva das sementes são albuminas, globulinas ou prolaminas. Os grupos mais conhecidos são as albuminas 2S, encontradas nas sementes das dicotiledôneas e evolutivamente relacionadas às prolaminas presentes nas sementes das gramíneas e as globulinas 7S tipo vicilinas e 11S tipo leguminas, encontradas tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas (SHEWRY E CASEY, 1999).

Os embriões somáticos de *Medicago sativa* expressaram proteínas de reserva similarmente o embrião zigótico. No embrião zigótico, as proteínas 7S, 11S e 2S foram abundantes durante a maturação ao mesmo tempo. Já no embrião somático, a proteína 7S foi sintetizada primeira, seguida por a proteína 11S e muito depois por o 2S (KROCHKO *et al.*, 1994).

Nos embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, a globulina 7S foi depositada principalmente na fase final do crescimento do embrião, representando 10% do peso seco e 50% das proteínas solúveis. Já no embrião somático, as globulinas 7S

apresentaram rápido incremento nos primeiros estádios de desenvolvimento, mas sua concentração foi 80 vezes menor que aquele presente no embrião zigótico, representando 0,3% da matéria seca e 4% das proteínas solúveis (MORCILLO *et al.*, 1999).

Embriões somáticos de *Pinus strobus* acumularam proteínas de reserva de forma similar ao embrião zigótico. As mais abundantes foram a proteínas insolúveis em buffer 11S globulina PM 59,6 kDa, e a solúvel em buffer 7S vicilina PM 46-49 kDa (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2004). Lippert *et al.* (2005) reportaram presença da proteína de reserva vicilina como a proteína mais abundante nos embriões somáticos maduros de *Picea glauca* por meio de análise proteômica. Estudos proteômicos revelaram a presença da proteína de reserva 11S globulina nos embriões somáticos de *Cyclamen persicum*, bem como em tecidos do endosperma e, em menor quantidade, no embrião zigótico. A proteína 7S globulina foi mais abundante nos embriões zigóticos e no endosperma (WINKELMANN *et al.*, 2006).

No presente estudo, o spot L foi uma das proteínas mais expressas (maior do que 4%) nos estádios cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar do embrião somático, podendo ser identificada como seu homólogo **Proteína chaperona Nthsp 70**. Esse spot apresentou uma maior expressão nos embriões pré-cotiledonar e cotiledonar, etapas nas quais diversas proteínas são sintetizadas, seja para a definição do eixo ápice-radícula ou para a síntese de proteínas de reserva. Tudo isto no ambiente de estresse *in vitro*, especialmente estresse abiótico. A presença desta proteína nos embriões poderia estar relacionada com a hipersensibilidade de morte celular das células por estresse abiótico que elas sofrem no meio de cultura (KANG *et al.*, 2006). Dudits *et al.* (1991) e Kitamiya *et al.* (2000) reportaram a expressão dos genes *heat shock* durante a embriogênese somática em alfafa e cenoura, respectivamente.

A função das proteínas é determinada pelo padrão de dobramento e a forma da estrutura tridimensional desta. O caminho como a proteína se dobra é determinada pela energia livre dos resíduos dos aminoácidos (LEVITT *et al.*, 1997). No entanto, as condições de temperatura e pH, concentração de sais e especificamente da concentração total da proteína encontrada *in vivo* tende a promover reações laterais que competem por um só caminho que conduzirá a estrutura final correta (MIERNYK, 1999).

Moléculas chaperonas são proteínas associadas ao arranjo das proteínas, mas não são componentes da estrutura final de elas. Em condições de estresse, tais como choques térmicos, é a síntese das moléculas chaperonas que permite que as proteínas celulares evitem e/ou recuperam do estresse (MIERNYK, 1999).

Pequenas proteínas HSPs de 15-30 kDa foram acumuladas durante a maturação dos embrião somáticos de *Quercus suber* e por um controle regulatório em resposta a diferentes condições de estresse (PUIGDERRAJOLS *et al.*, 2002). Em *Picea glauca* e *Medicago sativa* vários dos cDNA dos embriões somáticos foram expressos para diversas proteínas entre elas a HSP (DONG E DUNSTAN, 1995; GYÖRGYEY *et al.*, 1991).

No presente trabalho, outra proteína presente nos estádios cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar do embrião somático esteve associada ao spot BF, expresso em maior proporção no embrião cordiforme e podendo ser homólogo da **proteína KNOX1 e KNOX2**. Esta proteína é codificada por os genes denominados Homeobox, que possuem um domínio comum chamado homeodomínio (HD) (VOLLBRECHT *et al.*, 1991).

Os genes Homeobox foram inicialmente caracterizados como seqüências regulatórias transcricionais que controlam a morfogênese em algumas espécies de *Drosophila* (GEHRING, 1987). O primeiro gene homeobox em plantas, *knotted1* (*kn1*), foi identificado por clonagem de um gene de milho, chamado *Knotted1* mutant (VOLLBRECHT *et al.*, 1991). Mais tarde, verificou-se que os genes *knotted1*-like homeobox (*knox*) codificavam proteínas KNOX que foram isoladas de várias plantas como arroz, ervilha, *Arabidopsis*, soja, tomate e tabaco (MATSUOKA *et al.*, 1993; LINCOLN *et al.*, 1994; MA *et al.*, 1994; MÜLLER *et al.*, 1995).

A mutação desta proteína mostrou defeitos no desenvolvimento ou manutenção do meristema apical vegetativo (SAM) em milho e *Arabidopsis thaliana* (LONG *et al.*, 1996; KERSTETTER *et al.*, 1997). Com base nesta evidência, muitas proteínas KNOX seriam consideradas que possuem um papel crítico na manutenção das propriedades celulares do SAM (REISER *et al.*, 2000). Assim, no presente trabalho, a presença desta proteína, especialmente no estágio cordiforme e pré-cotiledonar, poderia indicar o início do desenvolvimento do meristema apical caulinar, assim como seu normal crescimento. Em *Nicotiana tabacum*, por exemplo, todos os genes homeobox que codificam proteínas KNOX influenciaram o

desenvolvimento das folhas a partir do meristema apical vegetativo (NISHIMURA *et al.*, 2000).

Outra proteína presente nestes mesmos estádios foi o spot AT, possível homóloga da **proteína Hipotética F7H2.8** de *Arabidopsis thaliana*. A expressão desta proteína foi concomitante com o desenvolvimento dos embriões somáticos, chegando a uma expressão maior de 3%. Essa proteína conta com uma seqüência repetitiva rica em leucina (LRR) e está envolvida em diferentes processos biológicos, que incluem transdução de sinais, adesão celular, reparo de DNA, transcrição, processamento de RNA, resistência a doenças, apoptose e resposta imunológicas (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>).

Proteínas comuns a três estádios

Entre o estágio globular, cordiforme e torpedo foram localizados três proteínas, os quais podem ser homólogos da **KH tipo1** (spot Z), **proteína de dedo deZinco** (spot AK) e da **proteína de interação Putativa eucariótica de translação e iniciação fator 3 subunidade 6** (spot AL). A proteína KH tipo 1, tem por função ligar RNA, já a proteína de dedo de Zinco liga proteínas e íons zinco. Por último, a proteína Putativa eucariótica de translação tem por função iniciar a tradução dos mRNA. Essas proteínas estão localizadas em todas as células eucarióticas (<http://ca.expasy.org>).

Uma só proteína foi expressa nos estádios cordiforme, torpedo e pré-cotiledonar, o spot AA, possível homóloga da **proteína Putativa CSLC9**, a qual pertence à família das glicosiltransferases (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). As reações glicosil-transfer fazem parte das biotransformações mais importantes da biologia, já que respondem por a biossíntese e hidrólise do volume de biomassa (KLEENE E BERGER, 1993). A biossíntese de dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos envolvem a ação de diferentes glicosiltransferases, enzimas que catalisam a transferência de metade de açúcares da molécula doadora às moléculas receptoras específicas, formando pontes glicosílicas (CAMPBELL *et al.*, 1997).

Entre os estádios torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar foram localizadas 21 proteínas, das quais 19 têm possível identificação (ver tabela 4). Neste agrupamento, como mencionado anteriormente, foram observadas quatro formas de expressão (ver item similaridade e diferença entre os estádios de desenvolvimento, nos resultados). Dentre as proteínas que tiveram maior expressão e foram

localizadas no grupo 1, identificou-se a **proteína homeobox zipper de leucina** (HDZip). Esta proteína pertence à família dos fatores de transcrição encontrada só em plantas (GAGO *et al.*, 2002).

Os genes *HDZip* agem em processos de desenvolvimento, incluindo tecido vascular e o desenvolvimento do tricoma. Vários estudos sugerem que eles se encontram envolvidos na mediação dos sinais externos que regulam o crescimento da planta (HENRIKSSON *et al.*, 2005). Zhang *et al.* (2006) estudaram os mecanismos moleculares induzidos pelo TDZ na aquisição de competência embriogênica a partir de pétala em *Medicago sativa*. Seus resultados indicam que a indução por TDZ ativa o metabolismo celular e a proliferação celular, o qual resulta na formação de estruturas nodulares. Os fatores de transcrição, como a proteína homeodomain-leucine zipper e zinc finger, tem um papel na regulação de genes envolvidos na terminação da embriogênese somática e na diferenciação de estruturas nodulares e elementos traqueais.

No grupo 2 a proteína que teve sua maior expressão foi o spot J, sendo possível homóloga da **Proteína similar a de membrana**. Essa proteína liga proteínas e íons zinco (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) e teve sua expressão aumentada paralelamente ao desenvolvimento dos embriões somáticos. No grupo 3, observou-se apenas uma proteína com expressão constante nos três estádios (spot BE) possível homóloga da proteína **1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase 1** (ACCO-1). Em plantas superiores, ACCO-1 catalisa o passo final da biossíntese do etileno e é estabelecida como um metabolito crítico na maturação do fruto, germinação da semente, senescência da folha, abscisão e senescência floral (YANG E DONG, 1993).

Por último, dentro do grupo 4, identificou-se a **proteína hipotética** de *Asparagus officinalis*, possível homóloga do spot BD, proteína sem atividade definida e que foi expressa em maior volume no estágio torpedo. Outra proteína expressa em maior volume foi a **Proteína similar à porina**, possível homóloga do spot BQ, teve uma maior expressão no estágio pré-cotiledonar, período na qual o embrião aumenta em tamanho e massa. Essa proteína é considerada uma das maiores da membrana externa da mitocôndria em eucariontes e forma um canal seletivo de ânion dependente da voltagem (VDAC) que funciona como porta de difusão para moléculas hidrofílicas pequenas (SAMPSON *et al.*, 1996).

Proteínas comuns entre dois estádios

Entre o estágio globular e cordiforme foram localizados dez proteínas. A proteína CG apresentou a maior expressão (5,9 %) no estágio globular, diminuindo no estágio cordiforme. Essa proteína foi a que teve maior expressão entre todas as proteínas agrupadas entre dois estádios contínuos. Já entre os estádios cordiforme e torpedo, o spot CK apresentou o maior volume de expressão dentre as quatro proteínas localizadas. Ambas as proteínas não puderam ser identificadas.

Dentre os estádios torpedo e pré-cotiledonar do embrião somático o spot AC poderia ser homólogo da **β -amilase**, encontrada em plantas e bactérias. Esta proteína tem função hidrolisar enlaces 1,4 alfa glicosílicos em polissacarídeos tipo amido, removendo sucessivamente unidades de maltose das cadeias não reduzidas (VIKSONIELSEN *et al.*, 1997). Sua expressão foi maior no estágio torpedo, período na qual, vários processos morfológicos são observados, tais como a definição do eixo embrionário apical e radicular. O gasto de energia nesta etapa é grande e direcionado às áreas meristemáticas.

Dentre os estádios pré-cotiledonar e cotiledonar, o spot BI se expressa em maior volume no estágio cotiledonar e podendo ser homóloga da **proteína similar as Yippee**. Esta proteína apresentou dois isômeros que aparecem em estádios diferentes. O spot AP esteve presente nos estádios torpedo e pré-cotiledonar em expressão quase semelhante. Já o spot BI foi observado nos estádios pré-cotiledonar e cotiledonar, com aumento de expressão à medida que os embriões somáticos se desenvolviam e comparativamente ao outro isômero (Tabela 7 e 8). As proteínas similares as Yippee pertencem a uma nova família de proteínas: putativa enlace de zinco, altamente conservadas em eucariontes (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>).

Outra proteína que teve uma expressão maior foi o spot AZ, que apresentou a maior expressão entre todas as proteínas identificadas dentro deste agrupamento, sendo mais expressa no estágio pré-cotiledonar. Essa proteína pode ser homóloga da **proteína hipotética** de *Medicago truncatula*, onde sua função molecular é ligar íons ferro, participando no processo de tradução (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>).

Proteínas localizadas num só estágio

Nos diferentes estádios de desenvolvimento poucas proteínas foram expressas exclusivamente em cada estágio. Assim, quatro proteínas foram

observadas no estágio globular, uma no estágio cordiforme, duas no estágio torpedo e quatro no estágio pré-cotiledonar. No estágio cotiledonar, não foi observada nenhuma proteína exclusiva. Estas observações sugerem que poucos genes estariam envolvidos na regulação dos diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. sellowiana* e que a expressão dos genes ocorre anteriormente às alterações morfológicas como sugerido por Dodeman e Ducreux (1996)

Como exemplo, observou-se que a síntese de proteínas de reserva ocorre nos inícios da embriogênese e independentemente de qualquer programa de maturação (DODEMAN *et al.*, 1997). Observou-se também que os genes envolvidos com os estádios iniciais da embriogênese somática são menos expressos (HECK *et al.*, 1995). Alexandrova e Conger (2002) identificaram dois genes relacionados com a embriogênese somática, *DGE1* e *DGE2*, que foram expressos em culturas embriogênicas de *Dactylis glomerata* com uma possível função regulatória.

Na embriogênese somática de cenoura, dois genes, *CHB2* e *CEM6*, foram expressos especificamente no estágio globular a torpedo. *CHB2* é um gene homeobox e o *CEM6* codificam proteínas ricas em glicina contendo seqüências hidrofóbicas, as quais podem ser as glicoproteínas. A transcrição do *CEM6* foi localizada nas células periféricas do embrião em estágio torpedo (KOMAMINE *et al.*, 2005).

CONCLUSÕES

Géis de boa resolução de proteoma 2-DE foram gerados para os diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *Acca sellowiana*. Dos 230 spots visualizadas por 2-DE, 90 foram empalherados entre todos os estádios de desenvolvimento e 62 foram identificados usando géis 2-DE/Maldi tof/MS. As análises permitiram também identificar aquelas proteínas expressas somente em determinados estádios ou aquelas que eram expressas concomitantemente nos diferentes estádios de desenvolvimento. Os estádios iniciais do desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*, globular e cordiforme, apresentaram um padrão protéico semelhante sendo diferente o comportamento das proteínas nos estádios. Já, nos estádios torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar, que podem ser denominados de estádios maduros ou tardios, o padrão protéico entre eles foi semelhante, mas diferente dos iniciais. Observou-se também de maneira geral que o numero de

proteínas expressas nos diferentes estádios aumentou de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos. Muitas das proteínas identificadas apresentaram os valores teóricos dos pesos moleculares e pontos isoelétricos diferentes daqueles observados. Isso pode decorrer das várias metodologias empregadas, onde muitas das seqüências dessas proteínas foram obtidas através do gene que a codifica, sendo o peso e o ponto isoelétrico calculados teoricamente e não a partir do seqüenciamento da proteína obtida em gel de eletroforese. A 11S globulina foi a única proteína de reserva identificada nos embriões somáticos, mostrando que os componentes do meio de cultura, notadamente a fonte de carbono, não permitiram uma síntese e armazenamento de compostos necessários para a conversão dos embriões somáticos em plântulas. Assim, a sincronia e a alta freqüência dos embriões somáticos de *A. sellowiana* mostrou numerosas proteínas envolvidas no processo de embriogênese somática, de tal maneira que este sistema serve como um modelo de estudo para análises protéicas de diversos programas morfogênicos da planta.

Capítulo 2: Análise proteômica de diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *Acca sellowiana*¹.

INTRODUÇÃO

A embriogênese somática pode ser definida como a redeterminação de células somáticas em direção ao desenvolvimento embriogenético e é considerada como a expressão máxima da totipotência celular de plantas superiores. Esta rota morfogênética *in vitro* é considerada como um sistema ideal para estudar os processos de diferenciação partindo-se de célula simples até uma planta inteira. Este sistema apresenta várias vantagens em comparação com a embriogênese zigótica: 1) é facilmente monitorado; 2) o ambiente e as fases de desenvolvimento do embrião somático podem ser controlados; e 3) obtém-se um grande número de embriões somáticos (KOMAMINE *et al.*, 2005).

A partir dos estudos pioneiros realizados sobre a embriogênese somática *in vitro* por Steward *et al.* (1958), buscou-se a identificação dos vários fatores que controlam esta rota morfogênética em diferentes espécies (GUERRA *et al.*, 1999, DAL VESCO E GUERRA, 2001). Contudo, os mecanismos bioquímicos e moleculares que regulam a embriogênese somática ainda são pouco conhecidos.

Durante a indução de células embriogenéticas e nas fases de desenvolvimento do embrião somático, vários genes são ativados resultando na síntese de novos mRNAs e proteínas (CHUGH E KHURANA, 2002). Assim, algumas proteínas como aquelas da família “Late Embryogenesis Abundant (LEA)” são observadas na embriogênese zigótica e somática (ZIMMERMAN, 1993). Proteínas de choque de calor são também sintetizadas durante a embriogênese somática, sendo empregadas para caracterizar estágios específicos deste processo (GYÖRGYÉY *et al.*, 1991).

Os embriões somáticos mostram um paralelo significativo com seus análogos zigóticos em seu desenvolvimento. Durante a fase de maturação dos embriões são estabelecidas importantes rotas de desenvolvimento (HARADA, 1999), tornando esta fase crítica para avaliar a qualidade e a viabilidade da plântula derivada do embrião somático (LIPPERT *et al.*, 2005).

Poucos estudos têm tratado as comparações no nível de proteoma, especialmente em plantas lenhosas. Estes estudos revelam que o processo de desenvolvimento de embriões somáticos é complexo, com numerosas proteínas ainda desconhecidas e que estas estão associadas em muitos casos à qualidade destes embriões somáticos.

A goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) é uma Mirtácea nativa dos estados do Sul do Brasil e do Uruguai. A embriogênese somática nesta espécie é considerada como um sistema modelo para espécies lenhosas (GUERRA *et al.*, 2001). A embriogênese somática de *Acca sellowiana* foi descrita inicialmente por Cruz *et al.* (1990). Posteriormente diversos estudos foram desenvolvidos para melhorar o protocolo de geração via embriogênese somática e compreender as alterações morfológicas e bioquímicas do processo de embriogênese somática. Desta forma, células meristemáticas, originadas da região cotiledonar revelaram características típicas de células embriogênicas após duas semanas em meio de cultura contendo ácido 2,4-Diclorofenoxilacético (2,4-D) (CANHOTO E CRUZ, 1990). Também nesta espécie, a embriogênese somática revelou-se genótipo-dependente e embriões somáticos encapsulados para a obtenção de sementes sintéticas foram convertidos à plântulas (GUERRA *et al.*, 2001). Por outro lado, Dal Vesco e Guerra (2001) mostraram que a suplementação do meio de cultura LPm (VON ARNOLD E ERIKSSON, 1981) com glutamina, asparagina e arginina aumentou as taxas de indução à embriogênese somática e o número de embriões somáticos obtidos. Cangahuala-Inocente *et al.* (2007) observaram aumentos nas taxas de indução e no número de embriões somáticos em meio de cultura LPm suplementado com ácido glutâmico e 2,4-D e observaram que a utilização de sementes sintéticas contendo endosperma artificial proporcionou as maiores taxas de conversão dos embriões somáticos.

Filamentos de estames inoculados em meio de cultura LP, suplementado com Picloram e cinetina (Kin) e posteriormente transferidos para meio líquido suplementado com 2,4-D e 2-isopenteniladenina (2-iP) resultaram na indução e estabelecimento de culturas embriogênicas. A maturação dos embriões somáticos foi observada quando os calos embriogênicos foram transferidos a um meio livre de fitorreguladores (STEFANELLO *et al.*, 2005).

Estudos bioquímicos nesta espécie revelaram que, durante a indução da embriogênese somática, os níveis de proteínas totais diminuíram e os níveis de

açúcares solúveis totais e os de amido aumentaram ao longo dos 30 primeiros dias, mantendo-se constantes até os 120 dias em cultura. Nos embriões somáticos, os níveis de proteínas aumentaram de acordo com a progressão dos estágios de desenvolvimento e os níveis de açúcares solúveis totais e de amido foram altos nos estádios cordiforme e cotiledonar (CANGAHUALA-INOCENTE, 2002).

Estudos proteômicos visam analisar o perfil das proteínas totais de célula específicas, organela ou tecido (BLACKSTOCK E WEIR, 1999). Assim, a proteômica permite avaliar várias propriedades das proteínas, tais como o perfil das modificações pós-tradução ou a interação com outras biomoléculas (FITZGERALD, 2001).

Nos últimos anos a proteômica passou a ser estudada no processo de embriogênese. Assim, Dodeman e Ducreux (1996) procuraram identificar marcadores protéicos ao longo da embriogênese somática de cenoura. Dez proteínas foram específicas para as células em suspensão e provavelmente relacionadas com a calogênese ou a indução da embriogênese. Seis proteínas foram encontradas somente nos embriões somáticos, sendo marcadores específicos deste processo. Dupire *et al.* (1999) analisaram as proteínas expressas nas culturas embriogênicas de tecidos mutantes e de tipos selvagens de *Asparagus officinalis*, classificando 116 proteínas em 20 grupos potencialmente relacionados com a embriogênese somática. Seis polipeptídios foram específicos para o tipo mutante e foram relacionados com a competência dos tecidos à embriogênese somática. Onze proteínas foram detectadas especificamente nos tecidos do tipo selvagens e sua presença poderia estar relacionada com a inibição da embriogênese somática.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar as proteínas expressadas durante diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*.

MATERIAL E MÉTODOS

A indução e obtenção dos embriões somáticos, assim como a extração das proteínas totais e a análise bioinformática foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do Centro de Ciências Agrárias de Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A metodologia do gel bidimensional foi realizada no Laboratório de Expressão Gênica (LEG) do Centro de Ciências Biológicas da UFSC. A análise dos peptídeos pelo espectrômetro de massa

Maldi-ToF foi realizada no Laboratório de Proteoma, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Material vegetal

O meio de cultivo utilizado para a obtenção dos embriões somáticos assim como as condições *in vitro* utilizadas foram detalhas na Seção IV, Capítulo 1.

Extração de proteínas.

O protocolo de extração de proteínas utilizado foi o método por fenol de acordo as especificações de Carpetiere *et al.* (2005) com algumas modificações. A metodologia encontra-se descrita na Seção IV, Capítulo 1.

Quantificação de proteína

As proteínas extraídas foram quantificadas segundo o método de Bradford (1976) utilizando-se a albumina de soro bovino como padrão.

Eletroforese bidimensional (2DGE) de proteínas

O volume correspondente a 100 µg de proteína foi retirado e as proteínas foram fracionadas com acetona usando o Kit 2-D Clean Up (Amersham Biosciences).

A eletroforese bidimensional foi realizada como foi descrito por Carpentier *et al.* (2005). A metodologia encontra-se descrita na Seção IV, Capítulo 1.

Visualização das proteínas

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R250 por 12h e descorados com ácido acético: etanol: água, na proporção de 10:45:45%. Os géis corados foram armazenados em ácido acético 1% a temperatura de 4°C.

Análise dos géis

Os géis corados foram digitalizados com ImageScanner II e calibrados com Labscan 5 software (Amersham Biosciences). As análises de imagem foram realizadas com Image Master 2-D Platinum (Amersham Biosciences). A detecção dos spots foi realizada pelo programa e quando requerido foram editados. Os spots foram quantificados usando o % de volume. Somente os spots que foram

reproduzidos nas três replicatas biológicas foram incluídos nas análises seguintes. Nas comparações pareadas dos proteomas dos tecidos diferentes, observou-se a abundância relativa das diversas proteínas.

Digestão com tripsina

A metodologia seguida para a digestão com tripsina foi descrita por Westermeier *et al.* (2002). Os spots de interesse foram manualmente retirados dos géis, colocados em tubo tipo “eppendorff” de 1,5 mL e descorados com solução de acetonitrila (50%) e bicarbonato de amônio (25 mM) por 1h na temperatura ambiente ou até a remoção do corante. A seguir, as peças de gel foram desidratadas com acetonitrila (100%) por 5 min e secas no “Speedvac” (ThermoSavant, Milford, USA) por 15 min. As peças de gel foram reidratadas em 10 μ L de solução de tripsina (10 μ g.mL⁻¹ de Tripsina Promega, Madison, USA) em bicarbonato de amônio (25mM), pH 8. A digestão foi realizada durante a noite a 37°C. Para a remoção dos peptídeos do gel adicionou-se 30 μ L de solução de extração (50% acetonitrila, 5% Trifluoracético - TFA), homogeneizado no vortex por 30 min a temperatura ambiente e coletando-se o homogenizado em novos tubos tipo eppendoff de 500 μ L obtendo-se um volume final de 100 μ L.

Análise em espectrômetro de massa e interpretação dos dados

Para análise em espectrômetro de massa, o volume obtido foi seco no “Speedvac” por 1h a temperatura ambiente e hidratado com 2 μ L de TFA (0,1%). 1 μ L dos peptídeos foi misturado com 1 μ L da matriz saturada (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico, Sigma) e colocado na placa de aço MTP 384 target TF (Bruker Daltonics). Os peptídeos padrão de calibração externa foram a Angiotensina II [M+H]⁺ mono 1046.5418, Angiotensina I [M+H]⁺ mono 1296.6848, Substancia P [M+H]⁺ mono 1347.7354, Bombesina [M+H]⁺ mono 1619.8223 e ACTH clip(18-39) [M+H]⁺ mono 2465.1983. A massa dos peptídeos foi medida usando um espectrômetro de massa de alto desempenho do tipo MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) Autoflex/MS da Bruker Daltonics. A lista de picos gerados foi analisada usando FlexAnalysistm versão 2 software (Bruker Daltonics) e o algoritmo SNAP. As massas dos peptídeos foram pesquisadas nos bancos de dados da Mascot *on line* (Matrix Science). Os parâmetros utilizados para a aceitação da identificação foram: taxonomia: plantas verdes, enzima: tripsina,

clivagem perdida: 1, modificações variáveis: carbamidometil, valores da massa: MH⁺, erro de peptídeo: 100ppm e monoisotópico. Em adição, as buscas se realizaram sem reprimir a proteína ao PM e pl, e sem qualquer especificação taxonômica.

RESULTADOS

A. Dinâmica das proteínas embrionárias por eletroforese bidimensional

A complexidade celular dos embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento foi claramente evidenciada em nível molecular. A quantificação de proteínas nos diferentes estádios revelou uma concentração semelhante entre o estágio torpedo e o estágio cotiledonar (Figura 1).

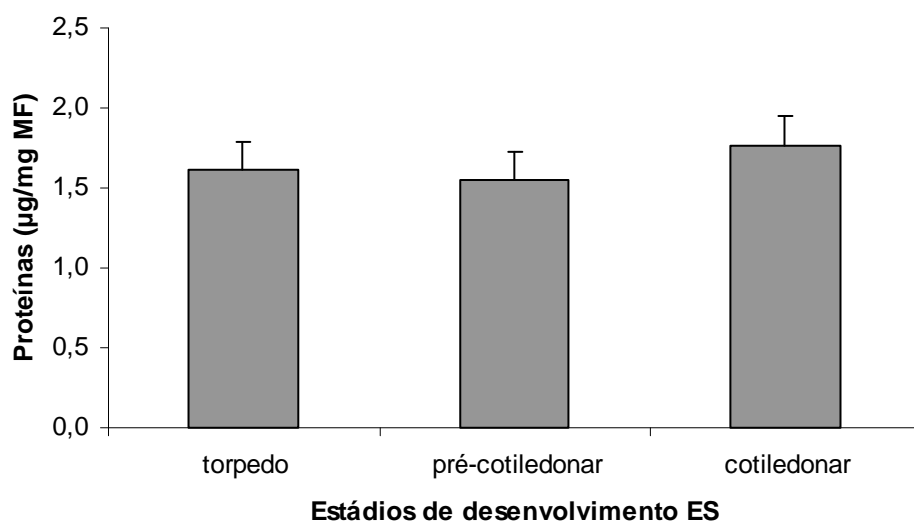


Figura 1. Proteínas totais (µg/mg MF) nos estádios maduros do embrião somático (ES) do acesso 101x458 de *A. sellowiana* segundo a metodologia de Bradford.

Na análise dos géis bidimensionais foram detectados 118 spots entre os estádios torpedo, precotiledonar e cotiledonar do embrião somático (Figuras 2). Esses spots mostraram uma diferença na abundância entre os estádios tardios do embrião somático através de uma avaliação visual ou porque foram exclusivos de cada estágio ou entre dois estádios. Quantificando os spots com maior intensidade estimou-se que as proteínas mais abundantes para os estádios torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar corresponderam a 29%, 28% e 35%, respectivamente, das proteínas totais extraídas nos embriões somáticos.

A análise dos diferentes embriões somáticos pela 2-DE mostrou que houve aumento e/ou diminuição na expressão de proteínas que poderiam estar envolvidas com o desenvolvimento e maturação dos embriões (Figura 2).

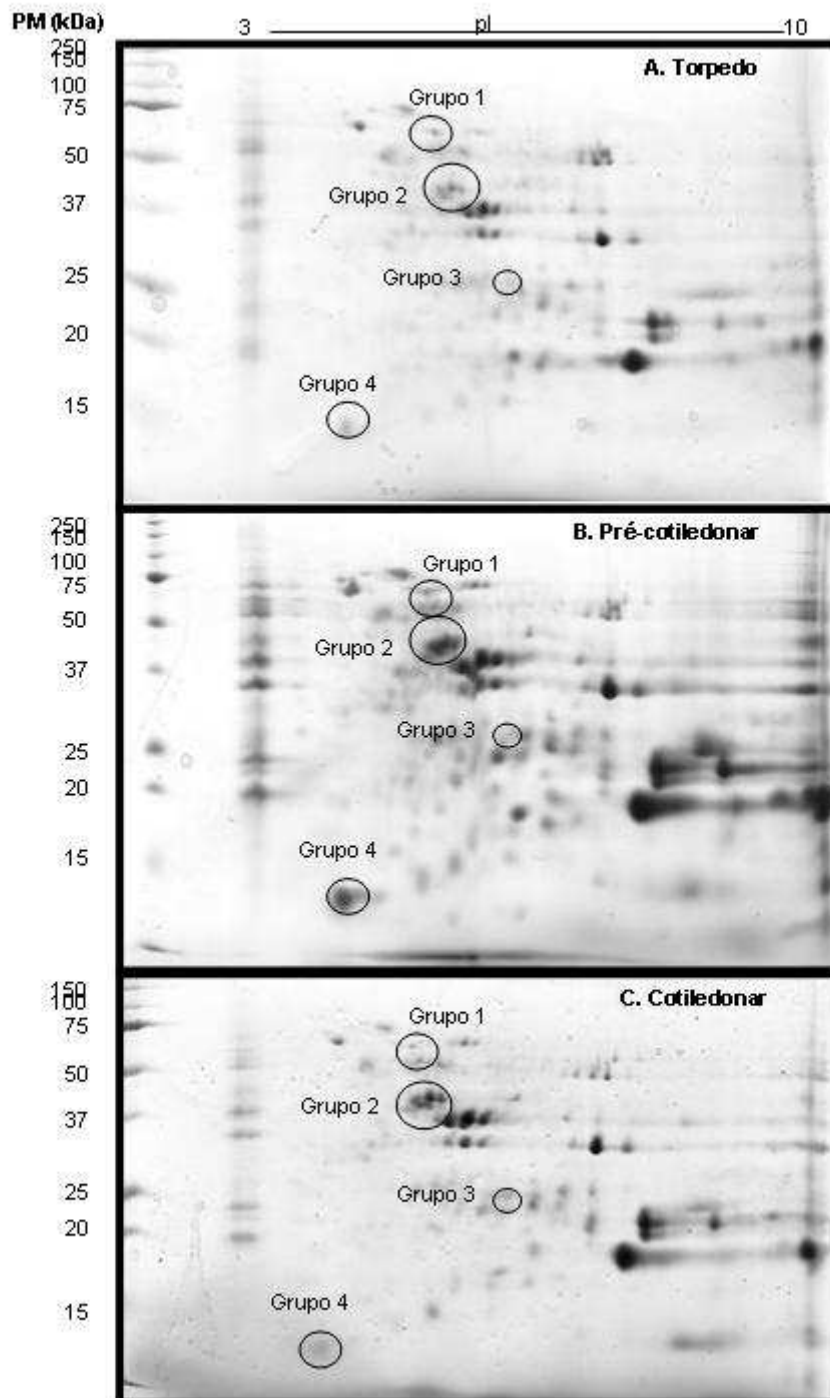


Figura 2: Géis 2-D de diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*: a) estágio torpedo, b) estágio precotiledonar e c) estágio cotiledonar.

Observaram-se 21 spots que apareceram concomitantemente nos três estádios de desenvolvimento, sendo identificados somente 19 spots. Essas proteínas foram localizadas em quatro grupos. No grupo 1 foram localizados os spots que diminuíram a expressão da proteína paralelamente a evolução dos embriões somáticos, correspondentes aos spots M (Figura 3A). No grupo 2 foram localizados os spots que aumentaram a expressão da proteína conjuntamente com o desenvolvimento do embrião, correspondentes aos spots J (Figura 3B). No grupo 3 foram localizados os spots que se mantiveram constantes nos três estádios de desenvolvimento, correspondentes aos spots BE (Figura 3C). Por último, localizou-se o grupo 4, onde expressões diferenciais das proteínas foram observadas no estágio precotiledonar, correspondendo aos spots BD (Figura 3D).

Observou-se também que quatro proteínas coincidiram nos estádios torpedo e precotiledonar (Tabela 1). A expressão destas proteínas diminuiu de acordo com o desenvolvimento do embrião, não sendo observadas no estágio cotiledonar. Nos estádios precotiledonar e cotiledonar foram observadas treze proteínas coincidentes, sendo seis não identificadas (Tabela 1); das quais seis tiveram sua expressão aumentada conforme a evolução do embrião.

Comparando-se os estádios de desenvolvimento observou-se que os spots 39t e 103 foram expressos somente no estágio torpedo podendo os mesmos ser homólogos a proteína *Ciclin-like F-box* de *Medicago truncatula* e proteína hipotética At5g50240 de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. No estágio precotiledonar foi observada a expressão de quatro spots: 21, 59, 39p e 81, com provável homologia às proteínas *NmrA-like* de *Medicago truncatula*, *Osmotin-like* de *Capsicum annuum*, *auxin-induced protein* de *Helianthus annuus* e *Nitrate reductase* de *Medicago sativa*, respectivamente (Tabela 1).

B. Identificação de proteínas por *fingerprint* com tripsina / MALDI-ToF

No total, 50 proteínas foram selecionadas para sua identificação por Maldi-ToF MS. Destas, apenas quatorze não puderam ser identificadas. Foram eliminadas aquelas que não apresentavam homologia com qualquer banco de dados disponível e aquelas que por razões técnicas não geraram peptídeos trípticos.

Os espectros de massa dos peptídeos foram inspecionados manualmente. Por outro lado, em cada caso, pelo menos um dos fragmentos autolíticos da tripsina foi observado, indicando que a amostra foi exposta à protease e que o

espectrômetro de massa operou corretamente. A falta de peptídeos em algumas amostras pode ser atribuída às limitações técnicas como pouca quantidade de proteína, digestão incompleta da proteína, extração inadequada dos peptídeos do gel ou resíduos de SDS que bloquearam a digestão, como indicado por Ross *et al.* (2002) e Lippert *et al.* (2005).

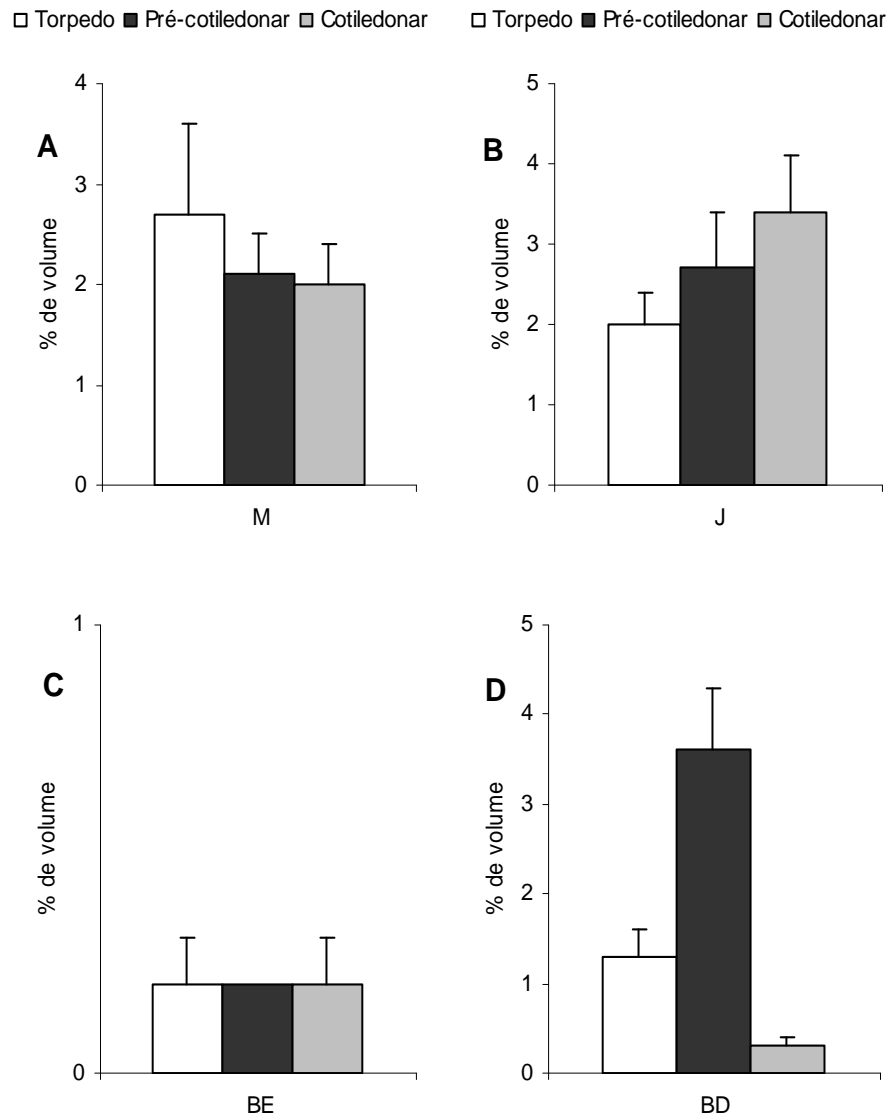


Figura 3. Percentagem de volume normalizado da expressão de algumas proteínas nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*.

Tabela 1: Proteínas identificadas nos estádios maduros do embrião somático de *Acca sellowiana*

letra	Spot ^a	Pmex	plex	% sign	PWt	plt	T ^b (± DP)	P (± DP)	CT (± DP)	Identificador ^c	%cob ^d	N° matches ^e	nome	espécie
C	6t	61	5,9	20	51	5,4	0,3 (0,1)	0,4 (0,1)	0,5	AAC14453	8	3	ACTPOLYGAL NID, Polygalacturonase [Precursor]	<i>Actinidia deliciosa</i>
D	8p	69	5,3	31	74	5,1	0,9 (0,2)	0,3	0,3 (0,1)	Q9S943_VITVI	5	3	Vacuolar invertase 2, GIN2	<i>Vitis vinifera</i>
E	7t	55	5,7	30	54	6,0	1,3 (0,4)	0,5 (0,2)	0,5 (0,1)	Q66PF2_FRAAN	8	3	Putative UDP-rhamnose:rhamnosyltransferase	<i>Fragaria ananassa</i>
H	14ct	49	7,1	41	47	8,6	1,1 (0,4)	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	S00933 / P08036	14	4	DNA-directed RNA polymerase beta chain (fragment)	<i>Saponaria officinalis</i>
J	11t1	45	5,5	35	43	6,0	2,0 (0,4)	2,7 (0,7)	3,4 (0,7)	Q69K99_ORYSA	12	3	Membrane protein-like	<i>Oryza sativa</i>
M	28p	34	5,9	26	35	5,8	2,7 (0,9)	2,1 (0,4)	2,0 (0,4)	Q6L467_SOLDE	7	3	Homeobox-leucine zipper protein HAT7 , putative	<i>Solanum demissum</i>
	39t	21	8,7	27	21	5,4	1,6 (0,3)			Q2HS92_MEDTR	19	2	Cyclin-like F-box	<i>Medicago truncatula</i>
X	46c	25	5,2	38	23	6,0	0,4 (0,2)	0,8	0,3 (0,2)	Q1SYN8_MEDTR	24	3	RNA-directed DNA polymerase (Clone AmLi2)	<i>Medicago truncatula</i>
Y	109c	28	5,4	34	30	5,3	0,3 (0,2)	0,2	0,3 (0,1)	Q949S9_ARATH	11	3	Hypothetical protein At3g18165	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AB	69t	51	5,0	36	52	5,2	0,2 (0,1)	0,1		Q9ZTY7_9SOLN	11	3	Glucose acyltransferase	<i>Solanum berthaultii</i>
AC	9t	57	5,3	44	55	5,5	1,0 (0,1)	0,3 (0,1)		Q42990_ORYSA	11	4	Beta-amylase	<i>Oryza sativa</i>
AD	108c	38	4,7	38	39	5,1	0,2 (0,1)	0,5 (0,1)	0,1	C96799	13	3	Hypothetical protein F22K20.12	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AE	87t	25	7,3	42	26	5,2	0,2	0,7 (0,2)	0,5 (0,2)	S25538 / P35512	21	3	Phenylalanine ammonia-lyase	<i>Malus domestica</i>
AG	50t	23	6,9	29	25	7,0	0,3 (0,1)	0,9 (0,1)	0,3	Q949G5_MEDFA	17	2	Mob1-like protein.	<i>Medicago falcata</i>
	103	24	5,3	28	24	6,7	0,2 (0,1)			Q8GXQ4_ARATH	11	2	Hypothetical protein At5g50240/K6A12_10	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AP	87p	14	7,2	52	14	7,7	0,3 (0,1)	0,1 (0,1)		BAC23053 / P59234	39	3	AB061267 NID, Protein yippeelike	<i>Solanum tuberosum</i>
AQ	9p	60	5,4	41	61	9,4	1,0 (0,3)	0,7 (0,2)	0,5 (0,1)	Q507N4_9MAGN	4	3	Maturase K	<i>Ranunculus kochii</i>
AS	27p	43	5,5	33	39	5,3		1,2	1,1 (0,4)	Q53ZN1_ARATH	16	3	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
I	20c	41	5,1	28	41	5,3	0,7 (0,1)	2,6 (0,4)	1,5 (0,2)	Q2ACE2_SILLA	9	3	Chalcone synthase	<i>Silene latifolia</i>
	21	39	6,2	33	37	6,2		0,7 (0,3)		Q1S086_MEDTR	13	3	NmrA-like	<i>Medicago truncatula</i>
AW	26p	34	7,1	37	27	7,5	0,6 (0,1)	1,0 (0,3)	0,6 (0,1)	Q6IVU7_ARATH	8	3	Beta-expansin 6	<i>Arabidopsis thaliana</i>

AY	29p	34	6,0	32	37	6,4	1,4 (0,1)	1,0 (0,2)	1,3 (0,2)	Q6K9T9_ORYSA	17	3	Metallo-beta-lactamase-like	<i>Oryza sativa</i>
letra	Spot ^a	Pmex	plex	% sign	PWt	plt	T ^b (± DP)	P (± DP)	CT (± DP)	Identificador ^c	%cob ^d	N ^o matches ^e	nome	espécie
AZ	41p	22	8,7	24	26	8,6		3,0 (0,1)	2,6 (0,4)	Q1T1W1_MEDTR	14	2	Hypothetical protein	<i>Medicago truncatula</i>
BA	44p	21	7,3	37	18	8,4		0,8 (0,3)	0,8 (0,2)	S22496	27	3	Peptidylprolyl isomerase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	59	24	6,1	37	27	5,9		0,3		Q6X1B8_CAPAN	17	3	Osmotin-like protein	<i>Capsicum annuum</i>
BD	68p	13	4,1	31	14	6,7	1,3 (0,3)	3,6 (0,7)	0,3 (0,1)	Q2XNS6_ASPOF	22	2	Hypothetical protein	<i>Asparagus officinalis</i>
BE	74p	33	4,8	37	36	5,0	0,2 (0,1)	0,2	0,2 (0,1)	BAD38007 /Q40634	13	3	AP005393 NID, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1	<i>Oryza sativa</i>
BG	85p	15	5,6	29	14	6,7	0,2	0,2	0,9	Q2XNS6_ASPOF	31	2	Hypothetical protein	<i>Asparagus officinalis</i>
BH	88p	22	6,6	30	18	6,1		0,2 (0,1)	0,2	O04957_HELAN	26	2	Cytosolic glutamine synthetase	<i>Helianthus annuus</i>
	39p	34	8,7	48	37	6,0		0,3 (0,1)		T12582 / O22627_HELAN	18	4	Auxin-induced protein	<i>Helianthus annuus</i>
	81	19	8,9	29	17	5,1		1,8 (0,8)		Q6J6X7_MEDSA	24	2	Nitrate reductase (fragment)	<i>Medicago sativa</i>
BI	96p	13	8,3	39	14	7,7		1,2 (0,7)	4,5 (1,1)	BAC23053 / P59234	39	3	AB061267 NID, Protein yippeelike	<i>Solanum tuberosum</i>
BJ	7p	71	5,9	50	77	5,7		0,2 (0,1)	0,3 (0,1)	Q8S562_PHAVU	11	5	KAP-2	<i>Phaseolus vulgaris</i>
BQ	64c	21	9,3	35	25	9,2	1,0	2,4 (0,9)	1,2 (0,4)	T46058 / Q9M2W6_ARATH	23	3	Porin-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BR	72c	16	6	28	19	6,5		0,3 (0,1)	0,1	Q6DMZ2_EUCGL , Q6DMZ4, Q6DMZ1	11	2	Cinnamoyl CoA reductase (Fragment)	<i>Eucalyptus globulus</i>

^a Spots numerados de acordo a Figura 2a, estágio torpeda. Quando especificado a letra corresponde ao p: pré-cotiledonar ou c: cotiledonar.

^b Estádios de desenvolvimento, T: torpeda, PC: pré-cotiledonar e CT: cotiledonar, % de volume normalizado (± desvio padrão).

^c Número de acesso no banco de dados MCDB e NCBI.

^d Percentagem de cobertura dos peptídeos.

^e Número de peptídeos emparelhados

As massas experimentais dos peptídeos trípticos foram comparadas com bancos de dados utilizando o programa Mascot e comparadas com todas as plantas superiores. Na maioria dos casos os dados foram comparados com as proteínas de *Oryza sativa*, seguida de *Arabidopsis thaliana*. As proteínas identificadas foram listadas na tabela 1, mostrando a expressão das proteínas nos diferentes estádios de desenvolvimento, medida pelo volume do spot normalizado (software Image Master Platinum).

A distribuição da massa molar e do pI das proteínas baseados na informação do banco de dados é mostrada na figura 4. Foram identificadas mais proteínas ácidas (69,4%), destacando-se a faixa entre pI de 5 a 7 (Figura 4A). Dentro da massa molar, identificaram-se mais proteínas de baixo peso molecular, entre 10 - 40 kDa (Figura 4B).

Os pesos moleculares e pIs foram calculados e comparados com os valores experimentais que foram estimados diretamente das imagens dos géis (Figura 5). Houve boa correlação entre os valores dos pesos moleculares, como indicado pelas linhas de tendência calculadas e a correlação ideal. A distribuição dos pIs demonstrou que mesmo ocorrendo correlação positiva entre os valores teóricos e experimentais; este valor ficou fora do ideal.

Os valores R^2 das tendências foram calculados (Figura 5), indicando que houve uma significância mais dispersa dos dados no pI se comparados com os dados do peso molecular. Como nenhum padrão interno de calibração foi incluído na primeira dimensão dos géis, os valores de pI podem ser estimados na forma de gradiente de pH dentro dos lotes das tiras de IPG. Como sugerido por Lipperts *et al.* (2005), essas tendências são suscetíveis à perturbação por contaminantes dentro da amostra assim como pelas mesmas proteínas. Além disso, modificações pós-traducionais tais como clivagens dos peptídeos em transição podem influenciar na determinação dos pIs experimentais e assim, inferir em uma predição errada da proteína. Por outro lado, a forte correlação entre o peso molecular teórico e experimental evidenciou uma apropriada identificação da proteína dentro do banco de dados.

C. Classificação das proteínas identificadas

O primeiro passo para interpretar os dados de expressão da proteoma ou genoma é agrupar as proteínas ou genes em base a sua ontologia gênica (GO). O

mais completo GO é de *Arabidopsis thaliana* (RHEE *et al.*, 2003), mas já existem os de outras espécies, tais como *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, entre outras. Assim, as proteínas identificadas puderam ser classificadas numa lista ontológica associada a várias condições que se apresentam graficamente na figura 6.

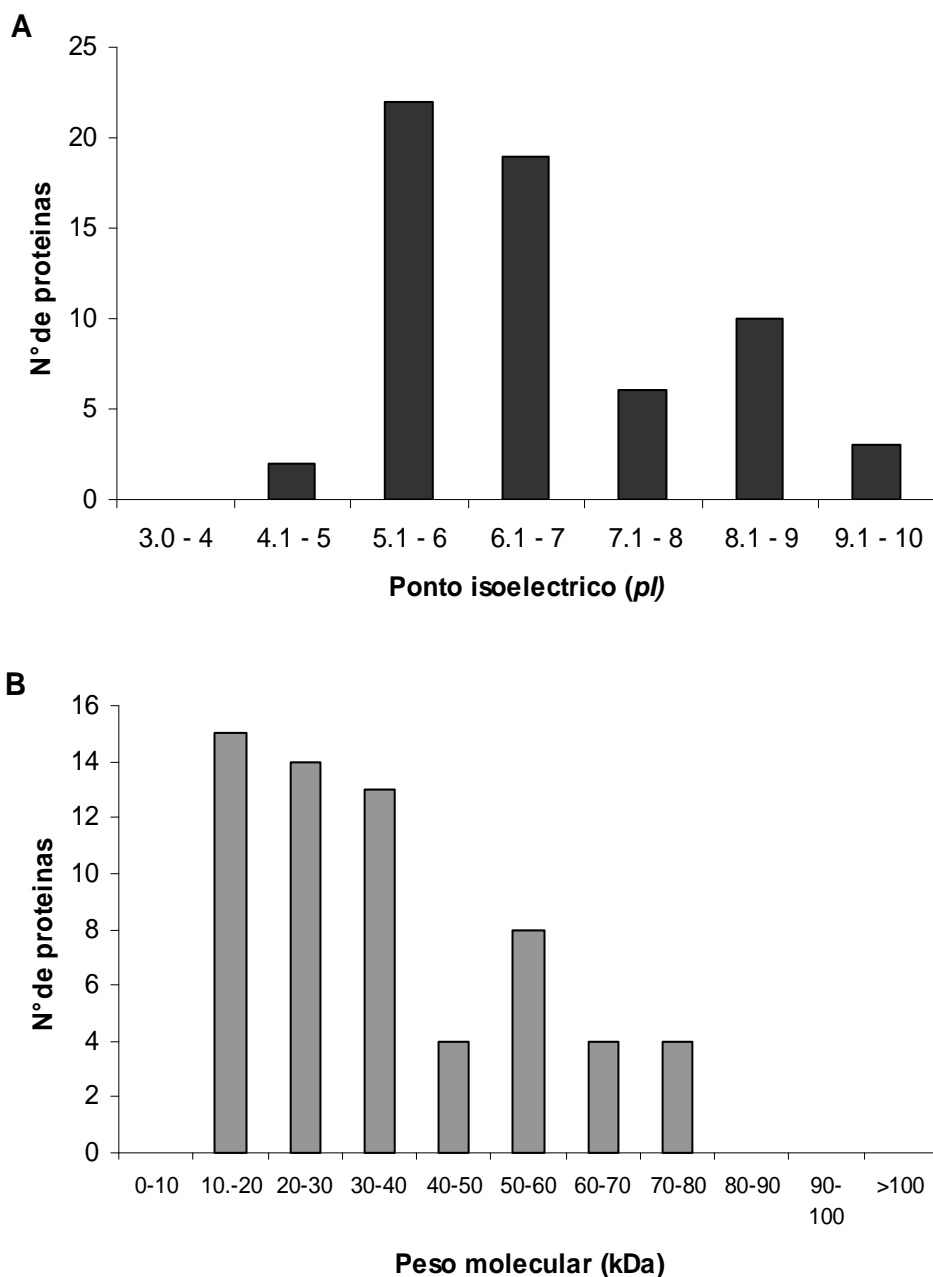


Figura 4. Distribuição dos *pI* e PM das proteínas identificadas em diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. sellowiana*.

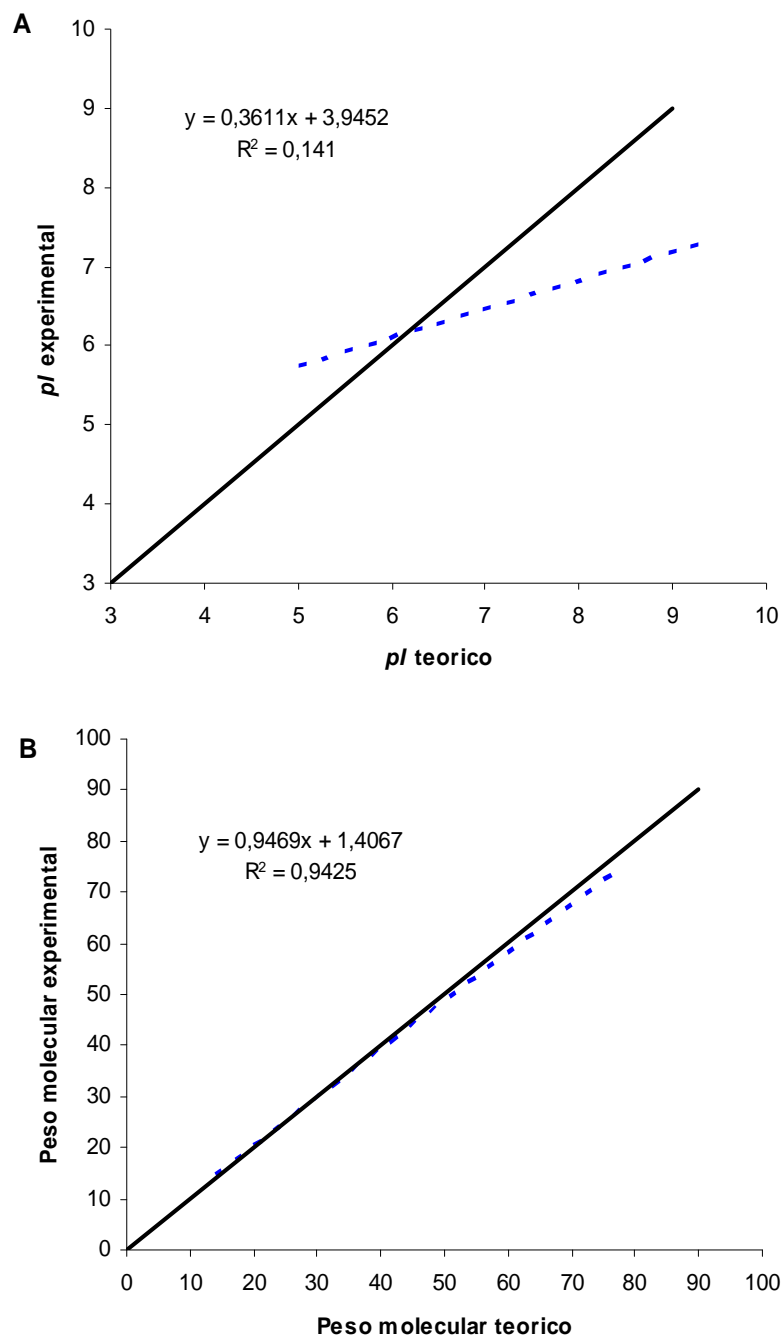
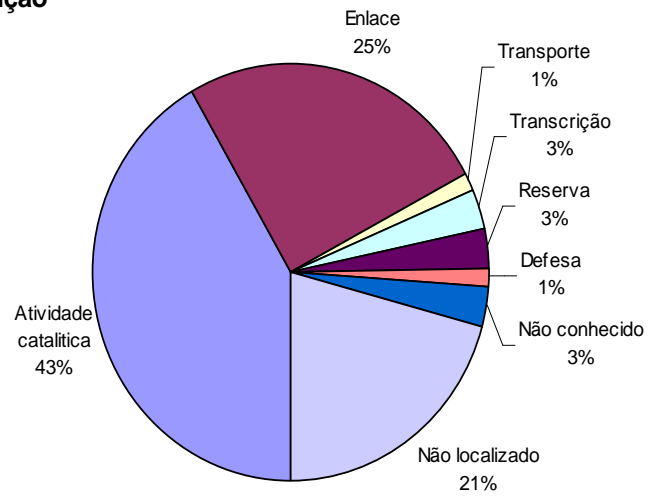


Figura 5: Dispersão dos valores teóricos e experimental dos pesos moleculares (PM) e ponto isoelétrico (pI) para cada proteína identificada em embriões somáticos de *A. sellowiana*. A correlação ideal é indicada pela linha diagonal sólida. Regressão linear, representado pela linha tracejada, foi usada para calcular a tendência de cada estágio. A equação e o valor R^2 das tendências foram escritos em cada figura.

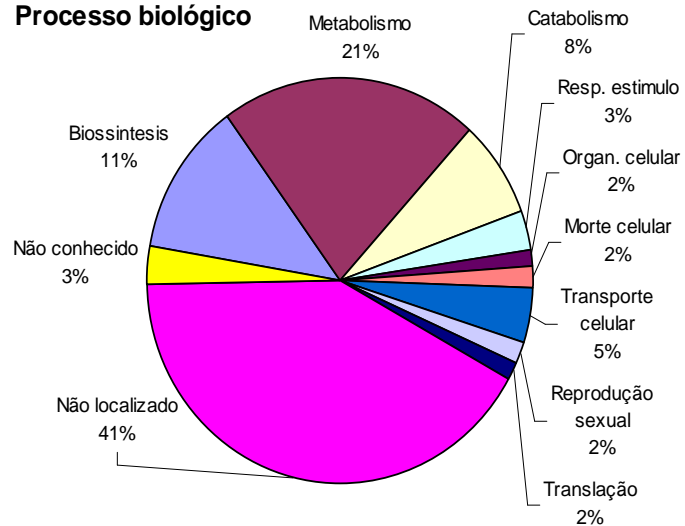
Existem três classes básicas de condições de ontologia definidas pelo consorcio de ontologia gênica (ASHBURNER *et al.*, 2000). A função molecular

Figura 6: Classificação ontológica das proteínas diferenciais de embriões somáticos de *A. sellowiana* em termos de: a. função, b. processo biológico e c. componente celular. Cada proteína da tabela foi buscada no banco de dados da proteômica, ExPASy (**Expert Protein Analysis System**) servidor do Instituto de Bioinformática Swiss (<http://ca.expasy.org>). A porcentagem indica que proporção do total de números de termos ontológicos é contida dentro de cada categoria.

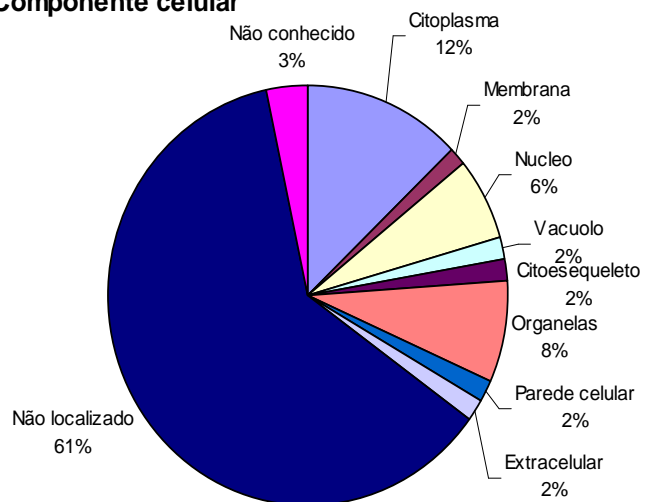
a Função



b Processo biológico



c Componente celular



(Figura 6a) refere-se à tarefa realizada pelo produto individual do gene. O processo biológico (Figura 6b) refere-se ao papel ou caminho biológico pelo qual uma proteína esta envolvida. O componente celular (Figura 6c) refere-se à localização subcelular ou complexo macromolecular em que as proteínas estão associadas.

Assim, tem-se que a maioria das proteínas identificadas possui atividade catalítica e de ligação dentro de todas as proteínas diferencialmente expressas, sendo 43% e 25%, respectivamente. Dentro dos processos biológicos, foram detectadas proteínas envolvidas com o metabolismo (21%), bem como associadas a processos bioquímicos de produção de energia (28%). Por último, foram detectadas mais proteínas localizadas no citoplasma (12%), seguidas de proteínas localizadas nas diversas organelas (8%) tais como, cloroplasto, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Somente 3% das proteínas identificadas não foram encontradas no banco de dados. A porcentagem de proteínas sem função, processo biológico onde agem ou as quais onde não se conhece o componente celular onde elas se localizam foi alta (21%, 41% e 61%, respectivamente), não sendo esclarecido as categorias as quais elas pertencem (Figura 6).

Lippert *et al.* (2005) reportaram a presença de mais proteínas de membrana e nucleares na análise proteômica da embriogênese somática em *Picea glauca*. As proteínas encontradas por eles atuam mais em processos metabólicos e bioquímicos de produção de energia. Por outro lado, o número de proteínas classificadas como desconhecidas foi baixo nas três classes ontológicas (6%, 18% e 5%, respectivamente). Contrariamente, no presente trabalho observou-se grande número de proteínas desconhecidas nas três classes indicadas.

DISCUSSÃO

O presente trabalho gerou informações relevantes e inovadoras dos aspectos proteômicos em nível funcional e molecular em *A. sellowiana*, onde foram analisadas as proteínas abundantes e solúveis dos embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento.

A. Importância dos estudos sobre embriogênese somática da *Acca sellowiana*

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta e apresenta uma grande variedade de plantas nativas ainda não domesticadas e com potencial de uso.

Dentre essas espécies destaca-se a *A. sellowiana*, cujos estudos revelaram que mesma apresenta alta variabilidade genética entre suas populações naturais (NODARI *et al.*, 1997). Por outro lado, esta espécie também possui um valor comercial pela qualidade de seus frutos e já é cultivada em países europeus e oceânicos, tais como a Nova Zelândia (THORP E BIELESKI, 2002). Aplicações biotecnológicas associadas à embriogênese somática nesta espécie podem proporcionar a obtenção de plântulas com características superiores por meio da captura e fixação de ganhos genéticos a partir de genótipos superiores (GUERRA *et al.*, 2001).

No presente trabalho, os modelos de expressão protéicos associados ao desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. sellowiana* foram pesquisados usando a tecnologia de 2-DE acoplada ao Maldi-ToF MS e as bases de dados disponíveis. Apesar de que a técnica de 2-DE possa resultar em inconvenientes para as proteínas de alta abundância como as de reserva, a sensibilidade e a escala das proteínas baseado no MS, nos levou a uma possível identificação de algumas proteínas envolvidas no desenvolvimento do embrião somático (LIPPERT *et al.*, 2005). As mudanças destes perfis de expressão no desenvolvimento do embrião podem indicar um desenvolvimento anormal deste processo ou permitir a caracterização de cada estágio de desenvolvimento destes embriões, de tal maneira que os perfis gerados podem servir como marcadores protéicos da qualidade do embrião a ser gerado (LIPPERT *et al.*, 2005). Também, essa análise permite avaliar características intrínsecas do processo embriogenético, já que a cultura de tecidos gera aos explantes diversos tipos de estresses.

B. Comparação dos perfis de proteínas entre os estádios de desenvolvimento do embrião somático

Os embriões somáticos normalmente reproduzem as características morfológicas do embrião zigótico. Os estádios maduros do embrião somático de *A. sellowiana* apresentaram as mesmas características morfológicas descritas para várias espécies como cenoura (DODEMAN *et al.*, 1996), *Arabidopsis thaliana* (DODEMAN *et al.*, 1997), *Medicago sativa* (DUDITS *et al.*, 1991) e fruteiras como *Citrus* spp. (CARIMI, 2005) entre outros.

No presente estudo, relativamente poucas proteínas estavam presentes nos estádios maduros do embrião somático, especialmente no estágio cotiledonar. Imin

et al. (2004) estabeleceram um mapa proteômico referência para o estágio globular do embrião somático de *Medicago truncatula* e mostraram mais de 2000 proteínas expressas. O fato de que vários autores usam diferentes protocolos de extração, assim como géis maiores corados com prata pode resultar em diferenças de resolução e detecção dos spots entre as espécies (WILKELMANN *et al.*, 2006). Desta forma, Wilkelmann *et al.* (2006) detectaram 200 spots nos embriões somáticos e zigóticos de *Cyclamen persicum* utilizando o protocolo de extração de Gallardo *et al.* (2002), tiras desidratadas de 18 cm de pH 4-7 e géis corados com Coomassie Blue. Já, no presente trabalho, foram detectados 118 spots nos diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos utilizando o protocolo de extração por fenol, com tiras desidratadas de 7 cm de pH 3-10 e géis corados com Coomassie Blue.

Racusen e Schiavone (1988) estudaram o acúmulo de proteínas durante o desenvolvimento dos embriões somáticos em cenoura mostrando que o número de proteínas era dependente do estágio de desenvolvimento e do tecido analisado, e que poucas proteínas foram detectadas no calo embriogenético e nos embriões somáticos. Três proteínas foram encontradas no calo embriogenético e estas desapareceram nos estádios iniciais de desenvolvimento e re-apareceram a partir do estágio torpedo. Essa mesma informação foi encontrada em diversas espécies como *Pisum sativum* (STIRN E JACOBSEN, 1987), *Dactylis glomerata* (HAHNE *et al.*, 1988), *Medicago sativa* (GIROUX E PAULS, 1996), *Daucos carota* (DODEMAN E DUCREUX, 1996), *Asparagus officinalis* (DUPIRE *et al.*, 1999) ou *Cyclame persicum* (WINKELMANN *et al.*, 2006).

No presente trabalho foi identificado duas proteínas que se expressam no estágio torpedo, quatro proteínas que se expressam no estágio precotiledonar e para o estágio cotiledonar não foi registrada nenhuma proteína. Estas observações sugerem que poucos genes estariam envolvidos na regulação dos diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. sellowiana* e que a expressão dos genes ocorre antes das mudanças morfológicas.

B.1 Estádio torpedo do embrião somático

Diversos estudos da expressão gênica espacial sugerem que os embriões zigóticos e somáticos mostram um programa similar de desenvolvimento (DODEMAN *et al.*, 1997). Assim, neste estudo observamos a presença de duas

proteínas no estágio torpedo, para as quais as análises mostraram que seus homólogos poderiam ser a proteína similar a Ciclina F-box e a proteína hipotética At5g50240 (Spot 39t e 103, respectivamente).

A proteína similar a Ciclina F-box é um complexo protéico que apresenta a característica das proteínas que a conforma. As ciclinas são reguladoras primárias da atividade das ciclinas dependentes de quinases (Cdks), as quais possuem papel crítico no controle da progressão do ciclo celular em eucariotos (WANG, *et al.*, 2004) e também se encontram implicadas no controle da transcrição gênica e outros processos (MORGAN, 1997). Este controle é evolutivamente conservado. A ativação seqüencial e transiente do complexo CDK-ciclina dita a progressão unidirecional do ciclo celular. E devido à importância no crescimento e desenvolvimento, a ativação do CDK-ciclina deve ser estritamente controlada (VERKEST *et al.*, 2005).

Novas Cdks em plantas mostram novas características do ciclo celular, especialmente no controle das moléculas envolvidas e sua regulação (DEWITTE E MURRAY, 2003), de tal maneira que grande número de diferentes cDNAs codificam para ciclinas tipo A e B, mostrando que elas são evolutivamente conservadas em plantas (SETIANDY *et al.*, 1995). O tipo B representa o maior grupo de ciclinas. Elas aparecem durante a fase G2, regulando a transição de G2 a M, e são destruídas quando as células entram em anáfase. As ciclinas, por sua vez, controlam a entrada e saída da fase M (ITO *et al.*, 1998). Alguns autores reportam que a expressão dos genes ciclinas é um bom marcador da atividade mitótica (SETIANDY *et al.*, 1997).

O domínio F-box foi descrito como uma seqüência chave encontrada na ciclina-F que interage com a proteína SKP1 (BAI *et al.*, 1996). Esta estrutura chave e relativamente conservada esta presente em numerosas proteínas e serve de ligação entre a proteína alvo e a enzima conjugadora de ubiquitina. Os complexos SCF (ex. Skp1-Cullin-F-box) possuem um papel similar as E3 ligase no caminho de degradação protéica (PATTON *et al.*, 1998).

A degradação das ciclinas é um passo essencial para a progressão do ciclo celular. As ciclinas tipo A e B contêm uma seqüência chave conhecida como *destruction box*, que se funde a proteínas estranhas. O produto dessa proteína híbrida é susceptível a proteólise na mitose. Durante o curso da degradação, ambas ciclina e a forma híbrida conjugam-se com a ubiquitina. As propriedades cinéticas do conjugado indicam que a ciclina é degradada por proteólise dependente da ubiquitina (GLOTZER *et al.*, 1991).

A proteína hipotética At5g50240 apresenta características semelhantes às proteínas L-isoaspartil-O-metiltransferase (PIMT). Essa proteína funciona como uma enzima que repara proteínas danificadas pela idade; em que a asparagina e aspartato são espontaneamente desaminados e isomerizados em resíduos de L-isoaspartil (GEIGER E CLARKE, 1987; THAPAR *et al.*, 2002). Em plantas, a atividade da proteína L-isoaspartil-O-metiltransferase foi identificada em monocotiledôneas, dicotiledôneas e algas verdes (MUDGETT E CLARKE, 1993). A atividade enzimática da PIMT é detectável em alguns tecidos, exceto as sementes (THAPAR *et al.*, 2001). Interessantemente, detectaram-se níveis mais altos de PIMF nas sementes, nas quais a degradação de proteínas espontâneas pode ser severa como no envelhecimento das sementes, durante a desidratação e a quiescência (MUDGETT E CLARKE, 1994).

B.2 Estádio precotiledonar do embrião somático

O estágio precotiledonar é um estágio de transição entre o torpedo e cotiledonar, onde o crescimento longitudinal e a diferenciação dos cotilédones são evidentes. Neste estágio foram identificados quatro proteínas, para as quais seus homólogos poderiam ser a proteína NmrA-like, Osmotin-like, auxin-induced e Nitrate reductase (spots 21, 59, 39p e 81, respectivamente).

A proteína tipo NmrA reprime a transcrição envolvida com a regulação do metabolismo do N, descrito pela primeira vez em *Aspergillus nidulans* e membro da superfamília reductase desidrogenase de cadeia curta (STAMMERS *et al.*, 2001; LAMB *et al.*, 2003). Recentemente, técnicas proteômicas detectaram proteínas NmrA-like em raízes de *Medicago truncatula* colonizadas com *Glomus mosseae* e essas proteínas foram relacionadas à simbiose (BESTEL-CORRE *et al.*, 2002).

A proteína similar a osmotina pertence às proteínas relacionadas à patogênese (PR), as quais são induzidas por vários agentes. São estruturalmente diversas e aparentemente restritas a plantas (RUIZ-MEDRANO *et al.*, 1992) podendo ser taumatinas, quitinases, osmotinas, proteínas PR de tabaco, inibidores alfa-amilase/tripsina, proteínas P21 e PWIR2 de folhas de soja e trigo, entre outras. Essas proteínas estão envolvidas na aquisição de resistência a estresses em plantas, por meio de mecanismos ainda não elucidados (RUIZ-MEDRANO *et al.*, 1992).

As proteínas PR são também observadas em plantas saudáveis (REGALADO E RICARDO, 1996), particularmente, em órgãos e tecidos específicos durante programas de desenvolvimento, tais como germinação (CASACUBERTA *et al.*, 1992), senescência (HANFREY *et al.*, 1996) e floração (VAN ELDIK *et al.*, 1996). Em cenoura, as quitinases podem estar relacionadas na geração de moléculas sinal que estimulam a embriogênese somática (KRAGH *et al.*, 1996). Helleboid *et al.* (2000) identificaram três proteínas PR: β 1,3 gluconase (38kDa), quitinase (32kDa) e osmotin-like (25kDa), excretadas no meio de cultura de calos embriogênicos de *Chicorium hybrida* 474. Essas culturas embriogênicas acumularam 8 vezes mais essas proteínas do que as culturas não embriogênicas, sugerindo que essas proteínas PR poderiam estar relacionadas com o processo de embriogênese somática.

A proteína induzida por auxina pertence à família da aldo-keto redutase (Proteínas da família aldo-keto reductase 29 de novembro, 2006. <http://www.med.upenn.edu/akr/potential.shtml>). Essa família é caracterizada por ligações alfa-beta das proteínas com os nucleotídeos (SCHADE *et al.*, 1990).

Diversos estudos têm demonstrado o papel importante da auxina AIA na morfogênese das plantas. Contudo, o mecanismo de percepção da auxina permanece desconhecido. As respostas à auxina estão relacionadas com mudanças na expressão gênica, provocadas pela interação da auxina, a proteína repressora transcricional Aux/IAA e o complexo ubiquinona-ligase (KEPINSKI E LEYSER, 2005).

O nitrato redutase (NR) catalisa a reação inicial da assimilação de nitrato em plantas superiores, algas verdes e fungos (PELSY E CABOCHE, 1992). A atividade da NR em raízes e cotilédones de plântulas de *Gossypium hirsutum* L. cv. Deltapine 16 promoveu uma rápida germinação das sementes alcançando o máximo depois de um dia de embebido em água. Depois, a atividade declinou até a emergência e esverdeação dos cotilédones, quando teve novo incremento (RADIN, 1974). Já Fukuoka *et al.* (1996) detectaram o acúmulo de mRNA de NR aos 14 dias depois do início da cultura, quando os embriões zigóticos se encontravam no estágio cordiforme e torpedo. Esses resultados sugerem que a expressão de NR na embriogênese foi transcricionalmente regulada.

C. Significado funcional das proteínas expressas diferencialmente

No presente estudo foi identificado 19 proteínas que se expressaram exclusivamente nos três estádios de desenvolvimento. Outras proteínas também são expressas nos três estádios, mas foram observadas nos estádios iniciais: globular e cordiforme (Seção IV, Capítulo 1). Como mencionado anteriormente, seis proteínas foram observadas nos estádios torpedo e precotiledonar e treze nos estádios precotiledonar e cotiledonar.

Proteínas do metabolismo de carboidrato

As reações de transferência de glicosídeos são as biotransformações mais importantes da terra, já que respondem por a biosíntese e hidrólise do volume de biomassa (KLEENE E BERGER, 1993). A biosíntese de polissacarídeos e hidratos de carbono complexos é de importância biológica, porque essas moléculas regulam diretamente uma ampla gama de funções, de estruturas e armazenamento de sinais específicos. A biosíntese de dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos envolvem a ação de diferentes glicosiltransferases, enzimas que catalisam a transferência de metades de açúcares da molécula doadora a moléculas receptoras específicas, formando pontes glicosílicas (CAMPBELL *et al.*, 1997).

A **proteína poligalacturonase**, possível homóloga do spot C, catalisa ligações α -1,4-D-galactosidurônico por hidrólise em pectatos e outras galacturonanas. Esta proteína pertence à família das glicosídeo hidrolases, enzimas que hidrolisam pontes glicosílicas entre dois ou mais carboidratos, ou entre carboidratos e não carboidratos (HENRISSAT *et al.*, 1995). Nas frutas, as poligalacturonases têm papel importante no metabolismo da parede celular durante a maturação (FISCHER E BENNETT, 1991). No presente trabalho, observamos essa proteína nos três estádios analisados, sendo sua expressão semelhante nos três estádios, mas em sentido crescente.

Zhang *et al.* (2006) analisaram os mecanismos moleculares que o TDZ induziu nas culturas embriogênicas *Medicago sativa*. Eles reportaram que nos 28 dia do tratamento com TDZ, algumas etiquetas de seqüência expressas (ESTs) relacionadas à formação dos elementos traqueais foram isoladas, as quais incluíam sacarose sintase para a biosíntese de sacarose, poligalacturonase para a degradação de pectina e ACS para a biosíntese de etileno.

A invertase vacuolar 2 é uma enzima que hidrolisa sacarose em glicose e frutose, existindo em numerosas isoformas que diferem em suas características bioquímicas e em sua localização subcelular. As invertases com pH ácido (invertases ácidas) ionicamente estão unidas à parede celular (invertase da parede celular) ou acumuladas como proteínas solúveis no vacúolo (invertase vacuolar). As invertases com pH neutro ou alcalino (invertase neutra e alcalina) são provavelmente proteínas citoplasmáticas (TANG *et al.*, 1999).

No presente trabalho, os spots D são provavelmente homólogos desta proteína. Essa proteína apresentou-se nos três estádios finais de desenvolvimento, sendo sua maior expressão no estágio torpeda, decrescendo para o estágio precotiledonar e mantendo-se igual no estágio cotiledonar. Como é de se esperar, o último estágio de desenvolvimento, o cotiledonar, é uma etapa de armazenamento de compostos de reserva, especialmente amido e algumas espécies de proteínas. Portanto, a expressão desta proteína estaria diminuindo, mantendo sua expressão somente para a manutenção dos processos básicos da célula.

Tang *et al.* (1999) observaram as funções da invertase da parede celular e da invertase vacuolar em embriões zigóticos de cenoura. Seus resultados mostraram que as invertases ácidas têm um papel importante no desenvolvimento inicial da planta, provavelmente controlando a composição dos açúcares e dos fluxos metabólicos.

Por outro lado, observou-se que entre a segunda a quinta semana de maturação dos embriões somáticos em *Picea mariana* e *P. glauca*, a atividade das invertases decresceu rapidamente, resultando no decréscimo da glicose e frutose celular, enquanto que a sacarose celular se manteve constante (IRAQI E TREMBLAY 2001).

UDP-ramnose ramnosiltransferase pertence à família das enzimas UDP glicosiltransferase (UGT), que catalisam a adição do grupo glicosil de um UTP-açúcar a uma pequena molécula hidrofóbica (CAMPBELL *et al.*, 1997). No presente trabalho, sugere-se que o spot E sejam os homólogos da proteína UDP-ramnose ramnosiltransferase, observando-se sua maior expressão no embrião torpeda e decrescendo sua expressão, segundo a evolução deste. Provavelmente a presença desta enzima se deva à suplementação de maltose exógena no meio de cultura e que essa enzima possa estar envolvida na glicólise. Também o decréscimo da

expressão dessa proteína poderia ser atribuído ao tempo de cultivo, onde a disponibilidade da fonte de carbono foi reduzida.

Em *Cyclamen persicum* foram identificadas quatro proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos tanto no embrião somático quanto no embrião zigótico, entre elas a UDP-glicose pyrophosphorylase (WINKELMANN *et al.*, 2006). Igualmente a expressão do gene, sua atividade e volume da enzima UDP-glicose pyrophosphorylase foi regulada nas folhas de *A. thaliana*, quando era suplementada sacarose no meio de cultura (CIERESZKO *et al.*, 2005).

A β amilase é encontrada em plantas e bactérias e hidrolisa ligações alfa-1,4-glicosídicas em polissacarídeos tipo amido, removendo sucessivamente unidades de maltose das cadeias não reduzidas (VIKSONIELSEN *et al.*, 1997). No presente trabalho, esta proteína poderia ser homóloga do spot AC, presente nos embriões somáticos nos estádios torpedo e pré-cotiledonar. Sua expressão foi maior no estágio torpedo, período na quais vários processos morfológicos são observados como a definição do eixo embrionário, apical e radicular. O gasto de energia nesta etapa é grande e direcionado às áreas meristemáticas.

A β expansina 6 é uma proteína extracelular da parede celular capaz de mediar a extensão da parede celular em condições ácidas sem ruptura hidrolítica dos componentes estruturais da parede celular (LEE *et al.*, 2001). Genes de expansina são encontrados em todas as partes da planta e em todo o reino vegetal (LI *et al.*, 2002) e seu padrão de expressão indica que eles estão relacionados com o crescimento celular e a diferenciação de tecido (CHO, 2001). A expressão endógena do gene expansina modula o crescimento foliar e a abscisão pedicelar em *Arabidopsis* (COSGROVE, 2000). No presente trabalho, essa proteína foi observada nos três estádios de desenvolvimento (spot AW): torpedo, precotiledonar e cotiledonar, sendo sua maior expressão no estágio pré-cotiledonar. Nos estádios torpedo e cotiledonar a expressão desta proteína foi menor e igual.

RNA polimerase - dependente de DNA - cadeia beta

Proteínas de biosíntese de purinas

Dentre as proteínas observadas nos três estádios de desenvolvimento encontram-se as proteínas **RNA polimerase – dependente de DNA – cadeia beta** (spot H) e **Maturase K** (spot AQ) relacionadas com a biosíntese dos biopolímeros DNA e RNA respectivamente, no cloroplasto (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). A

expressão destas proteínas foi maior no estágio torpedo, etapa na qual se evidenciam as regiões meristemáticas tanto apical quanto radicular. Também, nesta etapa se diferenciam as células do procâmbio que posteriormente darão origem ao sistema vascular da planta.

Por outro lado, dentro das proteínas identificadas em todos os estádios de desenvolvimento observou-se que elas apresentaram as maiores percentagens de volume nos estádios maduros do embrião somáticos. A **fosforibosil formilglicinamidina ciclo-ligase** (spot K) está envolvida com o processo de biossíntese dos nucleotídeos purinas nos cloroplastos e mitocôndrias (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>), sendo considerada uma proteína conservativa de todo o processo de formação celular. Essa proteína diminuiu de acordo com o desenvolvimento do embrião somático, indicando que sua atividade foi regulada quando o embrião somático amadureceu, isto é, ela entraria em um período de latência até a etapa de germinação.

Proteínas da divisão celular

A **proteína peptidilprolil isomerase** (PPlases) catalisa a isomerização cis/trans de peptídeos com enlaces prolina, o qual é um processo intrinsecamente lento (LANDRIEU *et al.*, 2002), levado a cabo em bactérias e células eucariotes (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). Observou-se que as PPlases em plantas podem resgatar o fenótipo sensível-temperatura da mutação do homólogo hPIN1 ESS1/PTF1 de *S. cerevisiae* (YAO *et al.*, 2001). O incremento dos mRNA da expressão das PIN1At (*A. thaliana*) e MdPIN1 (*M. domestica*) em células em divisão sugere que os homólogos PIN1 de plantas poderiam estar envolvidos com o processo de divisão celular (LANDRIEU *et al.*, 2000, YAO *et al.*, 2001).

No presente trabalho, como mencionado na seção IV, capítulo 1, essa proteína apresentou-se em volumes crescentes de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento do embrião somático (spot S). Como é comum nas proteínas abundantes, um arrasto do spot poderia ser observado, podendo indicar a presença de múltiplas isoformas diferenciais. Assim, observou-se a presença de isômeros dessa proteína, porém em volumes menores somente nos dois últimos estádios (spots BA). A presença dessa proteína em todo o processo de desenvolvimento do embrião somático poderia ser atribuída ao fato de que a

embriogênese somática ativa processos de divisão celular, levando à formação de zonas permanentes de divisão como as regiões meristemáticas apical e radicular.

A proteína similar a Mob1, homóloga do spot AG, teve sua expressão nos três estádios maduros do embrião somático. Essa proteína tem três importantes funções no que se refere à estabilidade genômica. É requerida para a duplicação do corpo polar, conclusão da mitose e manutenção da ploidia (LUCA E WINEY, 1998). A presença desta proteína em plantas sugere que esta possui uma função chave no desenvolvimento normal do ciclo celular em eucariotes em geral (BARCACCIA *et al.*, 2001).

Proteínas de metabolismo secundário

Uma proteína presente em todos os estádios de desenvolvimento (spots P) e que apresentou isômero nos últimos três estádios foi à proteína homóloga **fenilalanina amônia-liase** (PAL) de *M. domestica* (spot AE). Em ambos isômeros, a proteína diminui sua expressão, medida pelo volume, de acordo com a progressão nos estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*.

Essa proteína é uma enzima exclusiva de plantas superiores, pertencente a uma família de genes que catalisam a deaminação não oxidativa da fenilalanina a ácido trans-cinâmico (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>), de tal maneira que a presença de isoformas de PAL é comum (Kumar e Ellis, 2001). Por outro lado, ela também é precursora de vários fenilpropanoides como a lignina, flavonoides e cumarinas (HAHLBROCK E SCHEEL, 1989). A PAL também é uma enzima chave na resposta das plantas a estresses variados e sua biosíntese é estimulada por ataques de patógenos, ferimentos de tecidos, irradiação com UV, temperaturas baixas ou níveis baixos de nitrogênio, fosfatos ou ferro (DIXON E PAIVA, 1995).

A glicose aciltransferase é outra proteína relacionada com o metabolismo de produtos secundários, possível homóloga do spot AB. Esta proteína só foi expressa nos estádios torpedo e precotiledonar em volumes semelhantes. A glicose aciltransferase chamada também açúcar poliéster, contribui com a resistência a insetos, ativando o caminho para a produção de metabolitos secundários que são segregados por glândulas do tricoma (LI *et al.*, 1999), sendo um desses caminhos, a biosíntese do ácido clorogênico, que é uns dos polifenóis mais abundantes e difundidos em plantas (STEFFENS, 2000). Uma característica interessante a mencionar é que os embriões somáticos de *A. sellowiana* se desenvolveram a partir

de uma cultura altamente polifenólica. Observou-se também que os embriões zigóticos desta espécie, em contato com o oxigênio ou quando injuriados respondiam por meio da fenolização dos seus tecidos (Dados não mostrados).

A Chalcona sintase (CHS) é uma enzima chave na biosíntese de flavonoides em plantas. Os flavonoides estão envolvidos em várias funções tais como proteção UV, defesa contra ataque de patógenos, nodulação em leguminosa, pigmentação e viabilidade do pólen (HAHLBROCK E SCHEEL, 1989). No presente estudo, o spot I, presente nos estádios torpedo, precotiledonar e cotiledonar, poderia ser considerado homólogo desta proteína. Essa proteína teve sua maior expressão no estágio precotiledonar diminuindo no estágio cotiledonar.

Moriguchi *et al.* (1997) reportaram que dois diferentes genes CHS foram expressos durante a embriogênese somática de citrus e que CitCHS2 poderia regular o acúmulo de flavonoides em culturas celulares de citrus. Em adição, Ozeki *et al.* (1990) reportaram que culturas em suspensão de cenoura num meio livre de 2,4-D, induziram a embriogênese somática quando a síntese de antocianina ocorreu em baixas densidades.

A Cinamil álcool dehidrogenase (CAD) é uma das enzimas específicas do metabolismo da síntese do álcool hidroxicinamil (monolignol) que catalisam a conversão do hidroxicinamaldeído ao correspondente álcool. Os monolignol são precursores monoméricos do complexo fenólico lignina e lignana (ANTEROLA E LEWIS, 2002). Esta proteína pode ser homóloga do spot AS, a qual se apresentou nos embriões precotiledonar e cotiledonar, com uma expressão maior no último estágio. Nestes mesmos estádios observou-se a presença do spot BR que poderia ser homólogo a **proteína Cinamil CoA reductase (CCR)**, a qual também estaria envolvida na formação da lignina (LASKAR *et al.*, 2006).

Proteínas de transporte celular

Uma das maiores proteínas da membrana externa da mitocôndria em eucariotes é a **proteína similar a Porina**, que forma um canal seletivo de anion dependente da voltagem (VDAC), e que funciona como porta de difusão para moléculas hidrofílicas pequenas (BENZ, 1994). Esta foi uma das proteínas encontradas nos três estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. sellowiana*, presente no spot BQ. Observou-se uma maior expressão desta proteína no estágio pré-cotiledonar, período na qual o embrião aumenta em tamanho e peso.

D. Conclusões

Um mapa de boa resolução de referencia de proteoma 2-DE foi gerado para diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *Acca sellowiana*. Das 118 proteínas visualizadas por 2-DE, 36 proteínas foram identificadas usando géis 2-DE/Maldi tof/MS. As análises permitiram também identificar aquelas proteínas expressas somente em determinados estádios ou aquelas que eram expressos somente em três estádios ou entre dois estádios. Observou-se uma alta similaridade entre os proteomas dos embriões somáticos maduros mostrando que somente poucos genes estariam envolvidos na morfogênese destes estádios de desenvolvimento e que a expressão destes genes ocorre antes das mudanças morfológicas. As proteínas identificadas foram classificadas funcionalmente e classes específicas do metabolismo secundário foram discutidas. Foram observadas diversas enzimas glicolíticas e da biosíntese do DNA e RNA, assim como proteínas relacionadas ao estresse ou defesa. O número de enzimas identificadas no processo de ubiquinona/proteosoma permitiria visualizar o controle da proteólise em experimentos futuros. Embora os estudos de proteoma atualmente sejam ainda significativamente menores do que aqueles baseados no genoma; acreditamos que a integração do contexto proteína com o transcriptoma e o metaboloma possibilitará uma melhor compreensão e geração de informações sobre a embriogênese zigótica e somática em plantas.

SEÇÃO V

Considerações finais e
perspectivas futuras

A realização deste trabalho possibilitou a obtenção de resultados importantes e inéditos sobre a caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de *Acca sellowiana*. Os dados obtidos possibilitaram a compreensão de vários aspectos básicos, em especial aqueles relacionados com a função das proteínas, amidos, açúcares, aminoácidos, poliaminas, AIA e ABA, no processo de embriogênese somática e zigótica. A análise das proteínas permitiu conhecer e compreender melhor a sua síntese nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático, assim como o papel que desempenham nesse processo morfogenético. Os resultados obtidos têm implicações relacionadas com a modulação da embriogênese somática nesta espécie, por meio de mudanças e adaptações nas várias etapas deste protocolo regenerativo *in vitro*.

Na Seção II, no trabalho intitulado “Embriogênese somática induzida por estresse químico e físico a partir de diversos explantes de *A. sellowiana*” foram geradas informações relevantes sobre a indução e modulação da embriogênese somática por outros agentes indutores que não são os reguladores de crescimento. Confirmou-se também que a indução de embriogênese somática nesta espécie é genótipo-dependente, observando-se acessos mais responsivos a este padrão morfogenético.

Diversos estudos mostram que a totipotência vegetal é manifestada em qualquer parte da planta. Nesta espécie constatou-se que o tipo de explante utilizado é determinante para a obtenção de culturas embriogênicas e que os tecidos epidérmicos da folha cotiledonar do embrião zigótico e as pétalas mostraram-se os melhores explantes para este processo.

Os fitorreguladores, especialmente as auxinas são considerados os principais agentes indutores da embriogênese somática, é assim que o 2,4-D associado ao 2-IP, bem como o Picloram e Dicamba promoveu a formação de culturas embriogênicas. Por outro lado, sabe-se que fatores estressantes do tipo abiótico podem promover o desencadeamento do processo embriogenético, mas isto, em muitos casos, não é suficiente para manter a dediferenciação celular. As auxinas em baixas concentrações regulam essa dediferenciação, por promover a divisão e a expansão celular por meio da de-metilação do DNA. Nesta espécie, fatores estressantes como choques térmicos e alteração da osmolaridade celular por substâncias osmóticas conjuntamente com 2,4-D em baixas concentrações,

promoveram a embriogênese somática direta sobre as folhas cotiledonares do embrião zigótico.

A partir destes dados, visando um monitoramento mais criterioso das culturas, abrem-se perspectivas para aprimorar o protocolo de obtenção de culturas embriogênicas a partir de tecido somático, tendo em consideração os acessos utilizados, alguns mais responsivos que outros assim como o tipo de explante. A obtenção de culturas embriogênicas estáveis e repetitivas pode levar a uma melhor compreensão dos pontos de controle de todo o processo embriogenético, conforme apontado por outros autores, tais como Zimmerman, 1993; Emons, 1994; Guerra *et al.*, 1999; Neumann, 2000; Von Arnold *et al.*, 2002, Fehér *et al.*, 2003; Fehér, 2005.

Também, a partir da obtenção de embriões somáticos por fatores estressantes, abrem-se novas perspectivas para a identificação e obtenção de marcadores moleculares, bioquímicos e fisiológicos durante o desenvolvimento embrionário. Por outro lado, pergunta-se se os embriões somáticos obtidos por diversos tipos de estresses são similares aos obtidos em meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento. Isto porque em cenoura observou-se que uma resposta ao incremento de temperatura foi a repressão da transcrição de muitas proteínas celulares, bem como a expressão de pequenas proteínas especializadas no choque de calor (HSPs) (PITTO *et al.*, 1983). Metodologias como a separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2-DE) e sua identificação por ferramentas proteômicas, são promissoras neste caso e oferecem a possibilidade de identificar proteínas específicas relacionadas a estes processos.

O trabalho seguinte da Seção II, intitulado “Influência da fonte de carbono na conversão e nas poliaminas endógenas, assim como a utilização do endosperma artificial na conversão *ex vitro* dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*” gerou informações relevantes de como a fonte de carbono influencia na indução, desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos, bem como nos níveis endógenos das PAs. A fonte de carbono não afeta a conversão dos embriões somáticos no período avaliado, cabendo agora conhecer se os níveis das substâncias de reserva tais como as proteínas e amido, bem como os teores endógenos de AIA e ABA foram compatíveis com a modulação destes processos.

Estudos anteriores mostraram que a utilização de endosperma artificial na formação da semente sintética melhorou a conversão e a sobrevivência das

plântulas tanto *in vitro* como *ex vitro*. Aprimorar as soluções que compõem esse endosperma é de vital importância para a propagação clonal massal desta e de outras espécies por meio da embriogênese somática. Isto permitiria superar um ponto crítico dos protocolos desta rota morfogênética, associado ao estabelecimento e aclimatização *ex vitro*. Um estudo de desempenho de produtividade das plantas derivadas de semente artificial em cana de açúcar mostrou que os padrões fisiológicos e genéticos são conservados em clones comerciais (NIEVES *et al.*, 2003a).

Uma melhor compreensão dos fatores associados à embriogênese somática pode ser buscada na interface entre os modelos de embriogênese somática e zigótica (ZIMMERMAN, 1993; MINOCHA *et al.*, 1999). Assim, na Seção III, o trabalho intitulado “Aspectos histológicos e bioquímicos da embriogênese zigótica de *Acca sellowiana*”, foram obtidos resultados importantes sobre o metabolismo de várias substâncias, tais como proteínas, amido, aminoácidos, poliaminas, AIA e ABA na embriogênese zigótica. Ressalta-se que os estudos dos diferentes parâmetros bioquímicos durante o desenvolvimento embrionário de *A. sellowiana* fornecerão subsídios para a melhoria do sistema de embriogênese somática nesta espécie. Esta contribuição poderá ser realizada por meio de alterações na composição do meio de cultura, viabilizando esse processo morfogênético como ferramenta para a propagação massal e a conservação dessa espécie.

Durante o desenvolvimento da semente de *A. sellowiana*, observou-se que o conteúdo de proteínas solúveis manteve-se constante, apresentando valor máximo no embrião maduro. Este aumento no conteúdo de proteínas poderia ser interpretado como decorrente da síntese de novas proteínas de reserva, notadamente as LEA (BEWLEY E BLACK, 1994). Destaca-se a necessidade de continuidade destes estudos com a identificação qualitativa de proteínas específicas nos diferentes estágios de desenvolvimento do embrião zigótico por meio de análise proteômica.

O trabalho seguinte da Seção III, intitulado “Variações bioquímicas da embriogênese somática e dos estágios de desenvolvimento do embrião somático de *Acca sellowiana*”, gerou informações relevantes sobre as variações no conteúdo endógeno de proteínas, amido, aminoácidos, PAs, AIA e ABA, durante a indução e desenvolvimento de embriões somáticos.

O padrão de síntese e acúmulo de proteínas e aminoácidos nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático guardou um paralelo com o padrão observado ao longo do desenvolvimento do embrião zigótico. Estes resultados, especialmente aqueles relacionados com as proteínas são importantes para futuros estudos do processo de conversão dos embriões somáticos. Sugere-se que sejam ampliados os estudos pulsos de 2,4-D, com meios isentos deste fitorregulador combinados com a incorporação de substâncias promotoras da síntese protéica e o ABA, um promotor da síntese de proteínas de reserva e LEAs. Posteriormente, sugerem-se avaliações da síntese e acúmulo de substâncias de reserva e suas relações com as taxas de conversão dos embriões somáticos.

Para as PAs observaram-se diferenças nos padrões de síntese e acumulação entre embriões somáticos e zigóticos, revelando a necessidade de ajustes na composição do meio de cultura. Isto é relevante porque estas substâncias afetam a síntese de outros compostos endógenos, tais como a auxina AIA, responsável, entre outras pelo estabelecimento da polaridade do embrião. Também se sugere uma análise do conteúdo de AIA e ABA em todos os estádios de desenvolvimento, já que o AIA pode estar relacionado com a diferenciação do embrião e o estabelecimento da simetria bilateral nos estádios iniciais da embriogênese (KONG *et al.*, 1997)

Por ultimo, dentro da Seção III, o trabalho intitulado “Aspectos bioquímicos e hormonais durante a germinação dos embriões zigóticos e somáticos de *Acca sellowiana*”, foram geradas informações relevantes sobre as mudanças bioquímicas e fisiológicas ocorridas durante a germinação e conversão dos embriões zigóticos e somáticos de *A. sellowiana*. Tanto na germinação do embrião zigótico quanto na conversão do embrião somático foram detectadas variações no conteúdo de açúcares e amido, observando-se que as principais substâncias de reserva mobilizadas durante este processo são os carboidratos. Enquanto que os teores de proteínas mostraram-se estáveis. Para complementar esta informação, sugere-se um estudo histoquímico *in vivo* comparativo das mudanças bioquímicas durante a germinação dos embriões, especialmente nas primeiras fases desde processo.

Para os hormônios endógenos AIA e ABA observaram-se diferenças nos padrões de síntese e degradação entre embriões somáticos e zigóticos, sugerindo que um dos fatores para a baixa taxa de germinação dos embriões somáticos é o alto conteúdo de ABA endógeno a partir do décimo dia de germinação, o que

poderia inibir a ação das giberelinas e da α -amilase para a mobilização do amido. Sugere-se avaliar o uso do Fluridone, inibidor da síntese de ABA na conversão dos embriões somáticos em plântulas com o propósito de diminuir os níveis endógenos de ABA. Isto porque, altas concentrações de Fluridone apresentaram resultados semelhantes aos observados com o uso da giberelina nas sementes dormentes. Se ABA for adicionado ao meio de cultura combinado com Fluridone, o estímulo de germinação pelo Fluridone foi aumentado sugerindo que seu efeito do Fluridone sobre a germinação das sementes dormentes está associado à inibição da síntese de ABA e que esta síntese seja essencial para a expressão da dormência nas sementes (GRAPPIN *et al.*, 2000).

Sugere-se de igual forma um estudo comparativo entre a síntese e degradação das giberelinas e etileno. A produção de etileno pelas sementes começa imediatamente após o início da embebição de água e aumenta com o tempo (NASCIMENTO, 2000). Takayanagi e Harrington (1971) encontraram somente um pico de produção de etileno durante a germinação de sementes de canola, coincidindo com a emergência e a alongação da radícula, a expansão do cotilédone, e a ruptura da testa. Em alface, o maior aumento na produção de etileno foi observado durante a emissão da radícula (SAINI *et al.*, 1986; FU E YANG, 1983). Entretanto, de acordo com Small *et al.* (1993), o maior aumento na evolução de etileno durante a germinação de sementes de alface ocorreu após a emissão da radícula. Outros estudos sugeriram que etileno pode melhorar o vigor e estimular o metabolismo das sementes. Em sementes de amendoim e algodão, por exemplo, houve um decréscimo paralelo no vigor e na quantidade máxima de etileno produzida durante a germinação (KETRING, 1977).

De igual forma sugere-se avaliar a atividade enzimática da α -amilase e das peroxidases, as quais incluem um grupo de enzimas capazes de catalisar a oxidação de componentes celulares, tais como H_2O_2 ou peróxidos orgânicos (KVARATSKHELIA *et al.*, 1997). Em plantas, a ação desse grupo de enzimas se relaciona com a proteção antioxidativa. A atividade das peroxidases pode aumentar em plantas submetidas a diversos tipos de estresse (SIEGEL, 1993). Sob condições de estresse, as plantas tendem a aumentar a atividade das peroxidases as quais são as primeiras enzimas a ter atividade alterada, independentemente do substrato utilizado ou do estresse aplicado (SIEGEL, 1993). As peroxidases podem ser consideradas marcadores bioquímicos de estresses bióticos e abióticos (LIMA *et al.*,

1999) e parecem ser as moléculas chaves para a adaptação das plantas ou de seus órgãos separadamente às mudanças ambientais (GASPAR, 1986).

Na Seção IV, intitulada “Análise proteômica dos estádios de desenvolvimento do embrião somático de *Acca sellowiana*”, foram obtidas informações inéditas e importantes sobre a expressão de proteínas nos diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático. Os resultados mostraram que os estádios iniciais do desenvolvimento (globular e coração) do embrião somático de *A. sellowiana*, apresentaram um padrão protéico semelhante sendo diferente o comportamento das proteínas nesses estádios. Já, nos estádios torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar, que podem ser denominados de estádios maduros ou tardios, o padrão protéico entre eles foi semelhante, porém diferente dos padrões observados nos estádios iniciais.

As proteínas identificadas foram classificadas funcionalmente e classes específicas associadas ao metabolismo secundário foram discutidas. Foram observadas diversas enzimas glicolíticas e da biossíntese do DNA e RNA. A observação de isoformas múltiplas de várias enzimas como as do metabolismo secundário (ex. flavonóides) sugere oportunidades para o estudo deste metabolismo usando uma aproximação comparativa da proteômica 2-DE. Similarmente, foram observadas proteínas relacionadas ao estresse ou defesa, o que pode permitir avaliar os estresses em nível de proteoma.

Na embriogênese somática *in vitro* as auxinas têm uma dupla influência, sendo necessário distinguir entre as exógenas e endógenas. As exógenas, tais como o 2,4-D, são usadas para a indução de culturas embriogenéticas; já as endógenas, como o AIA, afetam a morfogênese. A presença de 2,4-D no meio de cultivo, como agente indutor da embriogênese somática em *A. sellowiana*, modulou a síntese de proteínas, ativando ou desativando genes durante o desenvolvimento do embrião somático. Várias das proteínas identificadas estão relacionadas ao estresse abiótico, possivelmente causado pela presença do 2,4-D no meio de cultura. Recomenda-se um estudo mais aprofundado do mecanismo de de-metilação e metilação do DNA afetado pelo 2,4-D, conjuntamente com uma análise molecular, para o estabelecimento dos efeitos dose-resposta. Análises de DNA de calos embriogênicos e não embriogênicos de *Eleuterococcus senticosus* mostraram que os níveis de metilação total foram menores nos calos embriogênicos. Similarmente, 16,9% de sítios 5'-CCGG-3' do genoma dos calos não embriogênicos foram

metilados, enquanto que 11,2% destes sítios foram metilados nos calos embriogênicos. A hipermetilação do DNA dos calos não embriogênicos reflete uma expressão marcante desta característica molecular, a qual se relaciona com os padrões da expressão gênica (CHAKRABARTY *et al.*, 2003).

A 11S globulina foi a única proteína de reserva identificada nos embriões somáticos. Isto nos mostra que os componentes do meio de cultura, notadamente a fonte de carbono e N não permitiram a síntese e armazenamento de compostos necessários para a conversão dos embriões somáticos em plântulas. Isto explicaria a baixa taxa de conversão observada tanto diretamente no meio de cultura (conversão direta) quanto por meio da técnica de semente sintética (conversão indireta). Desta maneira, a identificação de proteínas de reserva nos embriões zigóticos poderia melhorar nosso conhecimento sobre as proteínas de reserva nesta espécie e assim adequar as condições de cultivo *in vitro*, de tal maneira que os embriões somáticos acumulassem suas próprias reservas, podendo aumentar a taxa de conversão e sobrevivência dos embriões somáticos quando semeados diretamente no solo.

O número de enzimas identificadas no processo de ubiquinona/proteosoma permitiria visualizar o controle da proteólise em experimentos futuros. Assim, estudos relacionados à biossíntese de carboidratos afetada por diferentes fontes de carbono suplementadas ao meio de cultura possibilitarão conhecer as rotas metabólicas que estão sendo ativadas para a produção de energia.

Os resultados apresentados nesta seção são uns reflexos dos pontos críticos do protocolo de embriogênese somática, ressaltado pela presença de várias proteínas do metabolismo secundário em resposta ao estresse causado, assim como a identificação de um tipo de proteína de reserva. Um estudo semelhante deve ser feito nos estádios de desenvolvimento do embrião zigótico, o qual mostraria as necessidades básicas da maturação dos embriões. Igualmente deveria ser feito um estudo comparativo entre calos embriogênicos e não embriogênicos, onde poderiam ser identificadas as proteínas chaves que desencadeiam o processo de embriogênese somática direta em *A. sellowiana*.

Em resumo, a combinação das técnicas de proteômica com a genética, a biologia molecular e a fisiologia pode incrementar nosso conhecimento das funções das proteínas na embriogênese de plantas lenhosas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKULA A.; AKULA, C.; BATESON M. Betaine a novel candidate for rapid induction of somatic embryogenesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) **Plant Growth Regulation**, v. 30, p. 241 – 246, 2000.
- ALEXANDROVA, K.S.; CONGER B.V. Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchardgrass (*Dactylis glomerata*). **Plant Science**, v. 162, p. 301 – 307, 2002.
- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, e Y. Yamada (eds.). **Handbook of Plant Cell Culture**, Macmilian Publisher Co., New York, 1983. p. 82 – 123.
- AMOO, S.O.; AYISIRE, B.E. Induction of callus and somatic embryogenesis from cotyledon explants of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. **African Journal Biotechnology**, v. 4, p. 68 – 71, 2005.
- ANTOGNONI, F.; FORMALÈ, S.; GRIMMER, C.; KOMOR, E.; BAGNI, N. Long-distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. **Planta**, v. 204, p. 520 – 527, 1998.
- ANTONIETTA, G.M.; EMANUELE, P.; ALVARO, S. Effects of encapsulation on *Citrus reticulata* Blanco somatic embryo conversion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, p. 235 – 237, 1999.
- ANTONIETTA, G.M.; AHMAD, H.I.; MAURIZIO, M.; ALVARO, S. Preliminary research on conversion of encapsulated somatic embryos of *Citrus reticulata* Blanco, cv. Mandarino Tardivo di Ciaculli. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v. 88, p. 117 – 120, 2007.
- APPLEWHITE, P.B; KAUR-SAWHNEY, R.; GALSTON, A.W. A role for spermidine in the bolting and flowering of Arabidopsis. **Physiologia Plantarum**, v. 108, p. 314 – 320, 2000.
- ARA, A.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S. Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.). **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 166 – 170, 1999.
- ARIBAUD, M.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamine metabolism, floral initiation and floral development in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). **Plant Growth Regulation**, v. 15, p. 23 – 31, 1994.
- ARNOLD, C.D.; MITRENGA, D.; MAYRESBACH, H. Gefriertro und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA) – Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. **Acta histochemistry**, v. 14, p. 271 – 277, 1975.
- ASHBURNER, M.; BALL, C.A.; BLAKE, J.A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J.M.; DAVIS, A.P.; DOLINSK, K.; DWIGHT, S.S.; EPPIG, J.T.; HARRIS, M.A.; HILL, D.P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J.C.; RICHARDSON, J.E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G.M.; SHERLOCK, G. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, p. 25 – 29, 2000.
- ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 53 – 59, 2003a.

- ASTARITA, L.V.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 163 – 168, 2003b.
- ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidases associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 113 – 118, 2003c.
- ATTREE, S.M.; FOWKE, L.C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell Tissue and Org Culture**, v. 35, p. 1 – 35, 1993.
- BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. **Amino Acids**, v. 20, p. 301 – 317, 2001.
- BAI, C.; SEN, P.; HOFMANN, K.; MA, L.; GOEBL, M.; HARPER, J.W.; ELLEDGE, S.J. SKP1 Connects Cell Cycle Regulators to the Ubiquitin Proteolysis Machinery through a Novel Motif, the F-Box. **Cell**, v. 86, p. 263 – 274, 1996.
- BAIS, H.P.; HAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 69, p.1 – 34, 2002.
- BANDURSKI, R.S.; COHEN, J.D.; SLOVIN, J.P.; REINECKE, D.M. Hormone biosynthesis and metabolism. In: P. J. Davies, (ed.). **Plant hormone. Physiology, biochemistry and molecular biology**. Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 39 – 65.
- BANDYOPADHYAY, S.; HAMILL, J.D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. **Annals of Botany**, v. 86, p. 237 – 244, 2000.
- BARALDI, R.; BERTAZZA, G.; BREGOLI, A.M.; FASOLO, F.; ROTONDI, A.; PREDIERI, S.; SERAFÍN-FRACASSINI, D.; SLOVIN, J.P.; COHEN, J.D. Auxins and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction microcuttings of two pear cultivars. **Journal of Plant Growth Regulator**, v. 14, p. 49 – 59, 1995.
- BARTEL, B. Auxin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology Molecular Biology**, v. 48, p. 51 – 66, 1997.
- BARCACCIA, G.; VAROTTO, S.; ALBERTINI, S.M.E.; PORCEDDU, A.; PARRINI, P.; LUCCHIN, M. Analysis of gene expression during flowering in apomeiotic mutants of *Medicago spp.*: cloning of ESTs and candidate genes for 2n eggs. **Sexual Plant Reproduction**, v. 14, p. 233 – 238, 2001.
- BENAVIDES, M.P.; AIZENCANG, G.; TOMARO, M.L. Polyamines in *Helianthus annuus* L. during germination under salt stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 16, p. 205 – 211, 1997.
- BENZ, R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. **Biochimie et Biophysical Acta**, v. 1197, p. 167 – 196, 1994.

- BERTOLDI, D.; TASSONI, A.; MARTINELLI, L.; BAGNI, N. Polyamines and somatic embryogenesis in two *Vitis vinifera* cultivars. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p 657, 2004.
- BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; POINSOT, V.; DIEU, M.; DIERICK, J.F.; VAN TUINEN, D.; REMACLE, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 23, p. 122–137, 2002.
- BEWLEY, J.D.; BLACK., M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BEEVERS, L.; GUERNSEY, F.S. Changes in some nitrogenous components during the germination of pea seeds. **Plant Physiology**. v. 41, p. 1455 – 1458, 1986.
- BENDER, L.; JOY, R.W.; VE, I.; THORPE, T.A. Studies on [14C]-Glucose metabolism during shoot bud induction in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata* D. Don. **Physiologia Plantarum**, v. 69, p. 428 – 434, 1987.
- BHATNAGAR, P.; MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C. Genetic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. The Regulation of putrescine catabolism. **Plant Physiology**, v. 128, p. 1455 – 1469, 2002.
- BIALEK, K., L. MICHALCZUK AND J.D. COHEN. Auxin biosynthesis during seed germination in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 100, p. 509 –517, 1992.
- BLACK, M. Abscisic acid in germination and dormancy. In: DAVIES W.J.; JONES H.J. (eds) **Abscisic Acid Physiology and Biochemistry** Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford,1991, pp. 81 – 98.
- BLACKSTOCK, W.P.; WEIR M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends Biotechnology**, v. 17, p. 121 – 127, 1999.
- BLANC, G.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; TEISSON, C.; LARDET, L.; CARRON M.P. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p. 103 – 112, 1999.
- BLANC, G.; LARDET, L.; MARTIN, A.; JACOB, J.L.; CARRON, M. P. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1453 – 1462, 2002.
- BLUM H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93 – 99, 1987.
- BOHINSKI, R. C. **Bioquímica**. EUA: Addison-Wesley Iberoamericana, S. A. Wilmington, Delaware, 1991. 739 p.
- BORRELL, A.; CULIANEZ-MACIA, F.A.; ALTABELLA, T.; BESFORD, R.T.; FLORES, D.; TIBURCIO, A.F. Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 109, p. 771 – 776, 1995.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v. 140, p. 103 – 125, 1999.

BOYER, C.; HILBERT J.L.; VASSEUR, J. Embryogenesis-related protein synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence in *Cichorium*. **Plant Science**, v. 93, p. 41 –53, 1993.

BOZHKOVA, P.V.; FILONOVA, L.H.; VON ARNOLD S. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 658 – 667, 2002

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BRAKO, L.; ZARUCCHI, J.L. **Catalogue of the flowering plants and Gymnosperms of Peru**. Monographs in systematic botany from the Missouri botanical garden, 1993, v. 45, p. 1 – 1286.

BUCHANAN, B.; GROISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry and Biology of Plants. In: CORUZZI, G.; LAST, R. (eds) **Amino Acids**. American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 358 – 410.

CABASSON, C.; OLLITRAULT, P.; CÔTE, F.X.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; DAMBIER, D.; DALNIC, R.; TEISSON, C. Characteristics of *Citrus* cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 464 – 470, 1995.

CAIRNEY, J.; XU, N.; PULLMANN, G.S.; CIAVATTA, V.T.; JOHNS, B. Natural and Somatic Embryo Development in Loblolly Pine, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 5-17, 1999.

CAILLOUX, F.; JULIEN-GUERRIER, J.; LINISSIER, L.; COUDRET, A. Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. **Plant Science**, v. 120, p. 185 – 196, 1996.

CAMPBELL, J.A.; DAVIES, G.J.; BULONE, V.; HENRISSAT B. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry Journal letters**, v. 326, p. 929 – 942, 1997.

CAMPOS-ÁLVAREZ, F.; CRUZ-GARCÍA, F.; TORRES-ESPINOSA, A.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M.; COLMENERO-FLORES, J.M.; SMITH-ESPINOZA, C.; COVARRUBIAS-ROBLES, A.A.; VÁZQUEZ-RAMOS, J.M. Expression of late embryogenesis abundant (lea) protein codifying genes during osmopriming of maize and bean seeds. **Agrociência**, v. 36, p. 461 – 470, 2002.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C. **Embriogênese somática e sementes sintéticas em *Feijoa sellowiana* Berg.: Sistema referencia e aspectos morfo-histológicos e bioquímicos**. 2002. 137p. Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2002.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; DAL VESCO, L.L.; STEINMACHER D.A., TORRES A.; GUERRA, M. P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in *Feijoa (Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic Seeds. **Scientia Horticulturae** v. 11, p. 228 – 234, 2007.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Morpho-histological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic

- embryogenesis. **Protoplasma**, v. 224, p. 33 – 40, 2004.
- CANHOTO J.M.; CRUZ G.S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg.) **Protoplasma** v. 191 p. 34 – 45, 1990.
- CANHOTO J. M.; CRUZ G. S. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae) by manipulation of culture media composition. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 30, p. 21 – 25, 1994.
- CANHOTO, J.M.; CRUZ, G. S. *Feijoa sellowiana* Berg (pineapple guava). In: Y.P.S. Bajaj (ed.), **Tree IV. Biotechnology in Agriculture on Forestry**. Berlin, Springer-Verlag. 1996. p.156-172.
- CAPUTO, C.; BARNEIX, A.J. The relationship between sugar and amino acid export to phloem in young wheat plants. **Annals of Botany**, v. 84, p. 33 – 38, 1999.
- CARIMI F. Somatic embryogenesis protocol: Citrus In: JAIN, S. MOHAN; GUPTA, PRAMOD K. (eds). **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Edited by Springer, 2005. Hardcover 590 pp,
- CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P., SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497 – 2507, 2005.
- CASACUBERTA, J. M.; RAVENTÓS, D.; PUIGDOMÉNECH, P.; SAN SEGUNDO B. Expression of the gene encoding the PR-like protein PRms in germinating maize embryos. **Molecular and General Genetic**, v. 234, p. 97 –104, 1992.
- CHAKRABARTY, D.; YU, K.W.; PAEK, K.Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). **Plant Science**, v. 165, p. 61 – 68, 2003.
- CHARLES D.J., SINGH, M.; SANWAL G.G. Biochemical changes during germination and seedling growth in *Cuscuta campestris*. **Physiologia Plantarum** v. 56, p. 211–216, 1982.
- CHIWOCHA S, VON ADERKAS P. Endogenous levels of free and conjugated forms of auxin, cytokinins and abscisic acid during seed development in Douglas fir. **Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 191 – 200, 2002.
- CHO, H.T. Modulation of plant organ growth by expansins, the cell wall loosening proteins. **Agricultural Biotechnology Net**, v. 3, ABN 069, 2001.
- CHO, Y.H.; YOO, S.D.; SHEEN J. Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in Glucose Signaling. **Cell** 127, p. 579 – 589, 2006.
- CHUGH, A.; KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis—recent advances. **Currents Science**, 83, p. 715 – 730, 2002.
- CIERESZKO, I.; JOHANSSON, H.; KLECZKOWSKI L.A. Interactive effects of phosphate deficiency, sucrose and light/dark conditions on gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in Arabidopsis. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 343 – 353, 2005.
- CLELAND, R.E. Auxin and cell elongation. In: DAVIES P.J. (ed.) **Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. pp. 214–227.

COHEN, J.D.; R.S. BANDURSKI. Chemistry and Physiology of the Bound Auxins. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 33, p. 403–430, 1982.

COSGROVE, D.J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature** 407, 321–326, 2000

CORTE V.B., DE LIMA E BORGES E.E.; PONTES C.A.; DE ALMEIDA LEITE, I.T.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A.A. mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth.(Leguminosae-caesalpinoideae) **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 6, p. 941 – 949, 2006.

CORUZZI, G.; LAST, R. Amino acids. In: BUCHANAN BB, GRUISSEM W, JONES RL. (eds) **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists; 2000. p. 358-410.

CRUZ, G.L.; CANHOTO, J.M.; ABREU, M.A.V. Somatic embryogenesis and Plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science** v. 66, p. 263 – 270, 1990.

DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 64, p 19 – 25, 2001.

DAMERVAL, C.; DEVIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic-variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, p. 52 – 54, 1986.

DAVIES, P.J. **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Dordrecht: Kluwer. 1995

DAVIS, B.D. Intermediates in amino acid biosynthesis. In: MEISTER, A. (ed), **Advances in Enzymology**, v. 16. John Wiley & Sons, New York, 1955. pp 247-312.

DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell** v. 7, p. 1085 – 1097, 1995.

DEWITTE, W.; MURRAY J.A.H. The plant cell cycle. **Annual Review of Plant Biology**, v. 4, p. 235 – 264, 2003.

DODEMAN, V.L., DUCREUX, G. Total protein pattern expression during induction and development of carrot somatic embryos. **Plant Science**, v. 120, p. 57 – 69, 1996.

DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1493 – 1509, 1997.

DONG, J.Z.; DUNSTAN, D.I. Endochitinase and β -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. **Planta**, v. 201, p. 189 – 194, 1997

DONG, J-Z, DUNSTAN, D.I. Expression of abundant mRNAs during somatic embryogenesis of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. **Planta**, v. 199, p. 469 – 476, 1996.

DE JONG, A.J.; CORDEWENER, J.; SCHIAVO, F.L.; TERZI, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S.C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **Plant Cell**, v. 4, p. 425 – 433, 1992.

- DE JONG, A.J.; HENDRIKS, T.; MEIJER, E.A.; PENNING, M.; LO SCHIAVO, F.; TERZI, M.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S.C. Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant *tsll*. **Development Genetic**, v. 16, p. 332 – 343, 1995.
- DE VRIES, S.C.; BOOIJ, H.; MEYERINK, P.; HUISMAN, G.; WILDE H.D.; *et al.*, Acquisition of embryogenic potential in carrot cell- suspension cultures. **Planta**, v. 176, p. 196 – 204, 1988.
- DINESHKUMAR, V.; KIRTI, P.B.; SACHAN, J.K.S.; CHOPRA, V.L. Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) **Plant Science**, v. 109, p. 207 – 213, 1995.
- DUDITS, D.; BÖGRE, L.; GYÖRGYÉY, J. Molecular and cellular to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. **Journal Cell Science**, v. 99, p. 475 – 484, 1991.
- DODD, M.C.; VAN STADEN, J.; SMITH M.T. Seed Germination in *Podocarpus henkelii*: An Ultrastructural and Biochemical Study **Annals of Botany**, v. 64, p. 569 – 579, 1989.
- DOLEZELOVA, M.; DOLEZEL, J.; NESTICKY, M. Relationship of embryogenic competence in maize (*Zea mays* L.) leaves to mitotic activity, cell cycle and nuclear DNA content. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 31, p. 215 – 221, 1992.
- DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R. Birds as pollinators of Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.). **Acta Horticulture**, v. 452, p. 37 – 40, 1997.
- DUPIRE, L.; DÉCOUT, E.; VASSEUR, J.; DELBREIL, B. Histological and 2-D protein patterns comparisons between a wild type and a somatic embryogenic mutant of *Asparagus officinalis* L. **Plant Science**, v. 147, p. 9 – 17, 1999.
- DURZAN, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: HÄLLGREN, J.E. (ed.), **Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology**. Swedish University of Agricultural Sciences 8, 1988. pp 147.
- DURZAN, D.J.; CHALUPA, V. Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (*Pinus bankisiana*). 4. Changes in free arginine and Sakaguchi-reactive compounds during callus growth and in germinating seedlings of similar genetic origin. **Canadian Journal Botany**, v. 54, p. 468 – 482, 1976.
- EL-NOCKRASHY, A.S., MOSTAFA, H.M.; EL-SHATTORY, Y.; ABBASSY, M.H. Biochemical Changes in Cottonseed During Germination. **Food**, v. 18, p. 285 – 293, 1974.
- EPSTEIN, E.; COHEN, J.D.; BANDURSKI, R.S. Concentration and metabolic turnover of indoles in germinating kernels of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, v. 65, p. 415 – 421, 1980.
- ETIENNE, H.; SOTTA, B.; MONTORO, P.; MIGINIAC, E.; CARRON, M.P. Relation between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). **Plant Science**, v. 88, p. 91 – 96, 1993.
- EMONS, A.M.C. Somatic embryogenesis: Cell biological aspects. **Acta Botanica**, v. 43, p. 1 – 14, 1994.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201 – 228, 2003.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS D. Activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived alfalfa cells: the role of auxin and stress. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 46, p.13 – 14, 2002.

FEHÉR, A. Why Somatic plant cells start to form embryos. **Plant Cell Monograph**, v. 2, p. 85 – 101, 2005.

FEIRER, R.P. 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**. v.1. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995. p 317 – 336.

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L.; ROCK, C.D. Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. **The Plant Cell**, S15–S45, Supplement 2002.

FISCHER-IGLESIAS, C.; SUNDBERG, B.; NEUHAUS, G.; JONES, A.M. Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. **The Plant Journal**, v. 26, p. 115 – 129, 2001.

FISCHER-IGLESIAS C.; NAUHAUS G. Zygotic embryogenesis hormonal control of embryo development. In: Bhojwani, S.S.; Soh W.Y. (eds) **Current Trends in the Embryology of Angiosperms** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2001. pp. 223 – 247.

FISCHER, R.L.; BENNETT, A.B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review Physiology Plant Molecular Biology**, v.42, p. 675-703, 1991.

FITZGERALD, D. Non-two-dimensional gel electrophoresis approach for the proteômica analysis of membrane proteins. **Application Note**, p. 16 – 17, 2001.

FLAHERTY, K.M.; DELUCA-FLAHERTY, C.; MCKAY, D.B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. **Nature**, v. 346, p. 623 – 628, 1990.

FRACASSINI DS, BAGNI N, CIONINI PG, BENNICI A. Polyamines and nucleic acids during the first cell cycle of *Helianthus tuberosus* tissue after the dormancy break. **Planta**, v. 148, p. 332 – 337, 1980.

FRANKLIN, C.I.; DIXON, R.A. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. (eds.) **Plant cell culture ± a practical approach**. New York: Oxford University Press; 1994. p. 1±25.

FU, J.R.; YANG, S.F. Release of heat pretreatment-induced dormancy in lettuce seeds by ethylene or cytokinin in relation to the production of ethylene and the synthesis of 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid during germination. **Plant Growth Regulator**, v. 2, p.185 – 192, 1983.

FUJII, J.A.A.; SLADE, D.; REDENBAUGH, K. Maturation and Greenhouse planting of alfalfa artificial seed. In **Vitro Cellular and Development Biology**, v. 25, p. 1179 – 1182, 1989.

FUJII, J.A.A.; SLADE, D.; OLSEN, R.; RUZIN, S.E.; REDENBAUGH, K. Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. **Plant Science**, v. 72, p. 93 – 100, 1990.

FUKUDA, H. Tracheary element formation as a model system of cell differentiation. **International Review of Cytology**, v. 136, p. 289 – 332, 1992.

FUKUDA H.; KOMAMINE A. Cytodifferentiation. In: VASIL IK, (eds) **Cell Culture and Somatic cell Genetics of Plants** Academic Press Inc, Orlando, 1985. pp 149 – 212.

FUKUOKA, H.; OGAWA, T.; MINAM, H.; YANO, H.; OHKAWA, Y. Developmental Stage-Specific and Nitrate-Independent: Regulation of Nitrate Reductase Gene Expression in Rapeseed. **Plant Physiology**, v. 11 p. 39 – 47, 1996.

GAGO, G. M.; ALMOGUERA, C.; JORDANO, J.; GONZALEZ, D.H.; CHAN, R.L. *Hahb-4*, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in abscisic acid-dependent responses to water stress in sunflower. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 633 – 640, 2002.

GALLARDO, K.; JOB, C.; GROOT, S.P.C.; PUYPE, M.; DEMOL, VANDEKERCKHOVE, J.; JOB, D. Proteomics of Arabidopsis Seed Germination. A Comparative Study of Wild-Type and Gibberellin-Deficient Seeds. **Plant Physiology**, v. 129, p. 823 – 837, 2002.

GALSTON, A.W.; FLORES, HE. Polyamines and plant morphogenesis. In: SLOCUM RD, FLORES HE. (eds) **Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants**. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991. pp. 175–186.

GAMBINO, G.; BONDAZ, J.; GRIBAUDO, I. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine European. **Journal of Plant Pathology**, v. 114, p. 397 – 404, 2006.

GARCÍA-AGUSTÍN, P.; PRIMO-MILLO E. Ultrastructural and Biochemical Changes in Cotyledon Reserve Tissues. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, p. 383 - 390, 1989.

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

GASPAR, T. Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. (ed.) **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneve: University of Geneve, 1986. p. 455-468.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Plant hormones and growth regulators in plant tissue culture. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 32, p. 272 – 289, 1996.

GEHRING, W.J. Homeo boxes in the study of development. **Science**, v. 236, p.1245 – 1252, 1987.

GEIGER, T.; CLARKE, S. Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginylyl and Aspartyl Residues in Peptides. **The Journal Biology Chemistry**, v. 262, p. 785 – 794, 1987.

GAZARYANA, G.; CHUBARA, T.A.; MAREEVAA, E.A.; LAGRIMINIB, L.M.; VAN HUUSTEEC, R.B.; ROGER, N.F. Thorneley Aerobic oxidation of indole-3-acetic acid catalysed by anionic and cationic peanut peroxidase. **Phytochemistry**, v. 51, p. 175 – 186, 1999.

- GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 1: The technology. 322–326 Edington, Wilts Exegetics Ltd. 1993.
- GEOFFRIAU, E.; KAHANE R.; MARTIN-TANGUY J. Polyamines are involved in the gynogenesis process in onion. **Physiologia Plantarum**, v. 127, p. 119 – 129, 2006.
- GIROUX, R.W.; PAULS K.P. Characterization of embryogenesis-related proteins in alfalfa (*Medicago sativa*). **Physiologia Plantarum**, v. 96, n^o 4, p. 5850 – 592, 1996.
- GIBSON, S.I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Current opinion in plant biology**, v. 8, p. 93 – 102, 2005.
- GOLDBERG, R.B.; PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science**, v. 266, p. 605 – 614, 1994.
- GLOTZER, M.; MURRAY, A.W.; KIRSCHNER, M.W. Cyclin is that degraded by the ubiquitin pathway. **Nature**, v. 349, 132 – 138, 1991.
- GRAY, D. J.; PUROHIT, A. Somatic embryogenesis and development od synthetic seed technology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, p. 33 – 61, 1991.
- GRAPPIN, P.; BOUINOT, D.; SOTTA, B.; MIGINIAC E.; JULLIEN, M. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. **Planta**, v. 210, p. 279 – 285, 2000.
- GRIEB, B.; GROß, U.; PLESCHKA, E.; ARNHOLDT-SCHMITT, B.; NEUMANN, K.H. Embryogenesis of photoautotrophic cell cultures of *Daucus carota* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 38, p. 115 – 122, 1994.
- GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L. DUCROQUET, J.P.H.; NODARI, R.O.; REIS, M.S. Somatic Embryogenesis in *Feijoa sellowiana*: Genotype Response, Auxinic shock and Synthetic Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 117 – 128, 2001.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO J.A. (eds.), **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 2, Embrapa, Brasília, 1999. p. 533-568.
- GUPTA, P.K.; PULLMAN, G.; TIMMIS, R.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.; GROB, J.; WELTY, E. Forestry in the 21st century: the biotechnology of somatic embryogenesis. **Biotechnology**, v. 11, p. 454 – 459, 1993.
- GUPTA, P.K., GROB, J.A. Somatic embryogenesis in conifers. In: Jain, S.; Gupta, P.K.; Newton R. (eds) **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht Kluwer Academic Publishers, 1995. v. 1 p. 81–98.
- GUTMANN, M.; VON ADERKAS, P.; LABEL, P.; LELU, M. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p.1905 – 1917, 1996.
- GYÖRGYÉY, J.; GARTNER, A.; NÉMETH, K.; MAGYAR, Z.; HIRT, H.; HEBERLE-BORS, E.; DUDITS, D. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis, **Plant Molecular Biology**, v. 16 p. 999 – 1007, 1991.
- HAHNE G.; MAYER J. E.; LORZ H. Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. **Plant science**, v. 55, n^o 3, p. 267 – 279, 1988.

- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 347 – 369, 1989.
- HANFREY, C.; FIFE, M.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 30, p. 597 – 609, 1996.
- HARADA, J.J. Signalling in plant embryogenesis. **Current opinion in plant biology**, v. 2, p. 23 – 27, 1999.
- HARTMANN, T. Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids (review). **Planta**, v. 207, p. 483 – 495, 1999.
- HEAZLEWOOD, J.L.; MILLAR, A.H. Integrated plant proteomics – putting the green genomes to work. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 471 – 482, 2003.
- HECK, G.R.; PERRY, S.E.; NICHOLS, K.W.; FERNANDEZ, D.E. AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. **Plant Cell**, v. 7, p. 1271–1282. 1995
- HELLEBOID, S.; HENDRIKS, Y.; BAUW, G.; INZE´ DE VASSEUR, J.; HILBERT, J.L. Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1189 – 1200, 2000.
- HENRIKSSON, E.; OLSSON, A.S.B.; JOHANNESON, H.; JOHANSSON, H.; HANSON, J.; ENGSTRÖM P.; SÖDERMAN E. Homeodomain Leucine Zipper Class I Genes in Arabidopsis. Expression Patterns and Phylogenetic Relationships. **Plant Physiology** v. 139, p. 509 – 518, 2005.
- HERNÁNDEZ-SEBASTIÀ, C.; MARSOLAIS, F.; SARAVITZ, C.; ISRAEL, D.; DEWEY, R.E.; HUBER S.C. Free amino acid profiles suggest a possible role for asparagine in the control of storage-product accumulation in developing seeds of low- and high-protein soybean lines. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n° 417, p. 1951 – 1963, 2005.
- HENRISSAT, B.; CALLEBAUT, I.; FABREGA, S.; LEHN, P.; MORNON, J.P.; DAVIES, G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 7090 – 7094, 1995.
- HILHORTS, H.W.M. A critical update on seed dormancy I. Primary dormancy. **Seed Science Research**, v. 5, p. 61 – 73, 1995.
- HOJ, P.B.; FINCHER, G.B. Molecular evolution of plant 13-glucan endohydrolases. **Plant Journal**, v. 7, p. 367 – 379, 1995.
- HOCHER, V.; SOTTA, B.; MALDINEY, R.; BONNET, M.; MIGINIAC, E. Changes in indole-3-acetic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed development. **Plant Cell Report**, v. 11, p. 253 – 256, 1992.
- HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R.L.; MCKERSIE, B.D.; VIANDS, D.R. Soluble saccharides and cyclitols in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos, leaflets, and mature seeds. **Plant Science**, v. 109, n°2, p. 191 – 198, 1995.
- HUANG, H.; VILLANUEVA, R. V. Inhibition of polyamine biosynthesis and seed germination in *Picea abies*. **Phytochemistry**, v. 31 p. 3353 – 3356, 1992.

<http://www.med.upenn.edu/akr/potential.shtml>, Potential Members of the Aldo-Keto Reductase Superfamily as of November 29, 2006.

<http://www.ebi.ac.uk/interpro> InterPro is a database of protein families, domains and functional sites in which identifiable features found in known proteins can be applied to unknown protein sequences.

IKEDA-IWAI, M.; UMEHARA, M.; SATOH, S.; KAMADA, H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 34, p. 107 – 114, 2003.

IMIN, N.; NIZAMIDIN, M.; DANIHER, D.; NOLAN, K.E.; ROSE, R.J.; ROLFE B.G. Proteomic Analysis of Somatic Embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant Cultures Grown under 6-Benzylaminopurine and 1-Naphthaleneacetic Acid Treatments. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1250 – 1260, 2005.

IMIN, N.; DE JONG, F.; MATHESIUS, U.; VAN NOORDEN, G.; SAEED, N.A.; WANG, X.D.; ROSE, R.J.; ROLFE B.G. Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts **Proteomics**, v. 4, p. 1883 – 1896, 2004.

IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. **Cell Biology and Morphogenesis**, v. 22, p. 16 – 24, 2003.

IRAQI, D.; TREMBLAY, F.M. 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**, v. 52, n°365, p. 2301 – 2311, 2001.

ITO, M.; IWASE, M.; KODAMA, H.; LAVISSE, P.; KOMAMINE, A.; NISHIHAMA, R.; MACHIDA, Y.; WATANABE, A. A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. **Plant Cell**, v. 10, p. 331 – 341, 1998.

JANICK, J.; KIM, Y.H.; KITTO, S.; SARANJA, Y. Desiccated synthetic Seed. In: REDENBAUGH, K. (ed) **Synseeds**, C. R. C. Press Boca Raton 1993. p. 11 – 33.

JIMÉNEZ, M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role endogenous hormone. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 196 – 223, 2001.

JUNG, S.J.; YOON, E.S.; JEONG, J.H.; CHOI, Y.E. Enhanced post-germinative growth of encapsulated somatic embryos of Siberian ginseng by carbohydrate addition to the encapsulation matrix. **Plant Cell Report**, v. 23, p. 365 – 370, 2004.

KAKKAR, R.K.; SAWHNEY, V.K. Polyanime research in plants – a changing perspective. **Physiology Plant**, v. 116, p. 281 – 292, 2002.

KALEMBA E.; PUKACKA S. LEA and sHSP proteins associated with desiccation tolerance and longevity of seeds of woody plants. **Biological letters**, v. 42, p. 149, 2005.

KAMADA, H.; HARADA, H. Changes in endogenous amino acids compositions during somatic embryogenesis in *Daucus carota*. **Plant Cell Physiology**, v. 25, p. 27 – 38, 1984.

- KAMADA, H.; ISHIKAWA, K.; SAGA, H.; HARADA, H. Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. **Plant Tissue Culture Letters**, v. 10, p. 38 – 44, 1993.
- KANG, C.H.; JUNG, W.Y.; KANG, Y.H.; KIM, J.Y.; KIM, D.G.; JEONG, J.C.; BAEK, D.W.; JIN, J.B.; LEE, J.Y.; KIM, M.O.; CHUNG, W.S.; MENGISTE, T.; KOIWA, H.; KWAK, S.S.; BAHK, J.D.; LEE, S.Y.; NAM, J.S.; YUN, D.J.; CHO, M.J. AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 84 – 95, 2006.
- KARAMI, O.; DELJOU, A.; MAHMODI A. Pour Repetitive somatic embryogenesis in carnation on picloram supplemented media. **Plant Growth Regulation**, v. 51, p. 33 – 39, 2007.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137 – 138, 1965.
- KRAGH, K.M.; HENDRIKS, T.; DE JONG, A.J.; LO SCHIAVO, F.; BUCHERNA, N.; HØJRUP, P.; MIKKELSEN, J.D.; DE VRIES S.C. Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variantts11 **Plant Molecular Biology**, v. 31 p. 631 – 645, 1996.
- KLEENE, R.; BERGER, E.G. The molecular and cell biology of glycosyltransferases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1154, p. 283 – 325, 1993
- KHURI, S.; SHMOURY, M.R.; BAALBAKI, R.; MAUNDER, M.; TALHOUK, S.N. Conservation of the Cedrus libani populations in Lebanon: history, current status and experimental application of somatic embryogenesis. **Biodiversity and Conservation**, v. 9, p. 1261 – 1273, 2000.
- KĘPCZYŃ-SKA, E.; ZIELIŃ-SKA, S. Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryos regeneration by gibberellin A3 and abscisic acid in relation to starch content and α -amylase activity. **Plant Growth Regulation**, v. 49, p. 209 – 217, 2006.
- KEPINSKI S.; LEYSE O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor **Nature**, v. 435, p. 446 – 451, 2005.
- KERMODE, A.R. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interaction between the embryo and the seed environment. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (eds) **Seed Development and Germination**, Marcel Dekker, Inc. New York, 1995. pp. 273 – 332.
- KERSTETTER, R.A.; LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D.; SMITH, L.G.; HAKE, S. Loss of function mutations in the maize homeobox gene, *knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. **Development**, v. 124, p. 3045 – 3054, 1997.
- KETRING, D.L. Ethylene and seed germination. In: KHAN, A.A. (ed.) **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. Amsterdam, North Holland, 1977. p.157-178.
- KITAMIYA, E.; SUZUKI, S.; SANO, T.; NAGATA, T. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. **Plant Cell Report**, v. 19, p. 551 – 557, 2000.
- KLIMASZEWSKA, A.K.; SMITH, D. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobes* is promoted by a high concentration of gellan gum. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 949 – 957, 1997.

- KLIMASZEWSKA, A.K.; MORENCYA, F.; JONES-OVERTONA C.; COOKEB J. Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. **Physiologia plantarum**, v. 121, p. 682 – 690, 2004.
- KOETJE, D.S.; KONONOWICZ, H.; HODGES, T.K. Polyamine metabolism associated with growth and embryogenic potential of rice. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, p. 215 – 221, 1993.
- KOMAI, F.; OKUSE, I.; SAGA, K.; HARADA, T. Improvement on the efficiency of somatic embryogenesis from spinach root tissues by applying various sugars. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 65, p. 67 – 72, 1996.
- KOMAMINE, A.; MURATA, N.; NOMURA, K. 2004 SIVB Congress Symposium Proceeding: Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry and molecular biology. **In Vitro Cellular and Developmental Biological – Plant**, v. 41, p. 6 – 10, 2005.
- KONG, L.; ATTREE, S.M.; FOWKE, L.C. Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. **Physiology Plant**, v. 101, p. 23 – 30, 1997.
- KROCHKO, J.E.; BANTROCH, D.J.; GREENWOOD J.S.; BEWLEY J.D. Seed storage proteins in developing somatic embryos of alfalfa: defects in accumulation compared to zygotic embryos. **Journal Experimental of botanic**, v. 45, p. 699 – 708, 1994.
- KULAEVA, O.N.; PROKOPTSEVA, O.S. Recent advances in the study of mechanisms of action of phytohormones. **Biokhimiia**, v. 69, p. 233 – 247, 2004.
- KUMAR, A.; ELLIS B.E. The Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family in Raspberry. Structure, Expression, and Evolution. **Plant Physiology**, v. 127, p. 230 – 239, 2001
- KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R.N.F. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, v.114, p.1237-1245, 1997.
- LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.; SCHULTZ, C.; MELO-OLIVEIRA, R.; TJADEN, G.; OLIVEIRA, I.; NGAI, N.; HSIEH, M.H.; CORUZZI, G. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 887 – 898, 1995.
- LAM, H.M.; HSIEH, M.H.; CORUZZI G. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 16,p. 345 – 353, 1998.
- LAMB, H.K.; LESLIE, K.; DODDS, A.L.; NUTLEY, M.; COOPER, A.; JOHNSON, C.; THOMPSON, P.; STAMMERS, D.K.; HAWKINS, A.R. The negative transcriptional regulator NmrA discriminates between oxidized and reduced dinucleotides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 32107 - 32114, 2003.
- LANDRIEU, I.; DE VEYDER, L. ; FRUCHART, J.S. ; ODAERT, B. ; CASTEELS, P. ; PORTETELLE, D. et al. *Arabidopsis thaliana* PIN1At gene encodes a single domain phosphorylation-dependent peptidyl prolyl cis/trans isomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10577 – 10581, 2000.

- LANDRIEU, I.; WIERUSZESKI, J.M.; WINTJENS R.; INZÉ D.; LIPPENS G. Solution Structure of the Single-domain Prolyl Cis/ Trans Isomerase PIN1At from *Arabidopsis thaliana* **Journal of Molecular Biology**, v. 320, p. 321 – 332, 2002.
- LANDRUM, L.R. Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyw, Legrandia, Acca, Myrrhimum, and Luma (Myrtaceae). **Flora Neotropica**, v. 45, p. 1 – 178, 1986.
- LASKAR, D.D.; JOURDES, M.; PATTEN, A.M.; HELMS, G.L.; DAVIN L.B.; LEWIS N.G. The *Arabidopsis* cinnamoyl CoA reductase *irx4* mutant has a delayed but coherent (normal) program of lignification. **The Plant Journal**, v. 48, p. 674 – 686, 2006.
- LAUBER, W.M.; CARROLL, J.A.; DUFIELD, D.R.; KIESEL, J.R.; RADABAUGH, M.R.; MALONE, J.P. Mass spectrometry compatibility of two-dimensional gel protein stains. **Electrophoresis**, v. 22, p. 906 – 918, 2001.
- LEA, P.J.; ROBINSON, S.A.; STEWART, G.R. The use of mutants lacking glutamine synthetase and glutamate synthetase to study their role in plant nitrogen metabolism. In: POULTON, J.E.; ROMEO, J.T.; CONN, E.E. (eds) **Recent advances in phytochemistry**. New York: Plenum Press; 1989. p. 569 – 607.
- LEE, Y.; CHOI, D.; KENDE, H. Expansins: Ever-expanding numbers and functions. **Current Opinion Plant Biological**, v. 4, p. 527 – 532, 2001.
- LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. Abscisic acid signal transduction. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 199 – 222, 1998.
- LEVITT, M.; GERSTEIN, M.; HUANG, E.; SUBBIAH, S.; TSAI, J. Protein folding: the endgame. **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, p. 549 – 579, 1997.
- LI, A.X.; EANNETTA, N.; GHANGAS, G.S.; STEFFENS J.C. Glucose Polyester Biosynthesis. Purification and Characterization of a Glucose Acyltransferase1 **Plant Physiology**, v. 121, pp. 453–460, 1999.
- LI, J; GRABAU, E. Comparison of somatic embryogenesis and embryo conversion in commercial soybean cultivars. **Plant Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 87 – 89, 1996.
- LI, Y.; DARLEY, C.P.; ONGARO, V.; FLEMING, A.; SCHIPPER, O.; BALDAUF, S.L.; MCQUEEN-MASON, S.J. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. **Plant Physiology**, v. 128, p. 854 – 864, 2002.
- LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 21 – 25, 1999.
- LIMA E BORGES, E.E.; GONÇALVES BORGES, R.C.; SOARES, C.P.B.; DE ANDRADE PEREZ S.C.J.G. Crescimento e mobilização de carboidrato em embrião de sementes de fedegoso (*Senna macranthera* irwin et barneby) durante a germinação. **Cerne**, v.8, n°1, p. 69 – 76, 2002.
- LINCOLN, C.; LONG, J.; YAMAGUCHI, J.; SERIKAWA, K.; HAKE, S. A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. **Plant Cell**, v. 6, p. 1859 - 1876, 1994.

- LIPAVSKÁ, H.; KONRÁDOVÁ H. somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 23 – 30, 2004.
- LIPPERT, D.; ZHUANG, J.; RALPH, S.; ELLIS, D.E.; GILBERT, M.; OLAFSON, R.; RITLAND, K.; ELLIS, B.; DOUGLAS, C.J.; BOHLMANN. J. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. **Proteomics**, v. 5, p. 461 – 473, 2005.
- LITTLE, E.L.; MAGBANUA, Z.V.; PARROTT, W.A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 351 – 357, 2000.
- LIU, C.M.; XU, Z.M.; CHUA, N.H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**, v. 5, p. 621 – 630, 1993.
- LONG, J.A.; MOAN, E.I.; MEDFORD, J.I.; BARTON, M.K. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. **Nature**, v. 379, p. 66 – 69, 1996.
- LOPEZ, M.F. Better approaches to finding the needle in a haystack: optimizing proteome analysis through automation. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1082 – 1093, 2000.
- LUCA, F.C.; WINEY, M. MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy. **Molecular Biology of the Cell**, v.9, p. 29 – 46, 1998.
- LUDWIG, R.A. *Arabidopsis* chloroplasts dissimilate L-arginine and L-citrulline for use as N source. **Plant Physiology**, v. 101, p. 429 – 434, 1993.
- LULSDORF, M.M.; TAUTORUS, T.E.; KIKCIO, S.I.; DUNSTAN, D.I. Growth parameters of embryogenic suspension cultures of interior spruce (*Picea glauca-engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). **Plant Science**, v. 82, p. 227 - 234, 1992.
- MA, H.; MCMULLEN, M.D.; FINER, J.J. Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development. **Plant Molecular Biology**, v. 24, p. 465 – 473, 1994.
- MADAKADZE, R.M.; SENARATNA, T. Effect of growth regulators on maturation of geranium (*Pelargonium x hortorum*) somatic embryos. **Plant Growth Regulation**, v. 30, p. 55 – 60, 2000.
- MADER, J.C.; HANKE, D.E. Polyamine sparing may be involved in the prolongations of cell division due to inhibition of phenyl-propanoid synthesis in cytokinin starved soybean cells. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 16, p. 89 – 93, 1997.
- MAKI, H.; ANDO, S.; KODAMA, H.; KOMAMINE, A. Polyamines and the cell cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. **Plant Physiology**, v. 96, p. 1008 – 1013, 1991.
- MALMBERG, R.L.; WATSON, M.B.; GALLOWAY, G.L.; YU, W. Molecular genetic analysis of plant polyamines. **Critical Review in Plant Science**, v. 17, p. 199 – 224, 1998.
- MAMIYA, K.; SAKAMOTO, Y. A method to produce encapsulatable units for synthetic seeds in *Asparagus officinalis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 64, p. 27 – 32. 2001.

MANSFIELD, S.G.; BRIARTY, L.G. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 461 – 476, 1991.

MARUYAMA, E.; KINOSHITA, I.; ISHII, K.; OHBA, K. Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12 – 25°C. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 393 – 396, 1997.

MARTIN, K.P. Plant regeneration through somatic embryogenesis on *Holostemma adakodien*, a rare medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 2, p. 79 – 82. 2003.

MARTIN, A.B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGO, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, v. 154, p. 143 – 151, 2000.

MATHEW, M.M.; PHILIP, V.J. Somatic embryogenesis versus zygotic embryogenesis in *Ensete superbum*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 267 – 275, 2003.

MATSUMOTO, T.K.; KUEHNLE, A.R.; WEBB D.T. Zygotic embryogenesis in *anthurium* (araceae) **American Journal of Botany**, v. 85, p. 1560 – 1568, 1998.

MATSUOKA, M.; ICHIKAWA, H.; SAITO, A.; TADA, Y.; FUJIMURA, T.; KANOMURAKAMI, Y. Expression of a rice homeobox gene causes altered morphology of transgenic plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 1039 – 1048, 1993.

MAUSETH, J.D. **Botany: An Introduction to Plant Biology**. Philadelphia: Saunders. 1991. pp. 348-415.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 670 – 684, 2005.

MCCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V.E.; OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry**, v. 22, p. 1156 – 1158. 1950.

MCDANIEL, C. N. Competence, determination and induction in plant development. In: MALACINSKI, G. M.; BRYANT, S. V. (eds.) **Pattern formation**, MacMillan, New York, 1984. p. 393 – 412.

MCVAUGH P Myrtaceae. In: MCBRIDE, J.F. (ed) **Flora of Peru**. Missurri, Field Museum of Natural History Botanical. 1958. p. 592 – 818.

MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. **Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. Cap. 5, p. 155 – 203.

MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; WILLIAMS, E.G. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: BHOJWANI, S.S. (ed.) **Plant Tissue Culture: applications and limitations**. Developments in crops science 19. Elsevier, Amsterdam, 1990. p. 67 – 101.

MICALLEF, B.J.; SHELPS, B.J. Arginine Metabolism in Developing Soybean Cotyledons1 II. Biosynthesis **Plant Physiology**, v. 90, p. 631 – 634, 1989.

MICHALCZUCK, L.; COOKE, T.D.; COHEN, J.D. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. **Phytochemistry**, v. 4, p. 1097 - 1103, 1992.

- MINOCHA, S.C.; MINOCHA, R. Historical aspects of somatic embryogenesis in woody plants. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (eds), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v. 1 History, molecular and biochemical aspects, and applications. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. 1995. p. 9 – 22.
- MINOCHA, R.; DALE, R.S.; CATHIE, R.; STEELE, K.D.; MINOCHA, S.C. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 155 – 164, 1999.
- MIERNYK, J.A. Protein folding in the plant cell. **Plant Physiological**, v. 121, p. 695 – 703, 1999.
- MOLLE, F.; DUPUIS, J.M; DUCOS J-P.; ANSELM A.; CROLUS – SAVIDAN, I.; PETIARD, V.; FREYSSINET, G. Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seed. In: REDENBUGH, K. (ed) **Synseeds**. CRC. Press. Boca Raton 1993. p. 257 – 287.
- MONDAL, T.K.; BHATTACHARYA, A.; SOOD, A.; AHUJA, P.S. Factors affecting germination and conversion frequency of somatic embryos of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). **Jouranl of Plant Physiology**, v. 159, p. 1317 – 1321, 2002.
- MOREL, G. M.; WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 38, p. 138 – 140. 1951.
- MORCILLO, F.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; NOIROT, M.; HAMON, S.; DUVAL Y. Differential effect of glutamine and arginine on 7S globulin accumulation during the maturation of oil palm somatic embryos. **Plant Cell Reports**. v. 18, p. 868 – 872, 1999.
- MORDHORST, A.P.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. Plant embryogenesis. **Critical Review in Plant Science**, v.16, p. 535 – 576, 1997.
- MORENO, F.; AHUATZI, D.; RIERA, A.; PALOMINO, C.A.; HERRERO, P. Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 265 – 268, 2005.
- MORGAN, J.M. Osmoregulation and Water Stress in Higher Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 299 – 319, 1984.
- MORGAN, D.O. Cyclin-dependent Kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13 p. 261–91, 1997.
- MORIGUCHI, T.; KITA, M.; TOMONO, Y.; ENDO-INAGAKI, T.; OMURA, M. One Type of Chalcone Synthase Gene Expressed during Embryogenesis Regulates the Flavonoid Accumulation in Citrus Cell Cultures. **Plant Cell Physiology**, v. 40, p. 651 – 655, 1999.
- MORIGUCHI, T.; MOTOMURA, T.; HIDAKA, T.; AKIHAMA, T.; OMURA, M. Analysis of mitochondrial genomes among *Citrus* plants produced by the interspecific somatic fusion of 'Seminole' tangelo with rough lemon. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 397 – 400, 1997.
- MOSER, J.R.; GARCIA, M.G.; VIANA, A.M. Establishment and growth of embryogenic suspension cultures of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 37 – 42, 2004.
- MUDGETT, M.B.; CLARKE, S. Characterization of plant L-isoaspartyl mehtyltransferases that may be involved in seed survival: purification, cloning and

sequence analysis of the wheat germ enzyme. **Biochemistry**, v. 32, p. 11100 – 11111, 1993.

MUDGETT, M.B.; CLARKE, S. Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat. **Journal of Biology Chemistry**, v. 41, p. 25606 – 25612, 1994.

MUÈLLER, J.; WANG, Y.; FRANZEN, R.; SANTI, L.; SALAMINI, F.; ROHDE W. In vitro interactions between barley TALE homeodomain proteins suggest a role for protein±protein associations in the regulation of Knox gene function. **The Plant Journal**, v. 27, p. 13 – 23, 2001.

NASCIMENTO, W.M. Envolvimento do etileno na germinação de sementes. **Revista brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12(Edição Especial), p. 163 - 174, 2000.

NEUMANN, K.H. Some studies on somatic embryogenesis, a tool in plant biotechnology. **87th Indian Science Congress** in Pune, India. Jan. 2000

NISHIMURA, A.; TAMAOKI, M.; SAKAMOTO, T.; MATSUOKA M. Over-Expression of Tobacco knotted1-Type Class1 Homeobox Genes Alters Various Leaf Morphology **Plant Cell Physiology**, v. 41, p. 583 – 590, 2000.

NIEVES, N.; MARTÍNEZ, M.E.; BLANCO, M.A.; GONZÁLEZ, J.L.; BORROTO, E.; LORENZO, J.C.; PORTILLA. Y. Changes in soluble proteins and polyamines during citrus seed germination. **Fruits**, v. 53, p. 27 – 33, 1997.

NIEVES, N.; LORENZO, J.C.; SANTOS, R.; CONCEPCIÓN, O.; BORROTO, C. G.; BORROTO, E.; TAPIA, R.; MARTINEZ, M.E.; FUNDORA, Z.; GONZÁLES, A. Artificial endosperm of cleopatra tangerine zygotic embryos a model for somatic embryo encapsulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 77 – 83. 1998a.

NIEVES, N.; MARTINEZ, M.E.; BLANCO, M.A.; GONZÁLES, A.; JUSTO, L.; BORROTO, E.; LORENZO, J.C.; PORTILLA, Y. Changes in solubles proteins and poliamines during citrus seed germination. **Fruits** v. 53, p. 27 – 33. 1998b.

NIEVES, N.; MARTINEZ, M.E.; CASTILLO, R.; BLANCO, M.A.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.L. Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 15 – 21, 2001.

NIEVES, N.; ZAMBRANO, Y.; TAPIA, R.; CID, M.; PINA, D.; CASTILLO, R. Field performance of artificial seed-derived sugarcane plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 279 – 282, 2003a.

NIEVES, N.; SEGURA-NIETO, M.; BLANCO, M.A.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J.L.; CASTILLO, R. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. **In Vitro Cell Developmental Biology-Plant**. v. 39, p. 343 – 345, 2003b.

NORMANLY, J. Auxin metabolism. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 431 – 442, 1997.

NODARI, R.O.; DUCROQUET, J.P.; MELER, K.; GUERRA M.P. Genetic Variability of *Feijoa Sellowiana* Germplasm. **Acta Horticulturae** v. 452, p. 41 – 46. 1997.

- NOMURA, K.; KOMAMIE, A. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE TA. (ed) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995. p. 249 – 266.
- NUUTILA, A.M.; KURTEN, U.; KAUPPINEN, V. Optimization of sucrose and inorganic nitrogen concentrations for somatic embryogenesis of birch (*Betula pendula* Roth.) callus cultures: a statistical approach. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 24, p. 73 – 77, 1991.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368 – 373, 1965.
- OGITA, S.; SASAMOTO, H.; YEUNG, E.C.; THORPE, T. A. the effects of glutamine on the maintenance of embryogenic cultures of *Cryptomeria japonica*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 37, p. 268 – 273, 2001.
- ONAY, A.; PIRINC, V.; TILKAT, E.; AKTURK, Z.; YILDIRIM, H. Somatic embryogenesis of pistachio from female flowers. **Journal of horticultural science & biotechnology**, v. 79, p. 960 – 964, 2004.
- ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y.; HIROSAWA, T. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, p. 137 – 145, 1994.
- ORTIZ-LOPEZ, A.; CHANG, H.C.; BUSH, D.R. Amino acid transporters in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1465, p. 275 – 280, 2000.
- OZEKI, Y.; KOMAMINE, A.; TANAKA, Y. Induction and repression of phenylalanine-lyase and chalcone synthase proteins and mRNAs in carrot cell suspension cultures regulated by 2,4-D. **Physiologia Plantarum**, v. 78, p. 400 - 408. 1990.
- PAIVA NETO, V.B.; BOTHELO, N.M.; EUCLYDES, A.M.; SILVA, A.M.R.; OTONI, C.W. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto. **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**. v. 39, p. 629 – 634, 2003.
- PATTON, E.E.; WILLEMS, A.R.; TYERS, M. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. **Trends Genetic**, v. 14, p. 236 - 243, 1998.
- PARK, Y.S. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. **Annals of Forest Science**, v. 59, p. 651 – 656. 2002.
- PATEL, A.V.; PUSCH, I.; MIX-WAGNER, G.; VORLOP, K.D. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. **Plant Cell Reports** v. 19, p. 868 – 874, 2000.
- PELSY, F.; CABOCHE, M. Molecular genetics of nitrate reductase in higher plants. **Advanced in Genetic**, v. 30, p. 1 – 40, 1992.
- PESCADOR, R. **Aspectos fisiológico - estruturais das embriogêneses zigótica e somática de feijoa sellowiana berg (myrtaceae)** Tese (Doutor em Ciências na área de Botânica) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. p 161.
- PITTO, L.; LOSCHIAVO, F.; GIULIANO, G.; TERZI, M. Analysis of heat shock protein pattern during somatic embryogenesis of carrot. **Plant Molecular of Biology**, v. 2, p. 231 – 237, 1983.

PONDROM, S. Team **Determines Cellular Stress Within Body Is Critical Component Of Cell Growth and Immune Response**. UCSD, University of California San Diego 2004, July 6. http://ucsdnews.ucsd.edu/newsrel/health/07_06_Ho.asp

PONTES, C.A.; DE LIMA E BORGES, E.E.; BORGES R.C.G.; SOARES C.P.B. Mobilização de reservas em sementes de *apuleia leiocarpa* (vogel) j.f. macbr. (garapa) durante a embebição **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 26, n. 5, p. 593 – 601, 2002.

PREWEIN, C.; ENDEMANN, M.; REINÖHL, V.; SALAJ, J.; SUNDERLIKOVA, V.; WIHELM, E. Physiological and morphological characteristics during development of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) zygotic embryos. **Trees**, v. 20, p. 53 – 60, 2006.

PUCHOOA, D. In vitro regeneration of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 576 – 584, 2004.

PUGA-HERMIDA, M.I.; GALLARDO, M.; MATILLA, A.J. The zygotic embryogenesis and ripening of *Brassica rapa* seeds provokes important alterations in the levels of free and conjugated abscisic acid and polyamines. **Physiologia Plantarum**, v. 117, p. 279 – 288, 2003.

PUIGDERRAJOLS, P.; JOFRÉ, A.; MIR, G.; PLA, M.; VERDAGUER, D.; HUGUET, G.; MOLINAS, M. Developmentally and stress-induced small heat shock proteins in cork oak somatic embryos. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1445 – 1452, 2002.

PULLMAN, G.S.; BUCHANAN, M. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.): stage-specific analyses of zygotic embryo and female gametophyte tissue. **Plant Science**, v. 164, p. 943 – 954, 2003.

PULLMAN, G.S.; JOHNSON, S.; PETER, G.; CAIRNEY, J.; XU, N. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. **Plant Cell Report**, v. 21 p. 747–758, 2003.

RABILLOUD, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. **Proteomics**, v. 2, p. 3 – 10, 2002.

RACUSEN, R.H.; SCHIAVONE, F.M. Detection of spatially- and stage-specific proteins in extracts from single embryos of the domesticated carrot. **Development**, v. 103, p. 665 – 674, 1988.

RADIN, J.W. Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. **Plant Physiology**, v. 53, p. 458 - 463, 1974.

RADWANSKI, E.R.; LAST, R.L. Tryptophan biosynthesis and metabolism: Biochemical and molecular genetics. **Plant Cell**, v. 7, p. 921 – 934, 1995.

RAINBIRD, R.M.; THORNE, J.H.; HARDY, R.W.F. Role of amides, amino acids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. **Plant Physiology**, v. 74, p. 329 – 334, 1984.

RAGHAVAN, V.; SHARMA, K.K. Zygotic embryogenesis in gymnosperms and angiosperms. In: THORPE, T.A. (ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 73 – 115.

- RAMAROSANDRATANA, A.; HARVENGT, L.; BOUVET, A.; CALVAYRAC, R.; PÂQUES, M. Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gun concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v. 37, p. 29-34. 2001.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S.E. *Biology of Plants*. New York: Worth. pp. 545-572. 1992.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN S.E. **Biology of Plants**, 7th Edition, W.H. Freeman and Company Publishers, New York, 2005
- READ, S.M.; NORTHCOTE, D.H. Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v. 116, p. 53 – 64, 1981.
- REDENBAUGH, K.; FUJII, J. A.; SLADE, D. Synthetic Seed Technology. In: VASIL, I. K. (ed). **Cell Culture and Somatic Cell Genetic of plants**. San Diego, Academic Press, 1991. v. 8, p. 35 – 74.
- REGALADO, A.P.; RICARDO, C.P.P. Study of the Intercellular Fluid of Healthy *Lupinus albus* Organs (Presence of a Chitinase and a Thaumatin-Like Protein) **Plant physiology**, v. 110, p. 227 – 232, 1996.
- REISER, L.; SANCHEZ-BARACALDO, P.; HAKE, S. Knots in the family tree: Evolutionary relationships and functions of *knox* homeobox genes. **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 151 – 166, 2000
- RHEE, S.Y.; BEAVIS, W.; BERARDINI, T.Z.; CHEN, G.; DIXON, D.; AISLING DOYLE, GARCIA-HERNANDEZ, M.A.; HUALA, E.; LANDER, G.; MONTOYA, M.; MILLER, N.; MUELLER, L.A.; MUNDODI, S.; REISER, L.; TACKLIND, J.; WEEMS, D.C.; WU, Y.; XU, I.; YOO, D.; YOON J.; ZHANG P. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to *Arabidopsis* biology, research materials and community **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 224 - 228, 2003.
- RIBNICKY, D.M.; COHEN, J.D.; HU, W.; COKE, T.J. An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. **Planta**, v. 214, p. 505 – 509, 2002.
- ROBERTS, D.R.; WEBSTER, F.B.; FLINN, B.S.; LAZAROFF, W.R.; CYR, D.R. Somatic embryogenesis of spruce In: REDENBAUGH, K. (Ed) **Synseeds**. CRC Press Boca Raton, 1992a. p. 427 – 450.
- ROBERTS, A.W.; KOONCE, L.T.; HAIGLER, C.H. A simplified medium for in vitro tracheary element differentiation in mesophyll suspension cultures from *Zinnia elegans* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 27 – 35, 1992b.
- ROCK, C.D.; QUATRANO, R.S. The role of hormones during seed development. In: DAVIES PJ. (ed) **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995. p. 671-697.
- ROCK, C.D. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. **New Phytology**, v. 148, p. 357 – 396, 2000.
- RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic

embryogenesis cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v. 204, p. 71 – 83, 1998.

ROHDE, A.; DE RYCKE, R.; BEECKMAN, T.; ENGLER, G.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. *ABI3* affects plastid differentiation in dark-grown Arabidopsis seedlings. **Plant Cell**, v. 12, p. 35 – 52, 2000.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 675 – 709, 2006.

ROSE, J.K.C.; BASHIR, S.; GIOVANNONI, J.J.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, R.S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **Plant Journal**, v. 39, p. 715 – 733, 2004.

ROSS, H.A.; DAVIES, H.V.; BURCH, L.R.; VIOLA, R.; MCRAE D. Developmental changes in carbohydrate content and sucrose degrading enzymes in tuberising stolons of potato (*Solanum tuberosum*). **Physiologia Plantarum**. v. 90, p. 748–756, 1994.

ROSS, A.R.S.; LEE, P.H. SMITH, D.L.; LANGRIDGE, J.I.; WHETTON, A.D.; GASKELL S.J. Identification of Proteins from Two-Dimensional Polyacrylamide Gels using a Novel Acid-Labile Surfactant. **Proteomics**, v. 2, p. 928 – 936, 2002.

ROTH, R.; EBERT, I.; SCHMIDT, J. Trisomy associated with loss of maturation capacity in a long-term embryogenic culture of *Abies alba*. **Theor Appl Genet** v. 95, p. 353 – 358, 1998.

RUIZ-MEDRANO, R.; JIMENEZ-MORAILA, B.; HERRERA-ESTRELLA, L.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Nucleotide sequence of an osmotin-like cDNA induced in tomato during viroid infection. **Plant Molecular Biology**, v. 20, p. 1199 – 1202, 1992.

SAINI, H.S.; CONSOLACION, E.D.; BASSI, P.K.; SPENCER, M.S. Requirement for ethylene synthesis and action during relief of thermoinhibition of lettuce seed germination by combinations of gibberellic acid, kinetin, and carbon dioxide. **Plant Physiology**, v. 81, p. 950 - 953, 1986.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Belmont, CA: Wadsworth. 1992. pp. 357-407, 531-548.

SALLANDROUZE, A.; FAUROBERT, M.; MAËTAOUI, M.E. Characterization of the development stages of cypress zygotic embryos by two-dimensional electrophoresis and by cytochemistry. **Physiology Plant**, v. 114, p. 608 – 618, 2002.

SAMPSON, M.J.; LOVELL, R.S.; CRAIGEN, W.J. Isolation, Characterization, and Mapping of Two Mouse Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel Isoforms. **Genomics**, v. 33, p. 283 – 288, 1996.

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

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; VIANA, A.M.; ESTELITA, M.E.M.; HANDRO W.; FLOH E.I.S. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis* **Plant Growth Regulation**, v. 49, 2006.

- SANTOS, A.L.W.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; VIDOR, M.; GUERRA, M.P. Somatic Embryogenesis in Paraná Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 97 – 106, 2002.
- SARAVANAN, R.S.; ROSE, J.K.C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, v. 4, p. 2522 – 2532, 2004.
- SARKAR, D.; NAIK, P.S. Synseeds in potato: an investigation using nutrient-encapsulated in vitro nodal segments. **Scientia Horticulturae**, v. 73, p. 179–184, 1998.
- SATYA-NARAIAN, V. ; NAIR PM. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. **Phytochemistry**, v. 29, p. 367 – 375, 1990.
- SCHADE, S.Z.; EARLY, S.L.; WILLIAMS, T.R.; KEZDY, F.J.; HEINRIKSON, R.L.; GRIMSHAW, C.E.; DOUGHTY, C.C. Sequence analysis of bovine lens aldose reductase. **Journal of Biology Chemistry**, v. 265, p. 3628 - 3635, 1990.
- SCHOLTEN, H.J. Effect of polyamines on the growth and development of some horticultural crops in micro propagation. **Science Horticulture**, v. 77, p. 83 - 88, 1998.
- SCHOFFL, F.; PRANDL, R.; REINDL, A. Regulation of the heat shock response. **Plant Physiology**, v. 17, p. 1135 – 1141, 1998.
- SCHULLER, A.; REUTHER, G. Response of *Abies alba* embryonal-suspensor mass to various carbohydrate treatments. **Plant Cell Report**, v. 12, p. 199 – 202, 1993.
- SEN, J.; KALIA, S.; GUHA-MUKHERJEE, S. Level of endogenous free amino acids during various stages of culture of *Vigna mungo* (L.) Hepper – Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. **Current science**, v. 82, n°4, p. 25, 2002.
- SETIANDY, Y.Y.; SEKINE, M.; HARIGUCHI, N.; YAMAMOTO, T.; KOUCHI, H.; SHINMYO, A. Tobacco mitotic cyclins: cloning, characterization, gene expression and functional assay. **Plant Journal**, v. 8, p. 949 – 957, 1995.
- SETIANDY, Y.Y.; SEKINE, M.; YAMAMOTO, T.; KOUCHI, H.; SHINMYO, A. Expression pattern of tobacco cyclin genes. **Plant Cell Report**, v. 16, p. 368 – 372, 1997.
- SHANNON, J.C. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. **Research Bulletin**, v. 842, p. 1 – 8, 1968.
- SHARMA, P.; RAJAM, M.V. Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embryogenesis from different regions of hypocotyl of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Journal Plant Physiology**, v. 146, p. 658 – 664, 1995.
- SHARGOOL, P.D.; JAIN, J.C.; MCKAY, G. Ornithine biosynthesis, and arginine biosynthesis and degradation in plant cells. **Phytochemistry**, v. 27, p. 1571 – 1574, 1988.
- SHARRY, S.; CABRERA-PONCE J.L.; HERRERA-ESTRELLA, L.; RANGEL-CANO, R.M.; LEDE S.; ABEDINI W. An alternative pathway for plant *in vitro* regeneration of chinaberry –tree *Melia azedarach* L. derived from the induction of somatic

embryogenesis **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9 n° 3, p. 187 – 194, 2006.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed Storage Proteins: Structures and biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 945 – 956, 1995.

SHEWRY, R.; CASEY, R. **Seed proteins**. Kluwer Academic Publ. 1999. 883p.

SHINSHI, H.; MOHNEN, D.; MEINS, J.R.F. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 89 - 93, 1987.

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

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, v.12, p. 303 – 312, 1993.

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

SINGH, A.K.; SHARMA, M.; VARSHNEY, R.; AGARWAL, S.S.; BANSAL, K.C. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *phyllanthus amarus* schum and thonn, a medicinally important plant species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p.109 – 113, 2006.

SMALL, J.G.C.; SCHULTZ, C.; CRONJE, E.; Relief of thermoinhibition in 'Grand Rapids' lettuce seeds by oxygen plus kinetin and their effects on respiration content of ethanol and ATP and synthesis of ethylene. **Seed Science Research**, v. 3, p.129 – 135, 1993.

SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 49 – 81, 2000.

SMÝKAL, P. Pollem embryogenesis – the stress mediated swich from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. **Biology Plantarum**, v. 43, p. 481 – 489, 2000.

SNEDDEN, W.A.; FROMM, H. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. **Trends Plant Science**, v. 3, p. 299 – 304, 1998.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3. ed. New York: Freeman and Co; 1995. 957 p.

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

STAMMERS, D.K.; REN, J.; LESLIE, K.; NICHOLS, C.E.; LAMB, H.K.; COCKLIN, S.; DODDS, A.; HAWKINS, A.R. The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 20, p. 6619 – 6626, 2001.

- STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 117 – 126, 2005.
- STEINER, N.; VIEIRA, F.N.; MALDONADO, S.; GUERRA M.P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 895 – 903, 2005.
- STEFFENS, J.C. Acyltransferases in Protease's Clothing, **The Plant Cell**, v. 12, p. 1253 – 1255, 2000.
- STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS K. Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells **American Journal of Botany**, v. 45, n°10, p. 705 – 708, 1958.
- STIRN, S.; JACOBSEN H. Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus **Plant Cell Report**, v. 6 p. 50 – 54, 1987.
- STONE, S.L.; GIFFORD, D.J. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) Seeds during germination and early seedling growth. I. Storage protein reserves. **International Journal of Plant Science**, v. 158, p. 727 – 737, 1997.
- STONE, S.L.; GIFFORD, D.J. Structural and Biochemical Changes in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) Seeds during Germination and Early Seedling Growth. II. Storage Triacylglycerols and Carbohydrates. **International Journal of Plant Sciences**, v. 160, p. 663 – 671, 1999.
- SREEDHAR, L.; BEWLEY, J.D. Nitrogen- and sulphur containing compounds enhance the synthesis of storage reserves in developing somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Science**, v. 134, p. 31 – 44, 1998.
- SUNG, Z.R.; OKIMOTO, R. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, p. 3683 – 3687, 1981.
- TANG, G.; LÜSCHER, M.; STURM A. Antisense Repression of Vacuolar and Cell Wall Invertase in Transgenic Carrot Alters Early Plant Development and Sucrose Partitioning. **The Plant Cell**, v. 11, p. 177 – 189, 1999.
- TANG, H.R.; REN, Z.L.; KREZAL, G. Improvement of English walnut somatic embryo germination and conversion by desiccation treatments and plantlet development by lower medium salts. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 36, p. 47 – 50, 2000.
- TANG, A.C.; KAWAMITSU, Y.; KANECHI M.; BOYER J.S. Photosynthetic Oxygen Evolution at Low Water Potential in Leaf Discs Lacking an Epidermis. **Annals of Botany**, v. 89, p. 861 – 870, 2002.
- THAPAR, N.; GRIFFITH, S.C.; YEATES, T.O.; CLARKE, S. Protein Repair Methyltransferase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* **Journal of Biology Chemistry**, v. 277, p. 1058 – 1065, 2002.
- THAPAR, N.; KIM, A.K.; CLARKE, S. Distinct patterns of expression but similar biochemical properties of protein L-isoaspartyl methyltransferase in higher plants. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1023 – 1035, 2001.

- THOMPSON, J.F. Arginine synthesis, proline synthesis and related processes. In: MIFLIN, B.J. (ed), **The Biochemistry of Plants, Amino Acids and Derivatives**, Vol 5. Academic Press, London, 1980. p. 375 – 402.
- THORP, G.; BIELESKI, R. **Feijoas: Origins, cultivation and uses**. David Bateman Ltd, New Zealand, 2002, pp 87.
- THORPE, T.A. In vitro organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; TRAN THANH VAN, T. (eds) **Morphogenesis in plants**. New York: Plenum Publishing Corp. 1993.
- TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1873 – 1899, 1991.
- TIBURCIO, A.F.; KAUR-SAWHNEY, R.; GALSTON, A.W. Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue cultures. **Plant Cell Physiology**, v. 7, p. 1241 – 1249, 1990.
- TORRIGIANI, P.; ALTAMURA, M.M.; PASQUA, G.; MONACELLI, B.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; BAGNI, N. Free and conjugated polyamines during de novo floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco. **Physiologia Plantarum**, v. 70, p. 453 – 460, 1987.
- TORREY, J.G. Cytodifferentiation in cultured cells and tissues. **HortScience**, v. 12, p. 14 – 15, 1977.
- TOYOOKA, K.; OKAMOTO, T.; MINAMIKAWA T. Cotyledon cells of *Vigna mungo* seedlings use at least two distinct autophagic machineries for degradation of starch granules and cellular components. **The Journal of Cell Biology**, v. 154, p. 973 – 982, 2001.
- TREMBLAY, L.; TREMBLAY F.M. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 27, p. 95 – 103, 1991.
- TSUGITA, A.; KAMO, M. 2-D electrophoresis of plant proteins. **Methods in molecular biology**, v. 112, p. 95 – 97, 1999.
- UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H. Method for glucose and other sugars, In: UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H.; STAUFFER, J.P. **Manometric Techniques**, Edition 4, Burguers Publishing Co. 1960.
- VAN ELDIK, G.J.; WINGENS, M.; RUITER, R.K.; VAN HERPEN, M.M.A.; SCHRAUWEN, J.A.M.; WULLEMS G.J. Molecular analysis of a pistil-specific gene expressed in the stigma and stilar cortex of *Solanum tuberosum*. **Plant Molecular Biology**, v. 30 p. 171 – 176, 1996.
- VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. Purification and properties of a neutral invertase from the roots of *Cichorium intybus*. **Physiologia Plantarum**. v. 93, p. 241 – 248, 1995.
- VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta amazônica**, v. 34, p. 507 – 511, 2004.
- VERKEST, A.; WEINL, C.; INZE, D.; DE VEYLDER, L.; SCHNITTGER A. Switching the Cell Cycle. Kip-Related Proteins in Plant Cell Cycle Control. **Plant Physiology**, v. 139, p. 1099 – 1106, 2005.

- VIANA, A.M.; MANTELL, H. Somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: an endangered tree of the Mata Atlântica (S. Brazil). In: JAIN, S.; GUPTA, P.; NEWTON, R. (eds) **Somatic embryogenesis in woody plants**. v. 5. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 3 – 30.
- VIDOZ, M.L.; KLUSACEK, P.; REY H.Y.; MROGINSKI L.A. In vitro plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) through somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 111 – 115, 2006.
- VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 579 – 620, 1991.
- VIKSONIELSEN, A.; CHRISTENSEN, T.M.; BOJKO, M.; MARCUSSEN, J. Purification and characterization of beta-amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 190 – 196, 1997.
- VILLANUEVA, R.V.; ADLASKHA, C.R.; CANTERA-SOLER, M.A. Changes in polyamine concentration during seed germination. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1245 – 1249, 1978.
- VOLLBRECHT, E.; VEIT, B.; SINHA, N.; HAKE, S. The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. **Nature**, v. 350, p. 241 – 243, 1991.
- VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 870 – 874, 1981.
- VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILANOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233 – 249, 2002.
- WALDEN, R.; CORDEIRO, A.; TIBURCIO, A.F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. **Plant Physiology**, v. 113, p. 1009 – 1013, 1997.
- WALKER, D.R.; PARROTT, W.A. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 55 – 62, 2001.
- WANG, G.; KONG, H.; SUN, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, W.; ALTMAN, N.; DEPAMPHILIS, C.W.; MA, H. Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1084 – 1099, 2004.
- WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, W. Sugar import and metabolism during seed development. **Trends Plant Science**, v. 2, p. 169 – 174, 1997.
- WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis**, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- WINKELMANN, T.; VAN DORSSELAER, D.H.A.; HANS-PETER BRAUN M.S. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination. **Physiologia Plantarum**, v. 224, p. 508 – 519, 2006.
- WISE, J.M.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? **Trends Plant Science**, v. 9, p. 13 – 1, 2004.
- YADAV, J.S.; RAJAM, M.V. Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity:

efficient somatic embryogenesis with putrescine. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1537 – 1545, 1997.

YANG, S. F.; DONG, J. G. Recent progress in research of ethylene biosynthesis. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 34, p. 89 – 101, 1993.

YAO, J.L.; KOPS, O.; LU, P.J.; LU, K.P. Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants. **Journal of Biology Chemistry**, v. 276, p. 13517 – 13523, 2001.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants, **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411 – 1423, 1993.

ZHANG, C.R.; HUANG, X.L.; WU, J.Y.; FENG, B.H.; CHEN Y.F. Identification of thidiazuron-induced ESTs expressed differentially during callus differentiation of alfalfa (*Medicago sativa*). **Physiologia Plantarum**, v. 128, p. 732 – 739, 2006.