



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA



CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**A relação do desenvolvimento de embriões somáticos iniciais de  
*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze com os conteúdos  
endógenos de carboidratos**

Florianópolis

Julho/2013

Maria Luiza Tomazi Pereira

Maria Luiza Tomazi Pereira

**A relação do desenvolvimento de embriões somáticos iniciais de  
*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze com os conteúdos  
endógenos de carboidratos**

Relatório de estágio apresentado  
ao curso de Graduação em  
Agronomia, do Centro de Ciências  
Agrárias, da Universidade Federal  
de Santa Catarina, como requisito  
para a obtenção do título de  
Engenheiro Agrônomo.  
Orientador: Miguel Pedro Guerra  
Supervisor: Vanildo Silveira  
Empresa: Universidade Estadual  
do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro (UENF)

Florianópolis – SC  
2013

*Dedico este trabalho ao meu pai Wilson Pereira e minha mãe  
Benilde Tomazi Pereira que tornaram tudo possível.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, especialmente aos meus pais Wilson Pereira e Benilde Tomazi Pereira por todo amor, carinho e apoio incondicionais em todas as minhas decisões durante a trajetória da graduação e minha irmã Débora Tomazi Pereira, por ser minha grande parceira em todos os momentos.

Ao meu orientador Miguel Pedro Guerra pela oportunidade de estagiar no LFDGV e por toda experiência científica que me proporcionou.

À Francine Lunardi Farias, minha grande amiga e mestre a quem devo eterna gratidão. À Neusa Steiner, meu exemplo e à Gladys Rogge Renner por todo apoio e incentivo durante o estágio.

Ao meu supervisor Vanildo Silveira pela atenção e confiança no meu trabalho e sua esposa Claudete Santa Catarina, pela hospitalidade durante o estágio em Campos dos Goytacazes.

Aos amigos do LFDGV pela parceria, risadas, trocas de experiências, pelos cafés e principalmente pela amizade.

Aos amigos do LBT da UENF, Victor, Kariane, Carol, Bianca, Tainá, Ângelo, Ellen, Jackellinne, Lucas e Ricardo, por fazerem das minhas horas em frente ao HPLC as mais divertidas da história, e principalmente, meu muitíssimo obrigada ao Ricardo Reis que não mediu esforços para a conclusão das análises.

Ao LABCEV, em especial ao Eder Carlos Schmidt pela paciência e bom humor.

Aos amigos da turma 2008.2, de toda a Agronomia e UFSC, e principalmente à Carina Malinowsky, Caroline Hawerth, Francine Pagnan Da Boit e Maíra Maciel Tomazzoli, minhas grandes amigas, com quem dividi tantas alegrias, tantos sufocos, tantas histórias e sem as quais não seria quem sou hoje.

Agradeço à UFSC pelo ensino público e de qualidade e ao CNPq que me oportunizou a Iniciação Científica por 4 anos.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da rota de desenvolvimento de embriões somáticos *A. angustifolia*. A- *Indução* da cultura embrionária 91002, no estágio pró-embriônico, em meio ½ LP livre de fitorreguladores; *Proliferação* da cultura embrionária, no estágio pró-embriônico, em meio BM, gelificado ou líquido, livre de fitorreguladores; e *Pré-tratamento* em meio DKM acrescido de 30 µM fluridone (FLD), entre a transição do estágio pró-embriônico e a embriogênese inicial. B- *Pré-maturação*, onde a transição de MPE para embriões somáticos iniciais foi obtida em meio de pré-maturação DKM, com as seguintes variações: 9% de maltose (1), 9% de maltose e 7% de polietilenoglicol 3350 (PEG) (2); 9% de lactose (3) e 9% de lactose e 7% de PEG (4). C- *Maturação* na embriogênese inicial, onde embriões somáticos foram cultivados em meio de maturação DKM suplementado com 9% de maltose e 7% de PEG acrescido de: 30 µM de ABA (a) ou 60 µM de ABA e 1.5g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado (b).....7

Figura 2. Caracterização morfológica por dupla coloração com carmim acético e azul de Evans de massas pró-embriônicas (MPE) e embriões somáticos iniciais (ES) da cultura embrionária 91002 de *A. angustifolia*. a-d Estádio pró-embriônico: MPE III da cultura embrionária 91002 em meio de proliferação (a-b), e após pré-tratamento em meio DKM acrescido de 30 µM de fluridone (FLD) (c,d). e-p Embriogênese inicial: MPE III e ES iniciais da cultura embrionária 91002 após tratamentos com FLD e pré-maturação em meio DKM acrescido de 9% de maltose (e, f); 9% de lactose (g,h); 9% de maltose e 7% de polietileno glicol 3350 (PEG) (i, j) e 9% de lactose e 7% de PEG (k, l). ES iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de lactose mais 7% de PEG, após quatro semanas em meio de maturação (DKM, 9% de maltose e 7% de PEG) com 30 µM de ABA (m). ES iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de maltose, após quatro semanas em meio de maturação (DKM, 9% de maltose e 7% de PEG) com 30 µM de ABA (n). ES iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de maltose, após quatro semanas em meio de maturação (DKM, 9% de maltose e 7% de PEG), acrescido de 60 µM de ABA e 1.5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado (o). ES iniciais

provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de lactose, após quatro semanas em meio de maturação (DKM, 9% de maltose e 7% de PEG), acrescido de 60  $\mu\text{M}$  de ABA e 1.5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado (p). Observe nas *MPE* e nos *ES* a presença de células embriogênicas (*CE*), células do suspensor (*CS*).....13

Figura 3. Microscopia de luz e análise histoquímica de massas pró-embrionárias (*MPE*) e embriões somáticos iniciais (*ES*) da cultura embrionária 91002 de *A. angustifolia*. a-d Estádio pró-embrionário: *MPE III* da cultura embrionária 91002 em meio de proliferação (a-b), e após pré-tratamento em meio DKM acrescido de 30  $\mu\text{M}$  de fluridone (FLD) (c,d). e-l Embriogênese inicial: *MPE III* e *ES* iniciais da cultura embrionária 91002 após tratamentos com FLD e pré-maturação em meio DKM acrescido de 9% de maltose (e); 9% de lactose (f); 9% de maltose e 7% de polietileno glicol 3350 (PEG) (g) e 9% de lactose e 7% de PEG (h). *ES* iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de maltose, após quatro semanas em meio de maturação (DKM, 9% de maltose e 7% de PEG) com 30  $\mu\text{M}$  de ABA (i,j). *ES* iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de lactose e 7% de PEG, após quatro semanas em meio de maturação DKM acrescido de 60  $\mu\text{M}$  de ABA e 1.5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado (k,l). Observe nas *MPE* e nos *ES* a presença de células embriogênicas (*CE*), células do suspensor (*CS*), núcleos (*N*) com um ou dois nucléolos (*Nu*), vacúolos, grãos de amido (*A*) e parede celular (*PD*).....14

Figura 4. Conteúdo de açúcares endógenos determinado em HPLC em  $\text{mg.g}^{-1}$  de massa fresca na cultura embrionária 91002 de *Araucaria angustifolia*. Controle: cultura multiplicada em meio BM, e FLD: cultura pré-tratada por 4 semanas no meio basal DKM suplementada com 30  $\mu\text{M}$  de FLD. A análise de variância foi feita individualmente para cada açúcar, portanto médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística, de acordo com o teste SNK ( $p < 0.05$ ). Barras na horizontal a cima da coluna corresponde ao desvio padrão.  $\text{CV}_{\text{sacarose}} = 21,44\%$   
 $\text{CV}_{\text{maltose}} = 92,58\%$      $\text{CV}_{\text{frutose}} = 40,36\%$      $\text{CV}_{\text{glicose}} = 24,44\%$ ,  
 $n=3$ .....19

Figura 5. Conteúdo de açúcares endógenos determinado em HPLC em  $\text{mg.g}^{-1}$  de massa fresca na transição de massas pró-embrionárias de *A. angustifolia* para

embriões somáticos iniciais. Os tratamentos de pré-maturação são constituídos do meio de cultura DKM suplementado com: 9% de maltose (M9), 9% de maltose e 7% de PEG (M9P7); 9% de lactose (L9); 9% de lactose e 7% de PEG (L9P7). A análise de variância foi feita individualmente para cada açúcar, portanto médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística, de acordo com o teste SNK ( $p < 0.05$ ). Barras na horizontal a cima da coluna corresponde ao desvio padrão.  $CV_{\text{sacarose}} = 102,9\%$   $CV_{\text{maltose}} = 14,51\%$   $CV_{\text{frutose}} = 12,8\%$   $CV_{\text{glicose}} = 10,85\%$   $n=3$ .....21

Figura 6. Conteúdo de açúcares endógenos determinado em HPLC em  $\text{mg.g}^{-1}$  de massa fresca em embriões somáticos iniciais de *A. angustifolia*. Os tratamentos de maturação são constituídos do meio de cultura DKM com 9% de maltose e 7% de PEG, sendo o primeiro suplementado com 30  $\mu\text{M}$  de ABA e o segundo com 60  $\mu\text{M}$  de ABA e 1.5g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. A análise de variância foi feita individualmente para cada açúcar, portanto médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística, de acordo com o teste SNK ( $p < 0.05$ ). Barras na horizontal a cima da coluna corresponde ao desvio padrão. A)  $CV_{\text{sacarose}} = 47,75\%$   $CV_{\text{maltose}} = 9,1\%$   $CV_{\text{frutose}} = 17,87\%$   $CV_{\text{glicose}} = 47,75\%$ . B)  $CV_{\text{sacarose}} = 25,68\%$   $CV_{\text{maltose}} = 14,23\%$   $CV_{\text{frutose}} = 9,69\%$   $CV_{\text{glicose}} = 20,28\%$   $n=3$ .....23

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ABA** - ácido abscísico

**BM** - meio de cultura proposto por Gupta & Pullman, 1991

**BOD** – Demanda bioquímica de oxigênio

**CBB<sub>1</sub>** - Azul brilhante de Coomassie

**CBB<sub>2</sub>** – Centro de Biociências e Biotecnologia

**CCA** - Centro de Ciências Agrárias

**CCB** – Centro de Ciências Biológicas

**CE**- célula embriogênica

**CS**- célula de suspensor

**CV** – coeficiente de variação

**DKM**- meio de cultura proposto por von Arnold e Clapham, 2008

**DMSO**- Dimetilsulfóxido

**ES**- embrião somático

**FLD**- fluridone

**HCl**- ácido clorídrico

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta performance

**L9**- tratamento de pré-maturação suplementado com 9% de lactose

**L9 P7**- tratamento de pré-maturação suplementado com 9% de lactose e 7% de PEG

**LABCEV** - Laboratório de Biologia Celular Vegetal

**LBT** – Laboratório de Biotecnologia

**LFDGV**- Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal

**ME** – massa embrionária

**MF** – massa fresca

**MPE**- massas pró-embrionárias

**M9** - tratamento de pré- maturação suplementado com 9% de maltose



**M9 P7** - tratamento de pré- maturação suplementado com 9% de maltose e 7% de PEG

**ML**- microscopia de luz

**NaOH**- hidróxido de sódio

**PAS** - Ácido Periódico de Schiff

**PEG** – polietilenoglicol

**UENF**- Universidade Estadual do Norte Fluminense

**UFCG** – Universidade Federal de Campina Grande

**UFSC**- Universidade Federal de Santa Catarina

$\frac{1}{2}$  **LP** – meio de cultura proposto por von Arnold & Clapham, 2008.

RESUMO - A *Araucaria angustifolia* é uma espécie nativa do Sul do Brasil que hoje se encontra na lista das espécies ameaçadas de extinção devido à degradação de grande parte do ecossistema no qual ela ocorre. Biotecnologias baseadas na cultura de tecidos se configuram em ferramentas úteis para a conservação e melhoramento de germoplasma desta espécie. Em coníferas, a rota regenerativa baseada na embriogênese somática é importante para a consecução deste objetivo. Os polissacarídeos parecem ter importantes funções durante as fases de desenvolvimento do embrião, por exemplo, a quantidade de açúcares ou o sentido do seu fluxo podem determinar um processo ou o momento em que ele ocorre, como a conversão de embriões somáticos em plântulas. O presente trabalho teve por objetivo determinar as concentrações de açúcares durante a transição de massas pró-embriônicas a embriões somáticos iniciais de *A. angustifolia* e assim analisar a relação do desenvolvimento de embriões somáticos iniciais com os conteúdos endógenos de carboidratos. Dessa forma, submeteu-se a cultura embrionária 91002 às seguintes etapas da rota de desenvolvimento da espécie: 1) Indução em meio de cultura ½LP isento de fitoreguladores; 2) Multiplicação em meio BM isento de fitoreguladores alternando entre meio sólido ou líquido; 3) Pré-tratamento com 30 µM de FLD por 4 semanas; 4) Pré-maturação com: a-meio DKM suplementado com 9 % de maltose; b-DKM suplementado com 9% de maltose e 7% de polietilenoglicol 3350 (PEG); c-DKM suplementado com 9% de lactose e d-DKM suplementado com 9% de lactose e 7% de PEG por 4 semanas e 5) Maturação com: a-meio DKM suplementado com 30 µM ABA e b-DKM suplementado com 60 µM de ABA e 1.5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado por 4 semanas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 8 repetições para cada tratamento das etapas da rota, composta por uma placa de Petri inoculada com 4 colônias de 300mg de massa fresca de MPE cada. As culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD ajustada para uma temperatura de 25±2°C e no escuro. Ocorreram avaliações morfológicas com dupla coloração com carmim acético a 1% e azul de Evans a 0.05%, análise em microscopia de luz através da histoquímica com PAS + CBB e determinação de carboidratos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os dados foram submetidos ao teste de análise de variância (teste F), que quando significativo seguiu para o teste SNK a 5% de probabilidade. As culturas embrionárias produziram abundantes MPE I, II e III e aquelas pré-tratadas com FLD produziram proporcionalmente mais MPE III, com maior quantidade de células de suspensor, grãos de amido e maiores teores de frutose, glicose e sacarose. As MPE tratadas na pré-maturação com meio de cultura suplementado com PEG tiveram a transição para embriões somáticos iniciais acelerada, sendo o tratamento com maltose e PEG o que gerou melhores resultados morfológicos e os tratamentos com maltose maior quantidade de grãos de amido. Ainda na pré-maturação, os tratamentos com lactose apresentaram conteúdo de maltose bastante elevado diferindo estatisticamente dos tratamentos suplementados com maltose. Os tratamentos de maturação com 30 µM de ABA e 60 µM de ABA mais 1.5 g.L<sup>-1</sup> não diferiram entre si, e ambos possibilitaram a formação de embriões iniciais.

Palavras-chave: Araucária, açúcares, amido, HPLC, lactose, maturação, maltose, PEG.

*The relation of the development of early somatic embryos with endogenous carbohydrate contents in Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze*

ABSTRACT - *Araucaria angustifolia* is a native species from Southern Brazil, which is now in the list of endangered species due to the degradation of most of the ecosystem in which it occurs. Biotechnologies based on tissue culture configure themselves into useful tools for germplasm conservation and breeding of this species. In conifers, the somatic embryogenesis-based regenerative route is important to achieving this goal. Polysaccharides seem to have important functions during the stages of embryo development, for example, the amount of sugars or its flow direction may determine a process or the moment at which it occurs, such as the conversion of somatic embryos into plantlets. This study aimed to determine the concentrations of sugars during the transition from proembryogenic masses (PEM) to early somatic embryos in *A. angustifolia* and thus analyze the relation of the development of early somatic embryos with endogenous carbohydrate contents. In this way, the 91002 embryonic culture was submitted to the following stages of the development route of the species: 1) Induction in culture medium  $\frac{1}{2}$  LP without plant growth regulators; 2) Multiplication in BM medium without growth regulators, alternating between solid or liquid medium; 3) Pretreatment with 30  $\mu\text{M}$  FLD for 4 weeks; 4) Prematuration with: a – DKM medium supplemented with 9% maltose; b – DKM medium supplemented with 9% maltose and 7% polyethylene glycol 3350 (PEG); c – DKM medium supplemented with 9% lactose; and d – DKM medium supplemented with 9% lactose and 7% PEG for 4 weeks; and 5) Maturation with: a – DKM medium supplemented with 30  $\mu\text{M}$  ABA; and b – DKM medium supplemented with 60  $\mu\text{M}$  ABA and 1.5  $\text{g.L}^{-1}$  activated charcoal for 4 weeks. The experimental design was completely randomized with 8 repetitions for each treatment of the route stages, consisting of a Petri dish inoculated with 4 colonies of 300 mg fresh weight of PEM per colony. The cultures were kept in BOD incubator adjusted to a temperature of  $25\pm 2$  °C in the dark. Morphological evaluations were performed using double staining with 1% acetic carmine and 0.05% Evans blue, analysis by light microscopy and histochemical tests and determination of carbohydrates by high-performance liquid chromatography (HPLC). Data were subjected to analysis of variance (F-test), and, when significant, submitted to the SNK test at 5% of probability. The embryonic cultures produced abundant PEM I, II and III and those treated with FLD produced proportionally more PEM III, with higher amounts of suspensor cells, starch grains, and higher levels of fructose, glucose and sucrose. PEM treated in prematuration stage with culture medium supplemented with PEG showed a faster transition to early somatic embryos, with the treatment with maltose + PEG showing better morphological results and the treatments with maltose showing higher amounts of starch grains. Treatments of prematuration with lactose showed a fairly high content of maltose, being statistically different from the treatments supplemented with maltose. Maturation treatments with 30  $\mu\text{M}$  ABA and 60  $\mu\text{M}$  ABA + 1.5  $\text{g.L}^{-1}$  activated charcoal were not significantly different and both of them provided the formation of early embryos. We observed the same patterns of starch content of the previous stages, a decrease in the maltose content of PEM treated with lactose at prematuration stage and a slight increase in sucrose concentration.

Key words: Araucária, sugars, starch, HPLC, lactose, maturation, PEG.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Carboidratos no desenvolvimento embrionário</i> .....	2
2. OBJETIVO GERAL .....	4
2.1 <i>Objetivos Específicos</i> .....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	5
3.1 <i>Material Vegetal</i> .....	5
3.1.2 <i>Indução e manutenção da cultura embrionária</i> .....	5
3.1.3 <i>Pré-tratamento das MPE</i> .....	6
3.1.4 <i>Pré-maturação das MPE</i> .....	8
3.1.5 <i>Maturação de embriões somáticos</i> .....	8
3.1.6 <i>Avaliações morfológicas</i> .....	9
3.1.7 <i>Análise em microscopia de luz (ML) e testes histoquímicos</i> .....	9
3.2 <i>Determinação de Carboidratos</i> .....	10
3.2.1 <i>Análise estatística</i> .....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4.1 <i>Desenvolvimento inicial dos embriões somáticos de A. angustifolia</i> .....	11
4.1.1 <i>Massas pró-embrionárias (MPE)</i> .....	11
4.1.2 <i>Transição entre MPE a embriões somáticos iniciais</i> .....	15
4.1.3 <i>Embriões somáticos iniciais</i> .....	16
4.2. <i>Determinação de Carboidratos</i> .....	17
4.2.1 <i>Massas pró-embrionárias (MPE)</i> .....	18
4.2.2 <i>Transição entre MPE a embriões somáticos iniciais</i> .....	19
4.2.3 <i>Embriões somáticos iniciais</i> .....	21
5. CONCLUSÃO.....	24
6. REFERÊNCIAS.....	25

## 1. INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, também conhecida como araucária ou pinheiro do Paraná, é uma conífera da família Araucariaceae, com ocorrência natural na floresta ombrófila mista do bioma Mata Atlântica do Brasil. Antes da colonização, essa floresta ocupava uma área expressiva da região Sul estimada em 200.000 Km<sup>2</sup>. Atualmente restam apenas fragmentos, que, somados, não atingem 3% da sua área original (GUERRA et al., 2002).

A araucária é um importante recurso econômico, social e cultural, sendo que, por um longo período da história brasileira a madeira retirada desta espécie foi alvo de exportação devido sua alta qualidade. A resina produzida na casca é muito utilizada na indústria e na medicina, e sua semente, conhecida como pinhão, é consumida tanto na alimentação humana como na de animais domésticos e da fauna silvestre (MATTOS, 1994). Além disso, a coleta do pinhão nas estações de outono e inverno serve como um importante recurso econômico para as famílias de baixa renda e para as comunidades coletoras (BALBINOT et al. 2008; VIEIRA-DA-SILVA & REIS, 2009).

Apesar de importância e do atual estado da sua floresta, há poucas unidades de conservação para o ecossistema da araucária, o que o torna crítico em termos de conservação e a inclui na Red List da IUCN, na Lista Nacional das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, elaborada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) (Instrução Normativa n. 06, de 23 de setembro de 2008) (SILVA et al., 2011) e mais recentemente indicada no relatório do Workshop da lista de espécies da flora catarinense ameaçadas de extinção de 2011.

Com base nisso, são cada vez mais necessárias medidas para a conservação da espécie, portanto, a ação conjunta de manejos convencionais para conservação dos remanescentes florestais e técnicas biotecnológicas torna-se uma importante opção (STEFENON et al., 2009).

As técnicas de cultura de tecidos vegetais são ferramentas úteis para programas de conservação e melhoramento em espécies florestais (VON ARNOLD et al., 2002). Em coníferas a rota regenerativa *in vitro* baseada na embriogênese somática é uma alternativa interessante para estes objetivos.

A embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986).

A modulação de um protocolo para a embriogênese somática para a araucária vem sendo objeto de uma série de trabalhos dos quais muitos avanços já foram obtidos. Dentre eles destaca-se o estabelecimento de protocolos para as fases de indução e multiplicação de culturas embriogênicas (ASTARITA & GUERRA, 1998, GUERRA et al., 2000; STEINER et al., 2005, STEINER et al. 2007), bem como o estabelecimento das condições necessárias para o desenvolvimento de embriões somáticos (SANTOS et al., 2002, SILVEIRA et al., 2002, STEINER, 2005, STEINER, 2009, STEINER et al., 2012, VIEIRA et al., 2012). Apesar destes esforços, os avanços no estabelecimento de um protocolo regenerativo completo para a embriogênese somática nesta espécie têm sido limitados em virtude do baixo número de embriões somáticos maduros formados. (STEINER, 2009).

A determinação das condições adequadas do cultivo *in vitro* e a caracterização dos eventos bioquímicos e fisiológicos do desenvolvimento destes embriões somáticos podem aumentar a quantidade e a qualidade dos embriões produzidos (STASSOLA & YEUNG, 2003).

### 1.1 Carboidratos no desenvolvimento embrionário

Os carboidratos são fotossintetizados nas plantas na forma de monossacarídeos e posteriormente transformados em dissacarídeos, trissacarídeos e açúcares alcoóis (GÓMEZ-GONZALEZ et al., 2010). Sendo que o principal carboidrato transportado nas plantas é a sacarose, e o amido é considerado como o principal carboidrato de reserva (GEIGENBERGER et al., 2004).

A principal função dos carboidratos é atuar como fonte de energia para as alterações metabólicas em plantas ou fornecendo moléculas de açúcares para biossíntese de lipídios, proteínas, antioxidantes e polissacarídeos (PESCADOR et

al., 2008; GÓMEZ-GONZALEZ et al., 2010). Além disso, podem atuar como base de energia para o crescimento, regulação da morfogênese e diferenciação celular dos vegetais, com grande importância na constituição da estrutura da parede celular (SMEEKENS, 2000).

Os polissacarídeos parecem ter importantes funções durante as fases de desenvolvimento do embrião (LIPAVSKÁ & KONRÁDOVÁ, 2004). Por exemplo, a quantidade de açúcares ou o sentido do seu fluxo podem determinar um processo ou o momento em que ele ocorre, como a conversão de embriões somáticos em plântulas (FLINN et al., 1993) e a germinação de sementes (GIBSON, 2005).

Durante o desenvolvimento do embrião e formação da semente observa-se uma gradativa mudança na concentração de polissacarídeos (FOCKS & BENNING, 1998). Desta forma, é de grande relevância identificar a ocorrência de cada carboidrato nas diferentes fases do desenvolvimento do embrião zigótico, e com base nisso direcionar e adequar essa variação durante o desenvolvimento de embriões somáticos (PESCADOR et al., 2008).

Culturas embrionárias dependem do fornecimento de energia exógena por meio da adição de carboidratos ao meio de cultivo. Por isso, os processos de síntese e armazenamento de carboidratos diferem entre a embriogênese zigótica e somática, uma vez que nesta última não há ligação fonte-dreno entre a planta mãe e o embrião formado (SGHAIER-HAMMAMI et al. 2009).

Em coníferas, ainda não há um consenso sobre os tipos e teores ideais de açúcares exógenos durante o desenvolvimento embrionário. Há indícios de que a sacarose tem efeitos estimulantes sobre o desenvolvimento do embrião, mesmo com sua rápida hidrólise (TABER et al., 1998; IRAQI & TREMBLAY, 2001). De acordo com Tremblay & Tremblay (1995) e Taber et al. (1998), a sacarose do meio de cultura é transformada em glicose e frutose por enzimas excretadas pelo tecido cultivado.

Segundo Lipavská & Kónradová (2004) a dinâmica do conteúdo endógeno de carboidratos durante a embriogênese somática de espécies do gênero *Picea* spp. é caracterizada por um alto teor de hexoses durante a fase de multiplicação, enquanto que o conteúdo de amido e proteínas vai declinando nas fases de maturação, desidratação e germinação.

Também foi reportado o sucesso da utilização da maltose e sua lenta

hidrólise em sistemas embrionários de abeto-branco (*Abies alba* Mill.) (SCHULLER & REUTHER, 1993 e seringueira (*Hevea brasiliensis*) (BLANC et al, 2002), e a utilização da lactose na obtenção de embriões somáticos de coníferas (SCHULLER & REUTHER, 1993; VOOKOVÁ et al., 1998).

Estabelecer a melhor combinação entre tipos e concentrações de açúcares exógenos é uma tarefa difícil, principalmente porque os carboidratos desempenham variadas funções durante a embriogênese somática, tais como: fontes de carbono e de energia; protetores de estresses e como moléculas de sinalização. Em geral, as funções particulares dos açúcares solúveis nas plantas são muito difíceis de distinguir já que estão rigidamente interligadas (LIPAVSKÁ & KONRÁDOVÁ, 2004).

## **2. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve por objetivo determinar as concentrações de açúcares durante a transição de massas pró-embriônicas a embriões somáticos iniciais de *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze e assim analisar a relação do desenvolvimento de embriões somáticos iniciais com os conteúdos endógenos de carboidratos.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Caracterizar o desenvolvimento inicial dos embriões somáticos de *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze através da microscopia de luz e de técnicas histoquímicas;
- Quantificar através do HPLC os teores de sacarose, maltose, frutose e glicose durante o desenvolvimento inicial dos embriões somáticos de *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze;
- Identificar a relação entre as diferentes etapas do desenvolvimento dos embriões somáticos iniciais de *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze com os conteúdos endógenos desses carboidratos.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas correspondentes à indução da embriogênese somática foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), no Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sendo a rota do desenvolvimento da espécie elaborada na tese da doutora Francine Lunardi Farias, aluna do programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais - CCA/UFSC.

#### 3.1 *Material Vegetal*

Megaestróbilos de *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze foram coletados em Dezembro de 2009 e Janeiro de 2010, de uma população de polinização aberta localizada na Estação Experimental da Epagri de Lages, (884m de altitude, 27° 48' 58" latitude sul e 50° 19' 34" longitude oeste) Santa Catarina, Brasil. As sementes da araucária, os pinhões, foram isolados e individualizados, sendo que os embriões zigóticos imaturos foram excisados e utilizados para a indução de culturas embrionárias.

#### 3.1.2 *Indução e manutenção da cultura embrionária*

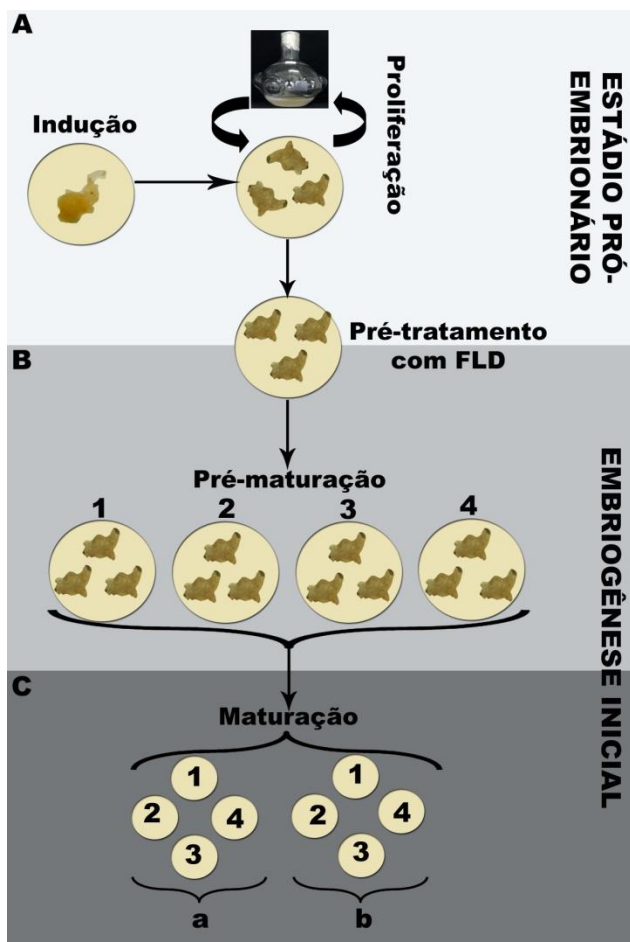
Foi utilizada a cultura embrionária 91002 de *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, induzida e estabilizada no período 2009/2010, em meio de cultura ½LP (VON ARNOLD & CLAPHAM, 2008) isento de fitoreguladores, acrescido de sacarose (10 g.L<sup>-1</sup>), L-glutamina (1 g.L<sup>-1</sup>), mio-inositol (1 g.L<sup>-1</sup>) e a caseína hidrolisada (0.5 g.L<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0.5N) e HCl (0.5N) antes da adição do phytigel® (2.0 g.L<sup>-1</sup>). Os compostos orgânicos foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem a 121°C por 15 min.

A cultura embrionária foi posteriormente repicada a cada 21 dias durante quatro meses para meio BM (GUPTA & PULLMAN, 1991), alternando entre meio sólido ou líquido, suplementado com sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>), L-glutamina (1 g.L<sup>-1</sup>), mio-inositol (1 g.L<sup>-1</sup>) e a caseína hidrolisada (0.5 g.L<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0.5N) e HCl (0.5N) antes da adição do

phytagel® (2.0 g.L<sup>-1</sup>), e os compostos orgânicos foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem do meio a 121°C por 15 min quando em meio sólido. Em meio líquido 100 mL de meio contendo todos os componentes foram autoclavados diretamente em frascos para suspensão celular a 121°C por 15 min, e quando em temperatura ambiente foram inoculadas na proporção de 2 g de massa fresca (MF) da cultura embrionária em 100 mL de meio de cultura. Tanto na indução quanto na proliferação as culturas em meio gelificado foram mantidas em estufa incubadora BOD, no escuro, com temperatura de 25±2°C. No caso da proliferação em meio líquido as culturas foram mantidas em disco rotativo orbital (aparato de Stewart) a uma baixa rotação (1 rpm) no escuro com temperatura de 25±2°C (Figura 1A).

### **3.1.3 Pré-tratamento das MPE**

Entre a pró-embriogênese e a embriogênese inicial, os meios de cultura DKM (VON ARNOLD & CLAPHAM, 2008) foram suplementados com 30 µM de fluridone (FLD) por quatro semanas (Figura 1A e B). Para isso as massas pró-embriônicas (MPE) foram inoculadas em placas de Petri (90x 10 mm) contendo 15 mL do meio de cultura DKM suplementado com sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>), mio-inositol (0.1 g.L<sup>-1</sup>), caseína hidrolisada (0.5 g.L<sup>-1</sup>) e 30 µM de FLD. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0.5N) e HCl (0.5N) antes da adição do phytigel® (2.0 g.L<sup>-1</sup>). Os compostos orgânicos foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem do meio a 121°C por 15 min. O FLD também foi adicionado ao meio após a autoclavagem, não havendo necessidade da filtroesterelização, já que é preparado diretamente em DMSO. As MPE foram submetidas a este tratamento por um período de quatro semanas e a repicagem para meio fresco ocorreu a cada duas semanas. As culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD ajustada para uma temperatura de 25±2°C e no escuro.



**Figura 1.** Representação esquemática da rota de desenvolvimento de embriões somáticos *A. angustifolia*. A- *Indução* da cultura embrionária 91002, no estágio pró-embrionário, em meio  $\frac{1}{2}$  LP livre de fitorreguladores; *Proliferação* da cultura embrionária, no estágio pró-embrionário, em meio BM, gelificado ou líquido, livre de fitorreguladores; e *Pré-tratamento* em meio DKM acrescido de  $30 \mu\text{M}$  fluridone (FLD), entre a transição do estágio pró-embrionário e a embriogênese inicial. B- *Pré-maturação*, onde a transição de MPE para embriões somáticos iniciais foi obtida em meio de pré-maturação DKM, com as seguintes variações: 9% de maltose (1), 9% de maltose e 7% de polietilenoglicol 3350 (PEG) (2); 9% de lactose (3) e 9% de lactose e 7% de PEG (4). C- *Maturação* na embriogênese inicial, onde embriões somáticos foram cultivados em meio de maturação DKM suplementado com 9% de maltose e 7% de PEG acrescido de:  $30 \mu\text{M}$  de ABA (a) ou  $60 \mu\text{M}$  de ABA e  $1.5\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado (b).

### **3.1.4 Pré-maturação das MPE**

As MPE originadas do pré-tratamento anterior foram repicadas para placas de Petri (60 x10 mm) contendo 15 mL do meio de pré-maturação, constituído de meio basal DKM, suplementado com mio-inositol ( $0.1 \text{ g.L}^{-1}$ ), caseína hidrolisada ( $0.5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e com fonte de carbono variando da seguinte forma: 1) meio DKM suplementado com 9 % de maltose; 2) DKM suplementado com 9% de maltose e 7% de polietilenoglicol 3350 (PEG); 3) meio DKM suplementado com 9% de lactose e 4) DKM suplementado com 9% de lactose e 7% de PEG (Figura 1B).

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0.5N) e HCl (0.5N) antes da adição do phytigel® ( $2.0 \text{ g.L}^{-1}$ ). Os compostos orgânicos foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem do meio a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min.

As MPE foram mantidas nestes tratamentos por quatro semanas e transferidas para meio fresco a cada duas semanas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 8 repetições para cada tratamento. Cada repetição foi composta de uma placa de Petri (60x10 mm) contendo 15 mL de meio de cultura e inoculadas com 4 colônias de 300 mg de massa fresca (MF) de MPE cada. As culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD ajustada para uma temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e no escuro.

### **3.1.5 Maturação de embriões somáticos**

O meio de maturação foi baseado na formulação salina do meio DKM acrescido de 9% de maltose e 7% de PEG variando da seguinte forma: tratamento 1) meio DKM suplementado com  $30 \mu\text{M}$  de ácido abscísico (ABA) e tratamento 2) meio DKM suplementado com  $60 \mu\text{M}$  de ABA e  $1.5 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado (Figura 1C). Os compostos orgânicos e o ABA foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem do meio a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min, sendo o ABA preparado e filtroesterilizado na isenção de luz.

As MPE foram mantidas neste meio por um período de quatro semanas e repicadas para meio fresco a cada duas semanas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 8 repetições para cada tratamento. Cada

repetição foi composta de uma placa de Petri (60x10 mm) contendo 15 mL de meio de cultura e inoculadas com 4 colônias de 300 mg de massa fresca (MF) de MPE cada. As culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD ajustada para uma temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e no escuro.

### **3.1.6 Avaliações morfológicas**

As avaliações morfológicas seguiram os procedimentos descritos por Steiner (2009). Amostras representativas de cada tratamento foram submetidas à dupla coloração com carmim acético a 1% e azul de Evans a 0.05% (GUPTA & DURZAN, 1987). As culturas coradas foram observadas em microscópio óptico invertido Olympus IX-81 e em microscópio óptico de luz Olympus BX-40 e as imagens foram capturadas pelo sistema de captação Olympus DP-40.

### **3.1.7 Análise em microscopia de luz (ML) e testes histoquímicos**

A análise foi realizada no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV), no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Amostras representativas de MPE dos diferentes tratamentos foram processadas para análises histoquímicas e morfológica em microscopia de luz. Amostras das MPE foram fixadas em solução de paraformaldeído 2.5% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, *overnight* (SCHMIDT et al., 2009). Após a fixação, as amostras foram lavadas e desidratadas em séries crescentes de etanol. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas em historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Secções com  $5\mu\text{m}$  de espessura foram coradas com diferentes testes citoquímicos e fotografados com o microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41), equipado com o sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América). As secções dos diferentes tratamentos foram coradas com os seguintes citoquímicos: Ácido Periódico de Schiff (PAS), utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (SCHMIDT et al., 2009) e Azul brilhante de Coomassie (CBB) para identificar a presença de proteínas totais (SCHMIDT et al., 2009).

### **3.2 Determinação de Carboidratos**

A extração e determinação de carboidratos ocorreram no Laboratório de Biotecnologia (LBT), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), de acordo com a metodologia proposta por Filson, Dawson-Andoh (2009), com modificações.

Para a extração dos carboidratos, foram coletadas 3 alíquotas de 300 mg de amostra fresca de cada tratamento gerando as repetições que foram posteriormente liofilizadas, cada amostra foi macerada em nitrogênio líquido com adição de 1 mL de Etanol 80%, todo o processo de maceração foi feito com o cadinho a uma temperatura de  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ . O macerado foi pipetado para um eppendorf de 2 mL e agitado em vórtex para homogeneização. Após todo esse processo, as amostras foram colocadas em banho-maria a  $70^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos e, centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado e o pellet remanescente ressuspendido em 0,2 mL de Etanol 80% e, novamente, centrifugado por mais 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e misturado ao primeiro. A amostra final foi filtrada em membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ , antes da análise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para detecção e identificação dos carboidratos, foi utilizado um detector por espalhamento de luz (ELSD-LT II, na sigla em inglês), com configurações ajustadas para temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , pressão de  $\text{N}_2$  em 350 kPa, ganho 9 e filtro 4. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Prevail Carbohydrate ES  $5\mu\text{m}$  (250 x 4.6 mm), com uma pré-coluna do tipo Prevail Carbohydrate ES  $5\mu\text{m}$  (7.5 x 4.6 mm). Sendo a temperatura do forno de colunas mantida a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Como solventes, que representam a fase móvel, foram utilizados: Água Milli-Q, solvente A, e acetonitrila 100%, solvente B. A mudança na proporção de acetonitrila em relação à proporção de água definiu o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila absoluta foi ajustado para 80%, durante os primeiros 16 minutos; de 80 a 70%, entre 16.50 e 23 minutos; e 80% até 30 minutos; com fluxo constante de  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Foram injetados 10  $\mu\text{L}$  da amostra.

### **3.2.1 Análise estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de análise de variância (teste F), que quando significativo seguiu para o teste SNK (Student-Newman-Keuls) a 5% de probabilidade. As análises foram feitas no programa ASSISTAT 7.6 beta (Software livre UFCG) e os gráficos no Microsoft Excel.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Desenvolvimento inicial dos embriões somáticos de *A. angustifolia***

#### **4.1.1 Massas pró-embrionárias (MPE)**

A partir da dupla coloração com carmim acético e azul de Evans observou-se na cultura embrionária 91002 a presença de células embriogênicas (CE) coradas em vermelho que são arredondadas e densas, e células de suspensor (CS) coradas em azul com um formato alongado (Figura 2a). Esses dois grupos celulares formaram agregados celulares denominados de massas pró-embrionárias (MPE). Nesta fase inicial observou-se MPE em três estádios de desenvolvimento (FILONOVA et al, 2000): MPE I, formadas por um pequeno agrupamento de células embriogênicas ligadas a uma ou duas CS (Figura 2b - seta), MPE II que apresentam uma maior agregação de CE e maior número de CS (Figura 2b – seta), sendo que nesses dois estádios as MPE apresentam polarização, e MPE III, formada por grandes aglomerados dos dois tipos celulares, porém sem polarização (Figura 2a).

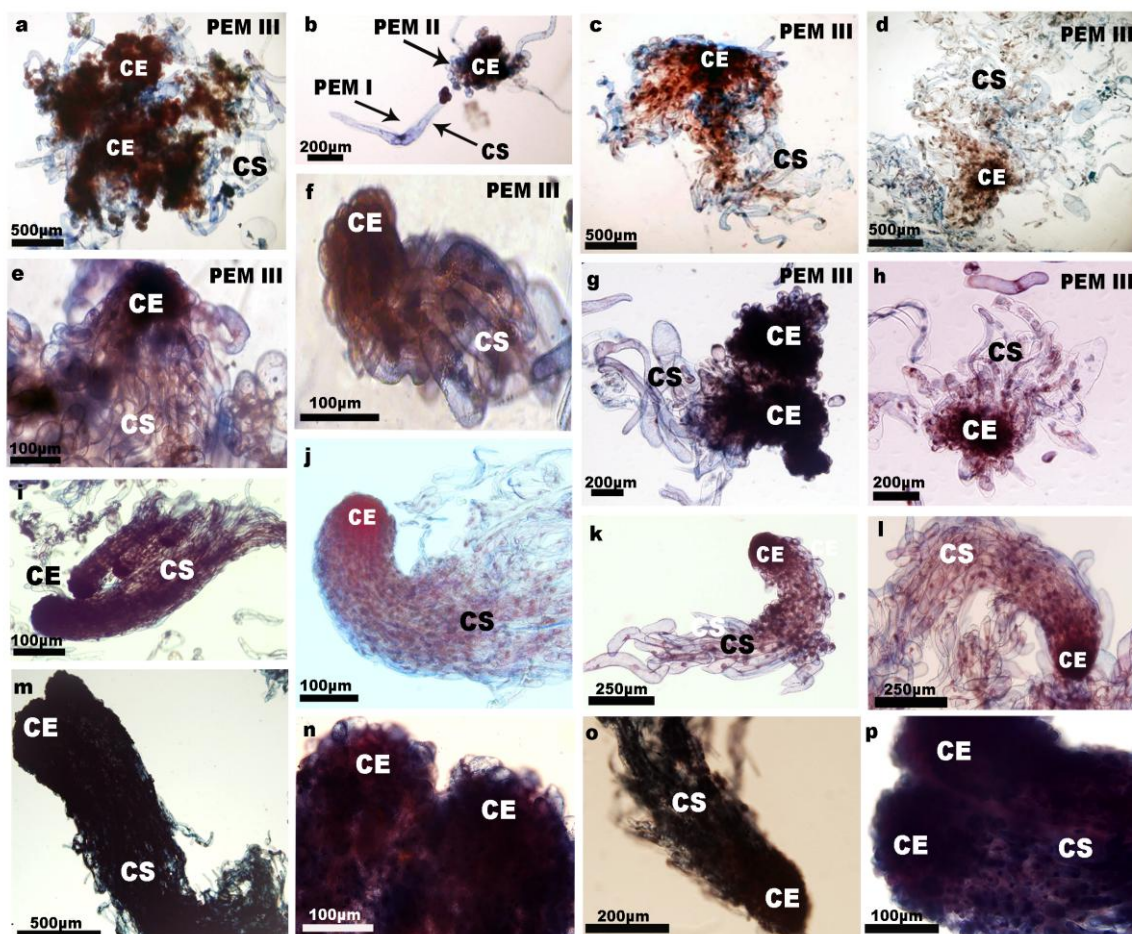
Após 4 semanas no pré-tratamento com 30  $\mu$ M de FLD as culturas mantiveram as mesmas características descritas, MPE I, II e III, sem haver qualquer tipo de transição morfológica para a formação de embriões somáticos (Figura 2c). No entanto, elas diferiram do controle pela maior produção de MPE III com maior quantidade de células de suspensor (Figura 2d).

A reação ao CBB obtida pela dupla coloração (CBB+PAS) nas análises histoquímicas mostrou que, a cultura embrionária antes e após o pré-tratamento com FLD apresentou MPE que continham CE com um grande e central núcleo, e

nele um ou dois nucléolos e denso citoplasma corados em azul (Figura 3 a-d). Além disso, as CS eram mais ou menos alongadas, apresentavam um grande vacúolo, e seus núcleos quando presentes se encontravam nas regiões periféricas da célula (Figura 3 b,d). O PAS marcou em rosa a presença de celulose na parede celular, sendo que esta reação foi mais forte nas CS (Figura 3 a,c). Além disso, o PAS marcou também em rosa, poucos e pequenos grãos de amido no citoplasma das CE da cultura embrionária, localizados ao redor dos núcleos, e nas CS foi observado um aumento na quantidade desses componentes de reserva (Figura 3 a,b).

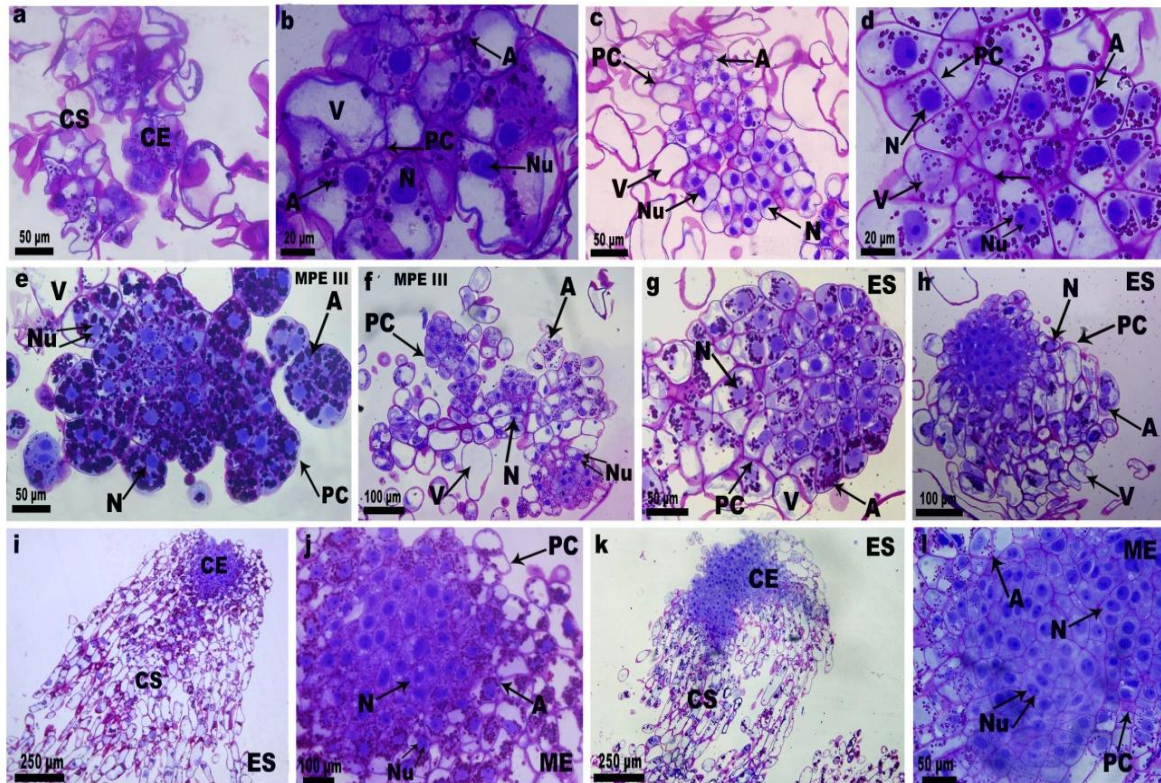
Após o pré-tratamento com FLD observou-se aumento na quantidade e tamanhos dos grãos de amido tanto nas CE como nas CS (Figura 3 c,d). Esta distribuição de amido está de acordo com o verificado em *Picea abies* (L.) Karst, onde um pequeno número de grãos de amido estava localizado no interior das CS e as CE, que são mais densas, encontraram-se desprovidas de amido (LIPAVSKÁ et al., 2000).





**Figura 2.** Caracterização morfológica por dupla coloração com carmim acético e azul de Evans de massas pró-embriônicas (*MPE*) e embriões somáticos iniciais (*ES*) da cultura embrionária 91002 de *A. angustifolia*. **a-d Estádio pró-embriônico:** *MPE III* da cultura embrionária 91002 em meio de proliferação (a-b), e após pré-tratamento em meio DKM acrescido de 30  $\mu\text{M}$  de fluridone (FLD) (c,d). **e-p Embriogênese inicial:** *MPE III* e *ES* iniciais da cultura embrionária 91002 após tratamentos com FLD e pré-maturação em meio DKM acrescido de 9% de maltose (e, f); 9% de lactose (g,h); 9% de maltose e 7% de polietileno glicol 3350 (PEG) (i, j) e 9% de lactose e 7% de PEG (k, l). *ES* iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de lactose mais 7% de PEG, após quatro semanas em meio de maturação (DKM, 9% de maltose e 7% de PEG) com 30  $\mu\text{M}$  de ABA (m). *ES* iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de maltose, após quatro semanas em meio de maturação (DKM, 9% de maltose e 7% de PEG) com 30  $\mu\text{M}$  de ABA (n). *ES* iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de maltose, após quatro semanas em meio de maturação (DKM, 9% de maltose e 7% de PEG), acrescido de 60  $\mu\text{M}$  de ABA e 1.5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado (o). *ES* iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de lactose, após quatro semanas em meio de maturação (DKM, 9% de maltose e 7% de PEG),

acrescido de  $60 \mu\text{M}$  de ABA e  $1.5 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado (p). Observe nas *MPE* e nos *ES* a presença de células embriogênicas (*CE*), células do suspensor (*CS*).



**Figura 3.** Microscopia de luz e análise histoquímica de massas pró-embriônicas (*MPE*) e embriões somáticos iniciais (*ES*) da cultura embrionária 91002 de *A. angustifolia*. **a-d Estádio pró-embriônico:** *MPE III* da cultura embrionária 91002 em meio de proliferação (a-b), e após pré-tratamento em meio DKM acrescido de  $30 \mu\text{M}$  de fluridone (FLD) (c,d). **e-l Embriogênese inicial:** *MPE III* e *ES* iniciais da cultura embrionária 91002 após tratamentos com FLD e pré-maturação em meio DKM acrescido de 9% de maltose (e); 9% de lactose (f); 9% de maltose e 7% de polietileno glicol 3350 (PEG) (g) e 9% de lactose e 7% de PEG (h). *ES* iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de maltose, após quatro semanas em meio de maturação (DKM, 9% de maltose e 7% de PEG) com  $30 \mu\text{M}$  de ABA (i,j). *ES* iniciais provenientes de meio de pré-maturação suplementado com 9% de lactose e 7% de PEG, após quatro semanas em meio de maturação DKM acrescido de  $60 \mu\text{M}$  de ABA e  $1.5 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado (k,l). Observe nas *MPE* e nos *ES* a presença de células embriogênicas (*CE*), células do suspensor (*CS*), núcleos (*N*) com um ou dois nucléolos (*Nu*), vacúolos, grãos de amido (*A*) e parede celular (*PC*).

#### **4.1.2 Transição entre MPE a embriões somáticos iniciais**

Após o pré-tratamento com FLD a cultura embrionária foi submetida a diferentes tratamentos de pré-maturação, e continuou a proliferar MPE I, II e grandes quantidades de MPE III compostas por grupos de CE bem definidas e CS mais alongadas, com as mesmas características já descritas para as MPE.

Todos os tratamentos de pré-maturação foram capazes de induzir a transição das massas pró-embriónicas para embriões somáticos iniciais após as 4 semanas de experimento (Figura 2 e-l). Observou-se que a presença do polietilenoglicol (PEG) no meio de cultura acelerou a transição das MPE para embriões somáticos iniciais, induzindo uma rápida individualização e polarização desses embriões a partir das MPE (Figura 2 i-l), visto que os tratamentos isentos desse agente osmótico apresentaram atraso no desenvolvimento, produzindo muitas MPE no estágio III (Figura 2 e-h).

O efeito benéfico do PEG no meio de maturação foi relatado pela primeira vez em *Picea glauca* (Moench) Voss (ATTREE et al., 1991), demonstrando-se também um efeito genótipo-dependente (NØRGAARD, 1997). Para *Picea abies* (L.) Karst. a maturação de embriões somáticos foi mais frequente em resposta a utilização de PEG (SVOBODOVA et al., 1999; LIPAVSKÁ et al., 2000). A principal função desse agente no meio de cultura é induzir o estresse hídrico da cultura *in vitro*, sem que haja redução no teor de umidade (LIPAVSKÁ et al., 2000).

A necessidade de um determinado nível de estresse osmótico nas MPE foi relatada por inúmeros autores que mostraram um efeito positivo do agente osmótico não penetrante PEG, com o número de embriões formados e em algumas das suas características (ATTREE et al, 1991. STASOLLA et al. 2003). Attree et al. (1995) relatou que apenas suplementando o meio de cultura com PEG foi possível promover a maturação de embriões de *P. glauca* (Moench) Voss. No entanto, a validade dos efeitos positivos do PEG é questionada por alguns autores (KONG & YEUNG, 1995; FIND, 1997; BOZHKOV e VON ARNOLD, 1998), que sugerem a necessidade de se estabelecer uma concentração ideal de PEG, caso exista, para genótipos particulares.

A análise morfológica pela dupla coloração de carmim acético e azul de Evans mostra que o tratamento de pré-maturação com maltose (9%) e PEG (7%)

foi o mais eficiente no processo de transição das MPE para embriões somáticos iniciais. Esses embriões foram caracterizados por possuírem um compacto grupo de CE, formando a massa embrionária (ME) seguida da região do suspensor composta de alongadas CS. A superioridade da maltose em alguns sistemas embrionários é explicada por um "déficit de carboidratos", hipótese baseada na necessidade de manter o conteúdo endógeno de carboidratos em um nível baixo por meio da hidrólise lenta da maltose (SCHULLER & REUTHER, 1993; BLANC et al, 2002), como observado para *P.abies* (L.) Karst. por Lipavská et al. (2000).

As diferentes fontes de carbono utilizadas no meio de cultura alteraram a quantidade de grãos de amido produzidos na célula. A análise histoquímica com PAS na dupla coloração (CBB+PAS) mostra que as células dos tratamentos com maltose (Figura 3 e,f,i,j) produziram mais grãos de amido do que as submetidas aos tratamentos suplementados com lactose (Figura 3 g,h,k,l). A distribuição destes componentes de reserva segue o padrão de maior quantidade nas CS e em menor ocorrência nas CE. Além disso, o uso do PEG no meio de cultura não interferiu na quantidade de grãos de amido, assim como também observado por Lipavská et al. (2000), a utilização do PEG não revelou diferença no teor de amido e na sua localização celular.

#### **4.1.3 Embriões somáticos iniciais**

Os embriões somáticos iniciais obtidos nos tratamentos de pré-maturação foram submetidos a duas diferentes concentrações de ABA (30 e 60  $\mu$ M) por 4 semanas. Após esta etapa, esses embriões somáticos iniciais foram caracterizados por possuírem alongamento da região do suspensor e ME compacta e opaca, sendo estas características comuns em todos os tratamentos (Figura 2 m-p).

O PAS mostra na análise histoquímica uma alta ocorrência de grãos de amido ao redor do núcleo nas CE, e um aumento desses nas CS seguindo o mesmo padrão descrito para as MPE em tratamentos anteriores.

Foi observado por Lipavská et al.(2000) a diminuição do teor de amido em embriões de *P. abies* (L.) Karst. no estágio final, mas que a partir da segunda

semana em meio de maturação iniciava uma lenta e crescente acumulação de grãos de amido, sendo essa concentração muito maior em CS quando comparadas às CE.

#### **4.2. Determinação de Carboidratos**

A análise em HPLC revelou quatro picos de açúcares nas MPE e embriões somáticos iniciais, foram eles: sacarose, maltose, frutose e glicose. Sendo que no mesmo tempo de retenção da glicose estava o pico de galactose, e o tempo de retenção da maltose coincidiu com o da lactose.

A rafinose e a estaquinose são dois carboidratos móveis produzidos por plantas, o primeiro formado por uma molécula de galactose e uma de sacarose, e o segundo por duas moléculas de galactose e uma de sacarose (TAIZ & ZEIGER, 2013). Ambos açúcares móveis foram identificados em embriões zigóticos de *Pinus taeda* L. na fase inicial (PULLMAN & BUCHANAN, 2008), portanto os dados de conteúdo endógeno de glicose devem ser considerados somados a possíveis moléculas de galactose que foram clivadas, o que, contudo, não foi possível identificar isoladamente nesta análise.

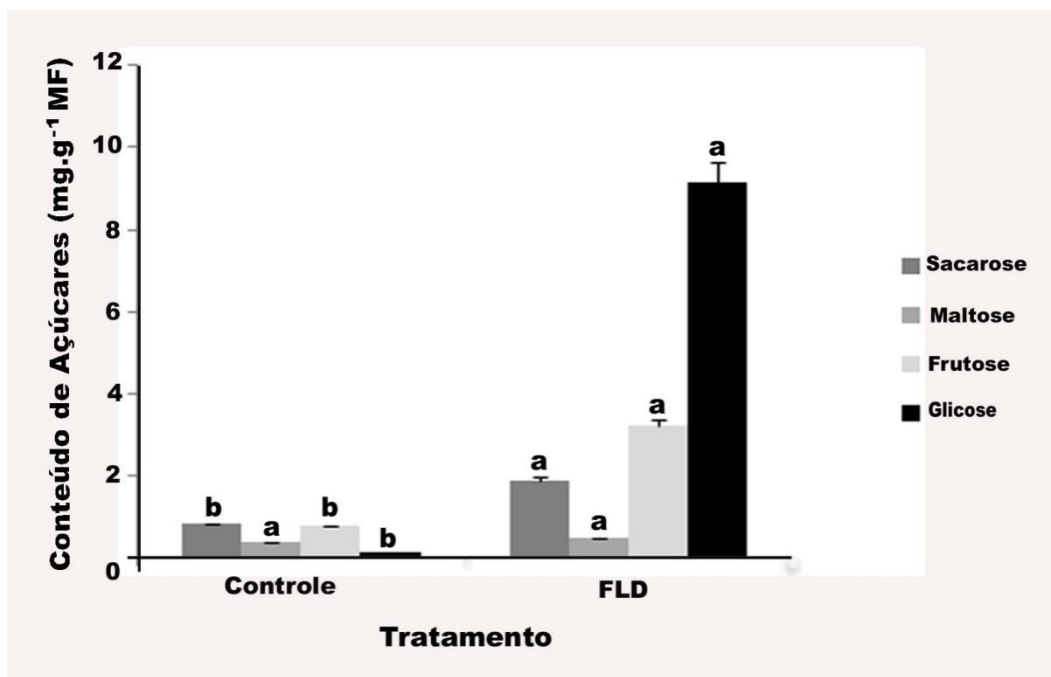
O mesmo ocorreu para a lactose, que teve seu pico sobreposto ao da maltose, devido principalmente ao fato de a massa molar de ambos serem iguais ( $342.30 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Como a lactose não é produzida por células vegetais, bem como a enzima lactase necessária para a quebra dessa molécula, considera-se o açúcar encontrado neste tempo de retenção como maltose.

Este evento também ocorreu nas análises de carboidratos de Pullman & Buchanan (2008) para *P. taeda* L., no qual foi difícil confirmar as identidades dos carboidratos como picos, pois não foram sempre claramente separados e alguns não puderam ser identificados, desta forma a maior parte dos dados apresentados no trabalho citado foram obtidos através de cromatografia gasosa e espectrômetro de massas, que é o que se sugere para o presente trabalho.

#### **4.2.1 Massas pró-embriónicas (MPE)**

Após o pré-tratamento com FLD, as concentrações de frutose, glicose e sacarose aumentaram diferindo estatisticamente do conteúdo endógeno verificado na cultura embrionária não tratada (Figura 4). A glicose apresentou maior aumento, de  $0,108 \text{ mg.g}^{-1}$  na cultura embrionária para  $9,17 \text{ mg.g}^{-1}$  após o pré-tratamento com FLD (Figura 4). Observa-se que a medida que os teores de glicose aumentaram nas MPE após o pré-tratamento com FLD também se elevaram os teores de amido identificados pela análise histoquímica. O amido é um polissacarídeo constituído de amilose e amilopectina que sofre degradação durante a noite. O resultado final da degradação do amido dentro da célula é uma molécula de glicose e uma de maltose, que correspondem a duas bombas no envelope do cloroplasto (TAIZ & ZEIGER, 2013). Desta forma o inibidor de produção de ABA utilizado (FLD) pode ter estimulado a produção dos carboidratos glicose e maltose e dentro das células ter ocorrido a fusão e formação dos grãos de amido, ou a molécula do amido pode ter sofrido quebra e então aumentado a concentração interna de maltose e mais expressivamente da glicose.

A maltose foi o açúcar encontrado em menor concentração após o pré-tratamento com FLD, seguido da sacarose (Figura 4). Os baixos níveis de sacarose na fase de proliferação estão de acordo com os resultados obtidos por Lipavská et al. (2000) na embriogênese somática de *P. abies* (L.) Karst.. A sacarose é um açúcar de armazenamento temporário em células vegetais, e que provavelmente foi quebrada em glicose e frutose, por enzimas exógenas (NØRGAARD, 1997).



**Figura 4.** Conteúdo de açúcares endógenos determinado em HPLC em  $\text{mg.g}^{-1}$  de massa fresca na cultura embrionária 91002 de *Araucaria angustifolia*. Controle: cultura multiplicada em meio BM, e FLD: cultura pré-tratada por 4 semanas no meio basal DKM suplementada com  $30 \mu\text{M}$  de FLD. A análise de variância foi feita individualmente para cada açúcar, portanto médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística, de acordo com o teste SNK ( $p < 0.05$ ). Barras na horizontal a cima da coluna corresponde ao desvio padrão.  $\text{CV}_{\text{sacarose}} = 21,44\%$   $\text{CV}_{\text{maltose}} = 43,91\%$   $\text{CV}_{\text{frutose}} = 40,36\%$   $\text{CV}_{\text{glicose}} = 24,44\%$ ,  $n=3$ .

#### 4.2.2 Transição entre MPE a embriões somáticos iniciais

As MPE que passaram pelos tratamentos de pré-maturação suplementados com a fonte de carbono lactose não apresentaram conteúdo endógeno de sacarose, sendo a maior taxa encontrada no tratamento com maltose (9%) mais PEG (7%) numa concentração de  $2,12 \text{ mg.g}^{-1}$  (Figura 5). Lipavská et al. (2000) observaram, para *P. abies* (L.) Karst., que a concentração de sacarose comparada aos outros carboidratos foi maior nos meios de cultura que continham PEG, porém para as MPE de *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze a utilização do PEG teve efeito contrário, sendo a sacarose o açúcar menos presente nas culturas embrionárias nesta etapa.

Os conteúdos de maltose não diferiram estatisticamente entre os dois tratamentos suplementados com este carboidrato, porém ambos tratamentos que

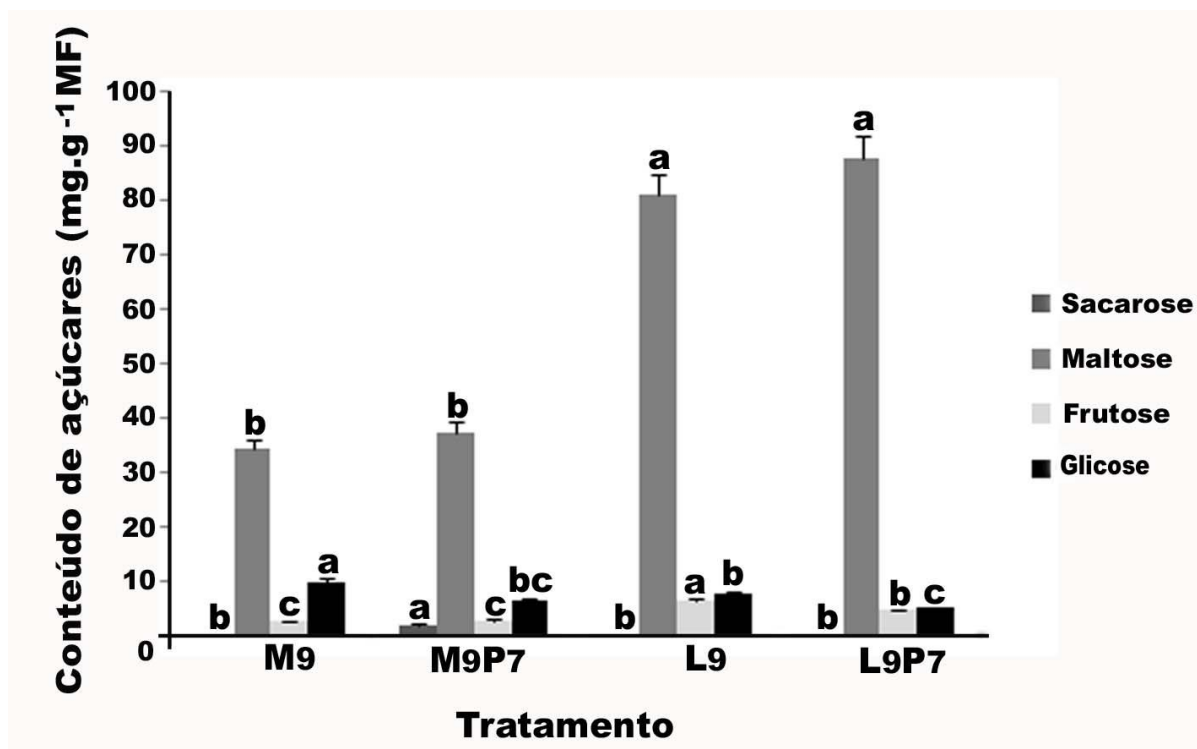
continham lactose (9%) tiveram o conteúdo de maltose bastante elevado atingindo  $87,66 \text{ mg.g}^{-1}$  no tratamento de lactose (9%) mais PEG (7%), visto que o tratamento com maltose (9%) e PEG (7%) apresentou MPE com  $37,40 \text{ mg.g}^{-1}$  desse carboidrato (Figura 5).

Não há relatos descrevendo como é realmente e se ocorre a absorção de lactose por células vegetais, porém este é mais um trabalho que confirma que algum suprimento de carboidrato para célula existe, pois as MPE continuavam a proliferar sem oxidação e trazendo bons resultados morfológicos, o que também foi observado por Castro et al. (2010) e Kunitake et al. (1991) em laranja lima. Para Schuller & Reuther (1993) e Vooková et al. (1998), a lactose foi a única fonte de carbono que estimulou a formação de embriões nas fases finais do desenvolvimento de *Abies alba* Mill.

De acordo com a análise histoquímica nesta fase da rota, observou-se um aumento na quantidade de amido nas MPE pré-maturadas com maltose, o que pode estar relacionado à constituição dos grãos de amido ser de maltose e glicose. Nos tratamentos de pré-maturação com lactose também houve a presença de grãos de amido, porém em menor proporção o que leva a refletir sobre de que forma este carboidrato está sendo assimilado pelas células da cultura embrionária de *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze.

A frutose foi identificada nas MPE de todos os tratamentos de pré-maturação sendo que no suplementado com lactose (9%) apresentou a maior concentração com  $6,58 \text{ mg.g}^{-1}$  do carboidrato, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos (Figura 5). Os tratamentos com maltose (9%) e maltose (9%) mais PEG (7%) tiveram uma menor concentração de frutose endógena não diferindo entre si. A glicose foi mais presente no meio com maltose (9%) e menos em lactose (9%) mais PEG (7%).





**Figura 5.** Conteúdo de açúcares endógenos determinado em HPLC em  $\text{mg.g}^{-1}$  de massa fresca na transição de massas pró-embriónicas de *A. angustifolia* para embriões somáticos iniciais. Os tratamentos de pré-maturação são constituídos do meio de cultura DKM suplementado com: 9% de maltose (M9), 9% de maltose e 7% de PEG (M9P7); 9% de lactose (L9); 9% de lactose e 7% de PEG (L9P7). A análise de variância foi feita individualmente para cada açúcar, portanto médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística, de acordo com o teste SNK ( $p < 0.05$ ). Barras na horizontal a cima da coluna corresponde ao desvio padrão.  $CV_{\text{sacarose}} = 50.24\%$   $CV_{\text{maltose}} = 14,51\%$   $CV_{\text{frutose}} = 12,8\%$   $CV_{\text{glicose}} = 10,85\%$   $n=3$ .

#### 4.2.3 Embriões somáticos iniciais

O ABA é considerado o hormônio de maior importância durante a fase mais tardia da embriogênese. Portanto, qualquer mudança no seu nível é determinante para o progresso de maturação dos embriões (LIPAVSKÁ & KONRÁDOVÁ, 2004). A maioria das culturas embrionárias de coníferas requerem ABA para que ocorra a maturação adequada dos embriões somáticos (DURZAN & GUPTA, 1987; HAKMAN & VON ARNOLD, 1985; BECWAR et al., 1990).

No presente trabalho, os conteúdos endógenos de açúcares dos embriões

somáticos iniciais dos dois tratamentos de maturação tiveram o mesmo padrão, como se observa na Figura 6.

A concentração de frutose foi mais alta nas MPE pré-maturadas com lactose que diferiram estatisticamente daquelas suplementadas com maltose (Figura 6 A,B). Observa-se um aumento no conteúdo de glicose da etapa de pré-maturação para a maturação, sendo que as MPE pré-maturadas com lactose (9%) diferiram estatisticamente dos outros tratamentos em ambos os meios de maturação, sendo que no suplementado com 30  $\mu\text{M}$  de ABA apresentou conteúdo de 22.18  $\text{mg.g}^{-1}$  (Figura 6A) e com 60  $\mu\text{M}$ , 21.37  $\text{mg.g}^{-1}$  (Figura 6B).

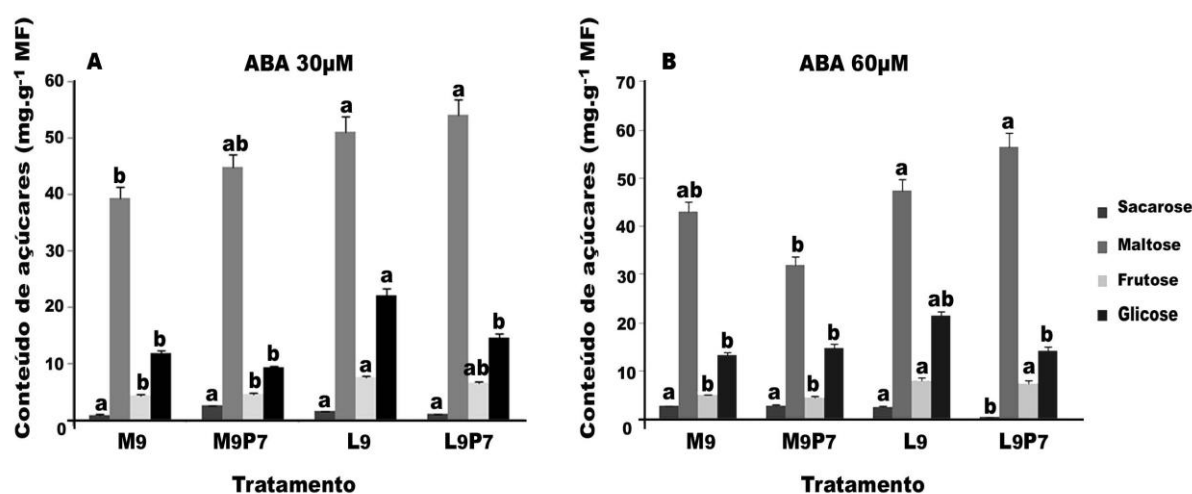
Após os tratamentos de maturação com ABA os embriões somáticos iniciais que passaram pelos tratamentos de pré-maturação com lactose (9%) e lactose (9%) mais PEG (7%) ainda apresentavam concentração estatisticamente maior de maltose, porém iniciando uma diminuição deste conteúdo, que levou a valores próximos aos encontrados nas MPE pré-maturadas com os dois tratamentos de maltose. Os embriões iniciais obtidos na maturação vindos da pré-maturação com maltose apresentaram nesta etapa conteúdos endógenos de maltose muito semelhantes aos observados na pré-maturação.

Segundo Lipavská & Kónradová (2004) há uma gradativa diminuição dos conteúdos de amido e de proteínas endógenas característico da fase de maturação na embriogênese somática de coníferas. O que se observa em *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze é que mesmo com os conteúdos endógenos de maltose diminuindo nesta fase para os tratamentos de pré-maturação com lactose e estabilizando nos suplementados com maltose, ainda assim foi observado pela análise histoquímica que a quantidade dos grãos de amido estava no mesmo padrão de quantidade identificado nos tratamentos das etapas anteriores. O teor de amido e a concentração endógena de maltose podem estar correlacionados, uma vez que o amido é constituído de uma molécula de maltose e outra de glicose.

A sacarose manteve-se em baixas concentrações, mas aumentou em relação aos tratamentos de pré-maturação. Os tratamentos de pré-maturação suplementados com lactose (9%) apresentaram sacarose nula nas MPE, e após os tratamentos de maturação as concentrações aumentaram. As MPE pré-maturadas em maltose (9%) e PEG (7%) e submetidas ao tratamento de

maturação com ABA 60  $\mu\text{M}$  chegaram a um teor de sacarose de 2,81  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , o mais elevado observado entre os tratamentos de maturação (Figura 6B). Este progressivo aumento do conteúdo de sacarose durante a rota do desenvolvimento do embrião somático já foi observado em outros trabalhos e está de acordo com o pressuposto de que a maturação está relacionada com o armazenamento e acumulação de material dentro das células (ROBERTS et al., 1990,. ATTREE et al., 1992).

O comportamento geral dos sacarídeos encontrados na análise demonstra que durante toda a rota do desenvolvimento estabelecida para *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze os conteúdos aumentaram de forma diferente, o que já havia sido constatado com o experimento de Lipavská et al. (2000) com *P. abies* (L.) Karst., que observou o aumento significativo do conteúdo de açúcares solúveis totais logo na primeira semana após a transferência da proliferação para o meio de maturação.



**Figura 6.** Conteúdo de açúcares endógenos determinado em HPLC em  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de massa fresca em embriões somáticos iniciais de *A. angustifolia*. Os tratamentos de maturação são constituídos do meio de cultura DKM com 9% de maltose e 7% de PEG, sendo o primeiro suplementado com 30  $\mu\text{M}$  de ABA e o segundo com 60  $\mu\text{M}$  de ABA e 1.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de carvão ativado. A análise de variância foi feita individualmente para cada açúcar, portanto médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística, de acordo com o teste SNK ( $p < 0.05$ ). Barras na horizontal a cima da coluna corresponde ao desvio padrão. A)  $\text{CV}_{\text{sacarose}} = 47,75\%$   $\text{CV}_{\text{maltose}} = 9,1\%$   $\text{CV}_{\text{frutose}} = 17,87\%$   $\text{CV}_{\text{glicose}} = 47,75\%$ . B)  $\text{CV}_{\text{sacarose}} = 25,68\%$   $\text{CV}_{\text{maltose}} = 14,23\%$   $\text{CV}_{\text{frutose}} = 9,69\%$   $\text{CV}_{\text{glicose}} = 20,28\%$   $n=3$ .

## 5. CONCLUSÃO

As culturas embrionárias de *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze produziram abundantes MPE I, II e III e aquelas submetidas ao FLD (30  $\mu$ M) produziram mais MPE III e com maior quantidade de CS. Os carboidratos frutose, sacarose e glicose tiveram suas concentrações aumentadas na cultura embrionária após o pré-tratamento com FLD, sendo que a glicose foi o açúcar que apresentou maior aumento, o que pode estar relacionado a uma maior produção de grãos de amido.

Todos os tratamentos de pré-maturação foram capazes de induzir a transição das massas pró-embrionárias para embriões somáticos iniciais, sendo que as MPE pré-maturadas com PEG tiveram a transição para embriões somáticos iniciais mais acelerada. O tratamento com maltose (9%) e PEG (7%) obteve os melhores resultados morfológicos caracterizados por um compacto grupo de CE e CS alongadas.

A análise histoquímica identificou maior quantidade de grãos de amido nas células dos tratamentos com maltose e a distribuição destes componentes de reserva estava em maior quantidade nas CS e em menor ocorrência nas CE. Além disso, o uso do PEG no meio de cultura não interferiu na quantidade da produção de grãos de amido para todos os tratamentos.

As MPE que passaram pelos tratamentos de pré-maturação suplementados com a fonte de carbono lactose não apresentaram conteúdo endógeno de sacarose, porém estes foram os tratamentos com maiores concentrações de maltose, diferindo estatisticamente dos tratamentos de pré-maturação suplementados com maltose.

A frutose foi identificada nas MPE de todos os tratamentos de pré-maturação sendo que o que continha lactose (9%) apresentou a maior concentração do carboidrato. A glicose foi mais presente no meio com maltose (9%) e menos em lactose (9%) mais PEG (7%).

Os tratamentos de maturação apresentaram resultados que não diferiram entre si. Tanto o tratamento com 30  $\mu$ M e o com 60  $\mu$ M de ABA possibilitaram a formação de embriões iniciais, mantendo a concentração de amido identificada na etapa de pré-maturação. Ambos tratamentos apresentaram aumento na concentração dos açúcares endógenos sacarose, maltose, frutose e glicose em

relação ao identificado nas etapas que o precederam. A concentração da maltose diminuiu nas MPE tratadas na pré-maturação com lactose e havendo um leve aumento da concentração de sacarose em todos os tratamentos.

## 6.REFERÊNCIAS

- ASTARITA, L.V.; GUERRA, M.P. **Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures**, Brazilian Journal of Plant Physiology, 10:113-118; 1998.
- ATTREE, S.M.; MOORE, D.; SAWHNEY, V.K.; FOWKE, L.C. **Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos: effects of a nonplasmolysing water stress and abscisic acid**. Ann. Bot. 68:519±525; 1991.
- ATTREE, S.M.; POMEROY, M.K.; FOWKE, L.C. **Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance**. Plant. 187:395±404; 1992.
- ATTREE, S.M.; POMEROY, M.K.; FOWKE, L.C. **Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage**. J. Exp. Bot. 46:433±439; 1995.
- BALBINOT, R; GARZEL, J.C.L.; WEBER, K.S.; RIBEIRO, A.B. **Tendências de consumo e preço de comercialização do pinhão (semente da *Araucaria angustifolia* (Bert.) Ktze.), no Estado do Paraná**. In: *Ambiência*, Guarapuava-PR, v. 4, n. 3, p. 463-472, set./dez. 2008.
- BECWAR, M.R.; NAGMANI, R.; WANN, S.R. **Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*)**. Can. J. For. Res. 20:810±817; 1990.
- 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.)**. J. Exp. Bot. 53:1453–1462; 2002.
- BOZHKOVA, P.V.; VON ARNOLD, S. **Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further growth of *Picea abies* somatic embryos**. Physiol. Plant. 104:211–224; 1998.
- CASTRO, L.M.; FILHO, F.A.A.M.; MENDES, B.M.J.; MIYATAI, L.Y. **Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.8, p. 1831-1834, agosto, 2010.
- DURZAN, D.J.; GUPTA, P.K. **Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas fir cell suspension cultures**. Plant Sci. 52:229±235; 1987.
- FILONOVA, L.H., BOZHKOVA, P.V.; VON ARNOLD, S. **Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking**. Journal of Experimental Botany 51:249-264; 2000

FILSON, P.B.; DAWSON-ANDOH, B.E. **Characterization of sugar from model and enzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detection.** *Bioresource Technology*; 24;6661-6664; 2009.

FIND, J.I. **Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination.** *Plant Sci.*128:75–83; 1997.

FLINN, B.S.; ROBERTS, D.R.; NEWTON, C.H.; CYR, D.R.; WEBSTER, F.B.; TAYLOR, I.E.P. **Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce.** *Physiology Plant*; 89;719-730; 1993.

FOCKS, N.; BENNING, C. **Wrinkled: a novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in seed-specific regulation of carbohydrate metabolism.** *Plant Physiology*; 118;91-101; 1998.

GEINGENBERGER, P. STITT, M.; FERNIE, A.R. **Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers.** *Plant Cell & Environment*; 27;655-673; 2004.

GIBSON, S.I. **Control of plant development and gene expression by sugar signaling.** *Current Opinion in Plant Biology*; 8;93-102; 2005.

GÓMEZ-GONZÁLEZ, S; RUIZ-JIMÉNEZ, J.;PRIEGO-CAPOTE, F.;CASTRO, M.D.L. **Qualitative and quantitative sugar profiling in olive fruits, leaves, and stems by gas chromatography – tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) after ultrasound-assisted leaching.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 58;12292-12299; 2010.

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

GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; SCHNAIDER, L.; SEDREZ, M.; NODARI, R.O. In Simões,L.L. e Lino, C.F. (ed) **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais.** São Paulo. SENAC; 2002.

GUPTA, P.K., DURZAN, D.J. **Somatic embryos from protoplasts of loblolly pine proembryonal cells.** *Biotechnology* 4:643-645; 1987.

GUPTA, P.K., PULLMAN, G.S. **Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation.** US patent 5: 36-37; 1991.

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

IRAQI, D.; TREMBLAY, F.M. **The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) BSP) and white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos.** *Physiol. Plant.* 111:381–388; 2001.

KONG, L.; YEUNG, E. C. **Effects of silver nitrate and polyethylene glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content.** *Physiol. Plant.* 93:298–304; 1995.

KUNITAKE, H.; KAGAMI, H.; MII, M. **Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.).** *Scientia Horticulturae*, v.47, p.27-33, 1991.

LIPAVSKÁ, H.; SVOBODOVÁ, HANA; ALBRECHTOVÁ, J.; KUMSTÝROVÁ, L. VÁGNER, M.; VONDRÁKOVÁ, Z. **Carbohydrate Status During Somatic Embryo Maturation In Norway Spruce.** *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:260-267, July-August 2000.

LIPAVSKÁ, H.; KONRÁDOVÁ, H. **Invited review: somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism.** *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, New York, v.40, p.23-30, 2004.

MATTOS, J.R. DE. **O Pinheiro Brasileiro.** 2 ed. Artes gráficas Princesa Ltda. Lages-SC; 1994.

NØRGAARD, J. V. **Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk.** *Plant Sci.* 124:211–221; 1997.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G.B.; KRAUS, J.E.; FERREIRA, W.M.; GUERRA, M.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. **Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca selowiana* (Myrtaceae).** *In Vitro Cell*; 44:289-299; 2008.

PULLMAN, G.S.; BUCHANAN, M. **Identification and quantitative analysis of stage-specific carbohydrates in loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo and female gametophyte tissues.** *Tree Physiology*, Heron Publishing—Victoria, Canadá; 28, 985–996; 2008.

ROBERTS, D.R.; FLINN, B.S.; WEBB, D.T.; WEBSTAR, F.B.; SUTTON, C.S. **Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce.** *Physiol. Plant* 78:355±360; 1990.

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*, 45: 97-106; 2002.

SCHMIDT, E.C., SCARIOT, L.A., ROVER, T., BOUZON, Z.L. **Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (*Rhodophyta, Gigartinales*), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure.** *Micron* 40:860–869; 2009.



SCHULLER, A.; REUTHER, G. **Response of *Abies alba* embryonal-suspensor mass to various carbohydrate treatments.** Plant Cell Rep. 12:199±202; 1993.

SGHAIER-HAMMAMI, B.; BOUZID, R.G.; DRIRA, N. **Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: Comparative study.** Scientia Horticulturae;116;169-175; 2008.

SILVA, C. V.; MARTINS G.; STEINER, N. SANTOS, K. L.; CAMARGO, R. S.; MANTOVANI, A.; KUBO, R. R.; GUERRA, M. P.; REIS, M. S. ***Araucaria angustifolia*: Pinheiro do Paraná.** In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. (Eds.) Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro- região Sul. Brasília: MMA, 934p.; 2011.

SILVEIRA, V.; STEINER, N.; SANTOS, A.L.; W., NODARI, R.O.; E GUERRA, M. P. **Biotechnology tolls in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis.** Crop Breeding And Applied Biotechnology, 2;463-470; 2002.

SMEKEENS, S. **Sugar-induced signal transduction in plants.** Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology; 51;49-81; 2000.

STASOLLA, C.; VAN ZYL, L.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W. B.; SEDEROFF, R. R. **The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos.** Plant Physiol.131:49–60; 2003.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. **Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryos quality.** Plant Cell, Tissue Organ Cult., 74:15-35; 2003.

STEFENON, V.; CAPRESTRANO, C. **Monoicy in *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae): I. Morphological aspects of the reproductive structures.** Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 81:701-705; 2009.

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

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.; GUERRA, M.P. **Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures.** Plant Cell Tiss Org Cult., 89:55-62; 2007.

STEINER, N. 2009. **Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* (Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

STEINER, N., SANTA-CATARINA, C., GUERRA, M.P., CUTRI, L., DORNELAS, M.C., FLOH, E.I.S. **A gymnosperm homolog of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (SERK1) is expressed during somatic embryogenesis.** Plant Cell Tiss Organ Cult.109:41-50; 2012.

SVOBODOVÁ , H.; ALBRECHTOVÁ, J.; KUMSTÝROVÁ, L.; LIPAVSKÁ, H.; VÁGNER, M.; VONDRÁKOVÁ, Z. **Somatic embryogenesis in Norway spruce: anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process.** Plant Physiol. Biochem. 37:209–221; 1999.

TABER, R.P.; ZHANG, C.; HU, W.S. **Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development.** Can. J. Bot. 76:863–871; 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 5ed. Porto Alegre: Artmed, 279p; 2013

TREMBLAY, L.; TREMBLAY, F. M. **Maturation of black spruce somatic embryos: sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium.** Plant Cell Tiss. Org. Cult. 42:39±46; 1995.

VIEIRA DA SILVA, C. **Aspectos da obtenção e comercialização de pinhão na região de Caçador, SC.** 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VIEIRA, L.N., SANTA-CATARINA, C., FRAGA, H.P.F., SANTOS, A.L.W., STEINMACHER, D.A., SCHLOGL, P.S., SILVEIRA, V., STEINER, N., FLOH, E.I.S., GUERRA, M.P. **Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission.** Plant Science 195:80-87; 2012.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZKOV, P.; DYACHOK, J.; FILANOVA, L. **Developmental pathways of somatic embryogenesis.** Plant Cell Tissue and Organ Culture, 69:233-249; 2002.

VON ARNOLD, S.; CLAPHAM, D. **Spruce embryogenesis.** In: Suárez MF, Bozhkov PV (eds). Plant embryogenesis methods in molecular biology. Humana, Totowa, NJ, 427:31–47; 2008.

VOOKOVÁ, B.; GAJDOSOVÁ, A.; MATÚSOVÁ , R. **Somatic embryogenesis in *Abies alba*, *Abies alba* and *Abies alba*, *Abies nordmanniana* hybrids.** Biol. Plant. 40:523–530;1998.

WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN G. **Somatic embriogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group.** Ann. Bot., 57:443-462; 1986.