

Francine Lunardi Farias

**EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA E SOMÁTICA EM *Araucaria
angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE: PARÂMETROS CELULARES
E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Título de doutora em Ciências – Área
de concentração: Recursos Genéticos
Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro
Guerra

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Neusa
Steiner

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca da UFSC

Farias, Francine Lunardi
EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA E SOMÁTICA EM Araucaria
angustifolia (BERTOL.) KUNTZE: PARÂMETROS CELULARES E
BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS / Francine Lunardi Farias ;
orientador, Miguel Pedro Guerra ; co-orientadora, Neusa
Steiner. - Florianópolis, SC, 2013.
138 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Araucaria
angustifolia. 3. Embriogênese somática. 4. Embriogênese
zigótica. 5. Dehidrinas. I. Guerra, Miguel Pedro. II.
Steiner, Neusa. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. IV. Título.

*Dedico este trabalho à minha família, em especial a Amanda Valle Soares (**in memorian**) que muito me ensinou sobre o amor e a perseverança frente às adversidades.*

AGRADECIMENTOS

Eu creio que para tudo na vida existe um objetivo maior mesmo que, por alguns períodos da nossa existência isso seja esquecido, e que nenhuma situação nos é imposta mas sim por nós escolhida, afinal o livre-arbítrio é o maior presente que ganhamos de Deus, e se bem utilizado nos permite estar em constante evolução. S é assim, somos plenamente capazes de discernir e escolher nossos atos e por eles responder, e é por isso que eu só tenho a agradecer a todos.

Primeiramente a Deus e aos anjos que me guiam todos os dias. Ao meu esposo Felipe, por todo amor, carinho, apoio, incentivo e principalmente pela compreensão durante este período das nossas vidas. Aos meus pais José e Noive e aos meus sogros Mauro e Tereza pelo amor e apoio. Aos meus irmãos, cunhados e cunhadas, e todos os sobrinhos e sobrinhas por tantas alegrias.

Ao meu orientador Prof. Miguel P. Guerra por todos os ensinamentos, oportunidades, momentos de compreensão e principalmente por ter acreditado no meu trabalho. A minha amiga e co-orientadora Prof.^a Neusa Steiner pela grande contribuição, dedicação e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos demais professores que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial Prof.^a Zenilda (UFSC) e a Prof.^a Sara Maldonado (UBA).

Aos amigos Éder Schimidt e Gladys D. Rogge-Renner pelas contribuições e pela amizade As alunas de iniciação científica, Maria Luiza Tomazi Pereira e Bruna Scheid, que se dedicaram para a concretização deste trabalho. Aos demais amigos que compartilharam comigo esta jornada, em especial à Poliana, Camila P. Martins, Cris Magalhães, Cris Silva, Felipe Steiner, Caroline, George, Jenny e demais colegas do LFDGV.

Aos professores que gentilmente aceitaram fazer parte da banca de avaliação deste trabalho. Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pelos ensinamentos compartilhados.

Ao laboratório central de microscopia eletrônica desta univervdade (LCME). Aos funcionários da universidade, em especial a Bernadete (CCA/ Fitotecnia) e Eliana (LCME).

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro. E a todos os demais que de alguma forma contribuíram para a minha formação e a realização deste trabalho, recebam a minha gratidão!

RESUMO

A *Araucaria angustifolia* é uma conífera da família Araucariaceae, com ocorrência na floresta ombrófila mista, tipologia do bioma Mata Atlântica do Brasil que atualmente, encontra-se ameaçada de extinção. Esta condição reforça a necessidade de aplicação de medidas para a conservação desta espécie. Para que isto ocorra de forma eficaz é necessário o emprego conjunto de manejos convencionais para conservação dos remanescentes florestais e ferramentas biotecnológicas. Sendo assim, o presente trabalho propõe avanços na área de fisiologia, bioquímica e morfogenética que podem ser aplicados em técnicas de conservação de sementes e a propagação *in vitro* via embriogênese somática desta espécie. Análises de western blot em sementes de araucária detectaram a presença de desidrinas nos extratos termoestáveis e termosensíveis de eixos e cotilédones de embriões zigóticos dessa espécie, e um possível mecanismo de defosforilação dessas proteínas. Além disso, imunolocalizações *in situ* por microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostraram que estas proteínas estão presentes em todos os tecidos dos eixo embrionário e cotilédones, e a nível subcelular elas foram associadas aos corpos proteicos, microcorpos e a cromatina no núcleo. Os padrões desenvolvimento de embriões somáticos desta espécie foram acompanhados por ML, microscopia confocal (MC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e MET. Os resultados mostraram que culturas embrionárias de *A. angustifolia* proliferam através de massas pró-embriônicas (MPE) em três estágios de desenvolvimento, I, II e III, e que somente o estágio III é capaz de dar origem aos embriões somáticos (ES) iniciais. ES iniciais foram caracterizados pela presença de massa embrionária (ME) composta pelas células embriogênicas (CE), a qual é ligada a região do suspensor. O suspensor foi composto inicialmente pelas células do embrião do tubo (CT), seguidas pelas células de suspensor (SC), sendo que estes dois tipos celulares se diferem pelo diferente grau de vacuolização e desorganização celular. Além disso, por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível verificar que o desenvolvimento inicial dos embriões somáticos de *A. angustifolia* foram relacionados com uma redução do ABA endógeno e da poliamina putrescina na etapa de proliferação das MPE, seguido de aumento de ABA endógeno e das poliaminas spermidina e espermina, durante a embriogênese inicial.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*, conservação de sementes, desidrinas, embriogênese somática, embriões somáticos iniciais

ABSTRACT

Araucaria angustifolia is an endangered conifer of the South of Brazil. This condition reinforces the need to implement measures for the conservation of this species. For this to happen effectively requires the combined use of conventional managements for conservation of forest remnants and biotechnological tools. Therefore, this work proposes advances in physiology, biochemistry and morphogenetic that can be applied in seed conservation techniques and *in vitro* propagation via somatic embryogenesis of this species. Western blot analysis of Brazilian pine seeds detected the presence of dehydrins in the total proteins and heat-stable extracts from axis and cotyledons from zygotic embryos, and a possible mechanisms for dephosphorylation of these proteins. Furthermore, immunolocalization *in situ* of dehydrins by light microscopy (LM) and transmission electron microscopy (TEM) showed the presence of these proteins in all tissues of the embryonic axis and cotyledons. At the subcellular level they were associated with protein bodies, microbodies and chromatin in the nucleus. The standards development of somatic embryos of this species were followed by LM, confocal microscopy (CM), scanning electron microscopy (SEM) and TEM. The results showed that embryogenic cultures of *A. angustifolia* proliferate by proembryogenic masses (PEM) in three developmental stages I, II and III and, only the PEM III are able to give rise to early somatic embryos (ES). Early ES were characterized by the presence of embryonal mass (EM) composed of embryogenic cells (EC), which is connected to the region of the suspensor. The suspensor was composed by embryonal tube cells (CT) followed by suspensor-like cells (SC), and these two cell types differ by degree of vacuolation and dismantling cell. Furthermore, by analysis of high performance liquid chromatography (HPLC) was verified that the development of early somatic embryos of *A. angustifolia* were associated with a decrease in endogenous contentes of ABA and polyamine putrescine in the proliferation step of MPE, followed by an increase of endogenous contentes of ABA and polyamines spermine and spermidina during the early embryogenesis.

Key words: *Araucaria angustifolia*, conservation of seeds dehidrinas, somatic embryogenesis, early somatic embryos

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1** - Padrões de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*. 1) Embrião zigótico imaturo; 3,4,5) Massas pró-embriônicas (MPE) as quais passam por três estádios de desenvolvimento de acordo com o tamanho e número de células; 6) Início do estabelecimento da polaridade e individualização do embrião somático; 7,8,10) Anormalidades morfológicas (ápice largo (7), gêmeos (8), células embriogênicas na região do suspensor (10) observadas em pró-embriões individualizados após 30 dias em meio de maturação; 9) Pró-embrião com morfologia normal, porém com células embriogênicas na região do suspensor, 11-14) Estádios observados durante o final da embriogênese após 80 dias em ABA; 15) Germinação do embrião somático; PC1) Ponto crítico 1 do protocolo, que se refere a embriogênese inicial e sugere-se uma etapa adicional de pré-maturação; e PC2) Ponto crítico 2 do protocolo, que se refere a embriogênese tardia, e está relacionado maturação dos embriões somáticos; ce) células embriogênicas; cs) células do suspensor; PGR) Fitorreguladores. (STEINER, 2009). 20
- Figura 2** - Sementes maduras de *A. angustifolia* coletadas em maio de 2011, na Floresta Nacional de Três Barras. A- pinha madura; B- pinhão maduro; C- embrião zigótico maduro; e D-embrião zigótico maduro dividido em eixo e cotilédones. 22
- Figura 3** - 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 geleificado ou líquido, livre de fitorreguladores por um período de quatro meses, e *Pré-tratamento* em meio DKM acrescido de 30 µM fluridone (FLD) por quatro semanas, 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), marcando o início da embriogênese inicial. 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 uM de ABA (*a*) ou 60 uM de ABA e 1.5% de carvão ativado (*b*).
..... 28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2,4-D-** ácido 2,4-diclorofenóxiacético
ABA- ácido abscísico
AIA- ácido 3-indolacético
AT-O- azul de toluidina
BAP- 6-benzilaminopurina
BCIP- 5-bromo-4-cloro-3-indolylfosfato
BM- meio de cultura proposto por Gupta & Pullman, 1991
CBB- azul brilhante Coomassie
CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência
CE- célula embriogênica
CS- célula de suspensor
CT- célula do tubo embrionário
DAPI- 4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DKM- meio de cultura proposto por von Arnold e Clapham, 2008
DMSO- Dimetilsulfóxido
ES- embrião somático
FLD- fluridone
HCL- ácido clorídrico
Kin- cinetina
L 9%- tratamento de pré- maturação suplementado com 9% de lactose
L 9% PEG 7%- tratamento de pré- maturação suplementado com 9% de lactose e 7% de PEG
LEA- *late embryogenesis abundant*
LCME- laboratório central de microscopia eletrônica
LFDGV- laboratório de fisiologia do desenvolvimento e genética vegetal
MPE- massas pró-embriônicas
M 9%- tratamento de pré- maturação suplementado com 9% de maltose
M 9% PEG 7%- tratamento de pré- maturação suplementado com 9% de maltose e 7% de PEG
MC- microscópio confocal
MCP - morte celular programada
ME- massa embrionária
MET- microscopia eletrônica de transmissão
MEV- microscopia eletrônica de varredura
MF- matéria fresca
MgCl₂- cloreto de magnésio
ML- microscopia de luz
NaCl- cloreto de sódio

NaOH- hidróxido de sódio
NBT- nitroblue tetrazolium
N₂- nitrogênio líquido
PA- poliaminas
PAS- ácido periódico de Schiff
PBST- tampão fosfato de sódio 10 mM e 0.5% (v/v) de Tween 20, pH 7.2
PC1- ponto crítico 1
PC2- ponto crítico 2
PEG- polietilenoglicol - 3350
PMSF- fluoreto de fenilmetilsulfonil
Put- putrescina
Rpm- rotação por minuto
SDS- dodecil sulfato de sódio
Spd- espermidina
Spm- espermina
TBS- tampão salino composto de 50mM Tris HCl, NaCl 150 mM, pH 8
TTBS- tampão salino TBS com 0,5 % (v/v) de tween 20, pH 8
Tris- tris-(hidroximetil)-aminometano
TPA- transporte polar de auxina
UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina
UFLA- Universidade Federal de Lavras
v/v- volume/volume
w/v- peso/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS.....	21
1.1.1 <i>Objetivo geral</i>	21
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	21
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
1.2.1 <i>Embriogênese zigótica</i>	21
1.2.1.1 Material vegetal e obtenção das frações proteicas	21
1.2.1.2 Eletroforese das frações proteicas.....	23
1.2.1.3 Ensaio de Western Blot	23
1.2.1.4 Ensaio de defosforilação	24
1.2.1.5 Preparo das amostras para microscopia de Luz (ML) e eletrônica de transmissão (MET).....	24
1.2.1.6 Imunolocalização in situ por ML.....	24
1.2.1.7 Imunolocalização in situ por MET	25
1.2.2 <i>Embriogênese somática</i>	26
1.2.2.1 Material Vegetal.....	26
1.2.2.2 Indução e manutenção da cultura embrionária.....	26
1.2.2.3 Pré-tratamento das MPE.....	27
1.2.2.4 Pré- maturação das MPE.....	29
1.2.2.5 Maturação de embriões somáticos.....	29
1.2.2.6 Avaliações morfológicas.....	30
1.2.2.7Análise em microscopia de luz (ML) e testes histoquímicos.....	30
1.2.2.8 Análise em microscópio confocal (MC).....	30
1.2.2.9 Análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET)	31
1.2.2.10 Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	31
1.2.2.11 Determinação de AIA e ABA.....	31
1.2.2.12 Determinação de Poliaminas (PA).....	32
1.2.2.13 Análise estatística.....	32
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO 1	36
IMMUNOANALYSIS OF DEHYDRINS IN ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA EMBRYOS	36
ABSTRACT	37
CAPÍTULO 2	38
TRANSITION OF PROEMBRYOGENIC MASSES TO SOMATIC EMBRYOS IN ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA (BERT.) O. KUNTZE IS RELATED TO THE ENDOGENOUS CONTENTS OF IAA, ABA AND PA38	

ABSTRACT	39
CAPÍTULO 3	40
MORPHOLOGICAL AND COMPONENT CHARACTERIZATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> (BERT.) O. KUNTZE	40
ABSTRACT	41
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

A família Araucariaceae está distribuída no hemisfério sul, ocorrendo na Nova Caledônia, Nova Guiné, Austrália, Nova Zelândia e América do Sul (SETOGUCHI *et al.*, 1998). Na América do Sul, as principais espécies são *A. araucana* (Molina) K. Koch e *A. angustifolia* (Bertol.) Kuntze, sendo esta última, a única espécie da família naturalmente presente no Brasil (SHIMIZU & OLIVEIRA, 1981).

Os pinheirais fazem parte da Floresta Ombrófila Mista, a qual integra o bioma da Mata Atlântica.

A denominação “Mista” refere-se à presença das gimnospermas *A. angustifolia* e *Podocarpus lambertii* (Klotzsh ex Eichler), o pinheirinho brasileiro, consorciadas com angiospermas de gêneros primitivos como *Drymis* (Winteraceae), *Ocotea*, *Cryptocarya* e *Nectandra* (Lauraceae), entre outras (VELOSO *et al.*, 1991).

No início do século XX cerca de 35% da cobertura vegetal dos estados do sul do Brasil estavam representados pela Floresta Ombrófila Mista, e o Estado de Santa Catarina apresentava uma área coberta de próxima a 42,5% (GUERRA *et al.*, 1999; 2002; 2008)

A madeira serrada e laminada da *A. angustifolia* foi, por um longo período, um dos produtos mais importantes na exportação brasileira. Além do uso como madeira, utiliza-se também a resina exsudada principalmente da casca. E, por último, o pinhão que apresenta aspectos fundamentais para a região sul do Brasil, pois está intimamente ligado à sobrevivência de várias famílias de baixa renda em épocas de outono e inverno (BALBINOT *et al.*, 2008), revelando-se um importante recurso econômico e de valor social e cultural para as comunidades coletoras (VIEIRA-DA-SILVA & REIS, 2009).

A intensa exploração de *A. angustifolia* ao longo do século passado, associada à ausência de programas de melhoramento e conservação, fez com que restassem apenas alguns remanescentes, estimados em aproximadamente 2 e 5% da área original, que se encontram fragmentos e, a grande maioria, cobertos com formações secundárias em fase inicial ou intermediária de sucessão (GUERRA *et al.*, 1999; 2002; 2008). Sendo ainda que, boa parte da diversidade genética que ainda resta desta espécie é mantida em pequenas áreas em propriedades de agricultores familiares (ZECHINI, 2012). Este cenário dificulta o fluxo gênico entre as populações remanescentes, e como consequência, aumenta a probabilidade de erosão genética levando a

perda de alelos importantes e que, conseqüentemente pode levar a perda da capacidade adaptativa frente às mudanças ambientais (STEINER, 2009).

A exploração predatória da araucária ocasionou uma drástica redução das paisagens anteriormente ocupadas por esta floresta, levando este espécie a constar na *Red List* da IUCN (*The World Conservation Union*), na Lista Nacional das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, elaborada pelo Ministerio do Meio Ambiente (MMA) (Instrução Normativa n. 06, de 23 de setembro de 2008) (SILVA *et al.*, 2011) e mais recentemente ser indicada no relatório do Workshop da lista de espécies da flora catarinense ameaçadas de extinção de 2011. Esta condição reforça a necessidade de aplicação de medidas para a conservação desta espécie (STEFENON *et al.*, 2009). No entanto, para que isto ocorra de forma eficaz é necessário o emprego conjunto de manejos convencionais para conservação dos remanescentes florestais e o uso de ferramentas biotecnológicas que também contribuam para a conservação desta espécie.

No laboratório de fisiologia do desenvolvimento e genética vegetal (LFDGV-UFSC) estudos com vistas à conservação desta espécie vêm sendo realizados desde 1992 (GUERRA & KEMPER, 1992). Dentre vários estudos já realizados, destaca-se àqueles referentes à biologia do desenvolvimento embrionário da *A. angustifolia*, por meio de uma importante rota de desenvolvimento morfogenético *in vitro*, a embriogênese somática.

A embriogênese somática é definida como um processo no qual uma estrutura bipolar, semelhante a um embrião zigótico, se desenvolve a partir de uma célula somática sem conexão vascular com o tecido original (von ARNOLD *et al.*, 2002)

Baseando-se nos trabalhos desenvolvidos no LFDGV ao longo de vários anos, STEINER (2009) propôs um modelo de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*. Este processo se inicia com a indução das culturas embrionárias a partir de embriões zigóticos imaturos, em meio contendo ou não ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-benzil amino purina (BAP) e cinetina (Kin) (Figura 2 A), seguido da proliferação dessas culturas embrionárias em meios de cultura contendo ou não os fitorreguladores mencionados, porém em menores concentrações. Ainda nesta fase as MPE, formadas pelos dois grupos celulares, células embriogênicas e células do suspensor (Figura 2 A1) passam pelos três estádios de desenvolvimento,

de acordo com o tamanho e número de células: MPE I, MPE II e MPE III (Figura 2 B) (FILONOVA *et al.*, 2000a). A etapa seguinte caracteriza a embriogênese inicial, onde se acredita que assim como em *P. abies*, a partir de MPE III surgem embriões somáticos polarizados e individualizados (Figura 2 C). No entanto, diferentemente de *P. abies*, em *A. angustifolia* esta etapa de transição entre MPE e embriões somáticos se inicia com a transferência direta das MPE para o meio de maturação, que contém uma alta concentração de ABA (150 μ M). Na embriogênese tardia as culturas embrionárias continuam sendo repicadas para o mesmo meio de maturação (Figura 2 D). Segundo este modelo, há dois pontos a serem melhorados neste protocolo: o ponto crítico 1 (PC1) que sugere a necessidade de uma etapa adicional de pré-maturação, a fim de ativar a transição de MPE a embriões somáticos, e que neste trabalho é chamado de embriogênese inicial e; o ponto crítico 2 (PC2) que se refere à etapa de maturação na presença de ABA, e que neste trabalho se refere a embriogênese tardia (STEINER, 2009).

Como sugerido no PC1, o que se observa hoje nas culturas embrionárias de araucária é uma grande dificuldade na transição das MPE III para embriões somáticos aptos a progredirem para estádios avançados do desenvolvimento embrionário, e o ponto fundamental parece estar relacionado à ausência da polarização das MPE III. Segundo STEINER (2005) o PC2, que se refere à baixa frequência de embriões somáticos em estádios tardios de desenvolvimento, não se deve somente às condições inadequadas de cultura durante a maturação, mas sim ao estágio inadequado de desenvolvimento em que as culturas são submetidas ao tratamento com ABA. FILONOVA *et al.*, (2000a) sugerem que, em coníferas, as MPE necessitam um determinado grau de organização morfológica antes de serem submetidas a tratamento com ABA durante a maturação. Este grau de organização que os autores citam é justamente o surgimento dos embriões somáticos a partir das MPE III, onde se observa a polarização e individualização destes embriões (Figura 1 B). Assim, STEINER (2009) sugere para *A. angustifolia* uma etapa de pré-maturação, objetivando a transição das MPE para embriões somáticos, monitorando-se os balanços hormonais endógenos de AIA e ABA e suas relações com o transporte polar de auxina (TPA) e a morte celular programada (MCP).

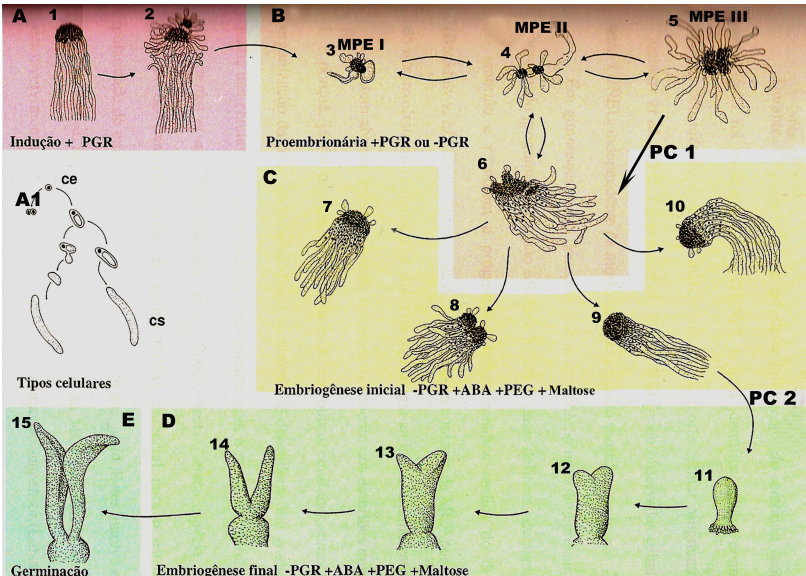


Figura 1 - Padrões de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*. 1) Embrião zigótico imaturo; 3,4,5) Massas pró-embriônicas (MPE) as quais passam por três estádios de desenvolvimento de acordo com o tamanho e número de células; 6) Início do estabelecimento da polaridade e individualização do embrião somático; 7,8,10) Anormalidades morfológicas (ápice largo (7), gêmeos (8), células embriogênicas na região do suspensor (10) observadas em pró-embriões individualizados após 30 dias em meio de maturação; 9) Pró-embrião com morfologia normal, porém com células embriogênicas na região do suspensor, 11-14) Estádios observados durante o final da embriogênese após 80 dias em ABA; 15) Germinação do embrião somático; PC1) Ponto crítico 1 do protocolo, que se refere a embriogênese inicial e sugere-se uma etapa adicional de pré-maturação; e PC2) Ponto crítico 2 do protocolo, que se refere a embriogênese tardia, e está relacionado maturação dos embriões somáticos; ce) células embriogênicas; cs) células do suspensor; PGR) Fitorreguladores. (STEINER, 2009).

Além disso, estudos focados na embriogênese zigótica também têm sido realizados no LFDGV, buscando a compreensão nas bases fisiológicas das sementes de *A. angustifolia* alternativas que permitam a aplicação de ferramentas biotecnológicas para a conservação desta espécie. Sendo assim, o presente trabalho propõe avanços na área de fisiologia, bioquímica e morfogenética que podem ser aplicados em técnicas de conservação de sementes e a propagação *in vitro* via embriogênese somática desta espécie.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Ampliar e aprofundar a base de conhecimentos em nível fisiológico, bioquímico e morfogenético da embriogênese zigótica e somática de araucária, com ênfase na síntese de dehidrinas nas sementes desta espécie, e a relação dos hormônios AIA, ABA e PA com os padrões morfogenéticos de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Estudar a presença das proteínas *LEA*, especificamente as dehidrinas em embriões zigóticos de *A. angustifolia*;
- b) Determinar os locais de ação das dehidrinas em células de embriões zigóticos de *A. angustifolia* via imunolocalização *in situ*;
- c) Estudar se o mecanismo de modulação das dehidrinas, através da fosforilação de proteínas, ocorre em embriões zigóticos de *A. angustifolia*;
- d) Estudar os padrões de proliferação e desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. angustifolia*;
- e) Caracterizar as células, os componentes celulares e a morfologia de embriões somáticos de *A. angustifolia* em diferentes estádios do processo embriogênico;
- f) Estudar a dinâmica dos hormônios AIA e ABA na proliferação de MPE e na transição de MPE a embriões somáticos *A. angustifolia*
- g) Estudar a dinâmica das PA na proliferação de MPE e na transição de MPE a embriões somáticos de *A. angustifolia*;

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Embriogênese zigótica

1.2.1.1 Material vegetal e obtenção das frações proteicas

Sementes maduras de *A. angustifolia* foram colhidas em março de 2010 e julho de 2012 na Estação Experimental da Epagri de Lages-Santa Catarina e em maio de 2011, na Floresta Nacional de Três Barras, localizada no município de Três Barras, Santa Catarina, Brasil. Amostras representativas de todas as coletas foram utilizadas para as análises de Western blot e ensaios de imunolocalização *in situ*. Para ambas as análises os embriões zigóticos maduros foram extraídos das

sementes, divididos em eixo e cotilédones (Figura 3a-d), e processados conforme as análises.

Para o processo de extração de proteínas, três amostras de cada coleta de 100 mg de massa fresca (MF) de eixo e cotilédones de embriões zigóticos maduros, previamente congelados em N₂ e armazenados em freezer -80°C, foram liofilizados e macerados em N₂ e então homogeneizados por 90 min a 4°C em tampão de extração contendo 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ e inibidor de protease de plantas (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) de acordo com BURRIEZA *et al.* (2012). Após duas etapas de centrifugações de 25 min a 10,000 g a fração sólida foi descartada e o sobrenadante foi dividido em duas frações. A fração um foi obtida seguindo a versão modificada do procedimento descrito por CLOSE & LAMMERS (1993): os extratos foram imersos em banho-maria a 96°C durante 10 min e depois de sere resfriados até à temperatura ambiente foram centrifugados por duas vezes a 10,000 g durante 10 min a 4°C, a fração sólida foi descartada e o sobrenadante mantido em freezer a -20°C. A fracção dois não foi aquecida, para assim conservar as proteínas termosensíveis, e foi armazenada em freezer a -20°C logo após a divisão das frações um e dois. A quantificação das proteínas das duas frações foi realizada utilizando a plataforma Qubit® e um kit para quantificação de proteínas (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

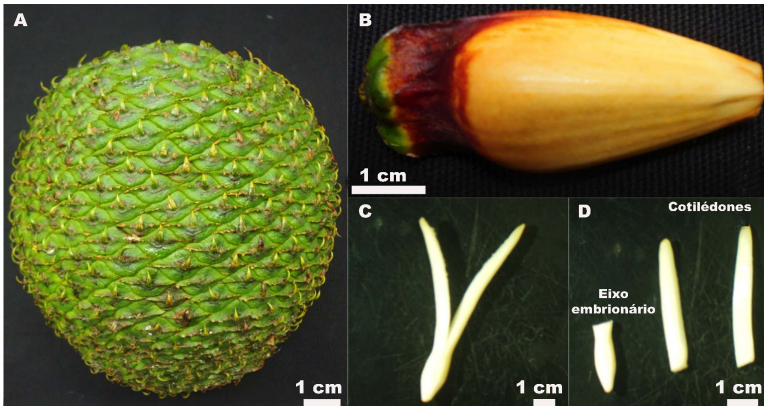


Figura 2 - Sementes maduras de *A. angustifolia* coletadas em maio de 2011, na Floresta Nacional de Três Barras. A- pinha madura; B- pinhão maduro; C- embrião zigótico maduro; e D-embrião zigótico maduro dividido em eixo e cotilédones.

1.2.1.2 Eletroforese das frações proteicas

Foi obtido o perfil proteico das duas frações de proteínas, a fração termoestável e as proteínas totais solúveis. Para cada amostra 30 µg de extrato foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 15 e 17.5 % (LAEMMLI, 1970), juntamente com padrão de peso molecular (Invitrogen) usando a cuba Miniprotean eletroforese II cell (Bio-rad® Laboratories, Hercules, CA, USA) a uma voltagem constante de 100 V por 120 min.

1.2.1.3 Ensaio de Western Blot

Os ensaios de Western Blot seguiram os procedimentos descritos por BURRIEZA *et al.* (2012) e foram realizados para as frações de proteínas termoestáveis e termosensíveis. Após o fracionamento das proteínas por eletroforese, estas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0.22 µm, Osmonics Inc., Minnetonka, MN, USA) utilizando-se o sistema de transferência Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell II (Bio-rad® Laboratories, Hercules, CA, USA) a 100 V por 60 min. A integridade das transferências foi confirmada com a utilização do corante Ponceau S. As membranas de nitrocelulose foram então submetidas à solução de bloqueio, com 5 % de leite em pó desnatado em tampão salino TBS (50mM Tris HCl, NaCl 150 mM, pH 8) por uma noite a 4°C em agitação. No dia seguinte as membranas foram incubadas por uma hora em anticorpo primário policlonal anti-dehidrina, com afinidade para o segmento K (CLOSE *et al.*, 1993), a uma diluição de 1:1000 em solução de bloqueio sob agitação constante. Após a retirada do anticorpo primário, as membranas foram submetidas a três lavagens consecutivas por 5 min em tampão TTBS (TBS com Tween 20 0.5% v/v), seguido da imersão anticorpo secundário anti-coelho imunoglobulina G conjugado com fosfatase alcalina (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), a uma diluição de 1:4000 em solução de bloqueio. Após a retirada do anticorpo secundário as membranas foram lavadas três vezes consecutivas de 5 min em tampão TBS. O complexo anticorpo-proteína foi visualizado pela imersão da membrana no sistema de revelação colorimétrico AP Color Development NBT (nitroblue tetrazolium) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) (Bio-rad® Laboratories, Hercules, CA, USA) no escuro. A especificidade da detecção foi confirmada antes do início dos ensaios pelo bloqueio do anticorpo primário durante 30 min com a sequência peptídica de reconhecimento do segmento-K (5 mg / ml), antes da incubação. Para todas as amostras os ensaios foram realizados

em triplicata. O peso molecular das bandas foram calculados pelo programa "gel perfect" descrito por BOZZO & RETAMAL (1991) e RETAMAL *ET AL.* (1999).

1.2.1.4 Ensaio de defosforilação

Para os ensaios de defosforilação, 50 µg de cada extrato de proteína foi diluído para em 40 µL em tampão MULTI-CORE™ 1x (Promega, Madison, WI, EUA) na presença ou ausência de 10 Unidades de termoestável alcalina fosfatase de camarão (Promega) durante 12 horas a 37 °C. Os ensaios de western blots foram realizados conforme descrito acima. A mobilidade relativa de cada banda foi calculada utilizando a Programa "gel perfect" acima mencionados.

1.2.1.5 Preparo das amostras para microscopia de Luz (ML) e eletrônica de transmissão (MET)

Para as análise de imunolocalização *in situ* uma amostra representativa de 10 embriões zigóticos maduros e divididos em eixo e cotilédones de cada coleta foram fixados em solução de glutaraldeído 0.5% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7.2 (0.2M) por um período de 4 horas e lavados em tampão PBS de sódio pH 7.2 (0.1 M). Posteriormente, este material foi desidratado em série etílica de 30%, 50% e 70% com duas trocas de 15 min em cada etapa. Para inclusão foi utilizada a resina London Resin White (LR White, Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA) de acordo com HARRIS *et al.* (1995). A pré-infiltração das amostras foi realizada, inicialmente, com uma mistura 1:1 de etanol e resina LR White, durante 8 horas. O material foi incluído por três trocas de resina pura de 8 horas cada. A polimerização foi realizada em estufa a 50°C por 24 horas. Seções semifinas o (1 µm) material foram obtidas utilizando o ultramicrotomo Reichert-Jung (Vienna, Austria) equipado com navalha de vidro, e seções ultrafinas foram obtidas pelo mesmo ultramicrotomo equipado com um navalha de diamante. As seções foram aderidas em lâminas de vidro cobertas com Poly-L-Lisina.

1.2.1.6 Imunolocalização *in situ* por ML

Para a imunolocalização *in situ* por ML, as seções semifinas foram hidratadas com uma gota de água Milli-Q por 3 min e lavadas por duas vezes, durante min cada, em tampão de lavagem 0.1% de gelatina em tampão PBST (10 mM PBS com 0.5% v/v de Tween 20 pH 7.2), e em seguida foram bloqueadas durante 90 min com 1% de gelatina em tampão PBST à temperatura ambiente. Ao final do bloqueio lavaram-se

as seções duas vezes por 3 min, com tampão de lavagem, e incubou-se durante uma noite a 4 °C com o anticorpo primário policlonal anti-dehidrin (CLOSE *et al.*, 1993) a uma diluição de 1:200 em tampão de lavagem. Após a incubação, as seções foram lavadas com tampão de lavagem por três vezes de 5 min cada e incubadas durante 1 h em uma gota de ouro coloidal (10 nm de diâmetro) conjugada com anticorpo de cabra para imunoglobulina de coelho (G-7402, Sigma Chemical Co.) diluído a 1:200 em tampão de lavagem a 37 °C. Após a incubação as seções foram novamente lavadas três vezes de 5 min cada com tampão de lavagem. Após 45 min de fixação com glutaraldeído a 2.5% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, as seções foram lavadas com água Milli-Q. Uma vez que as partículas de ouro individuais não são visíveis na ML, um kit de reforço de prata (Silver Enhancer, Sigma SE-100) foi utilizado para desenvolver uma coloração marrom a preto nas áreas imunorreativas. A reação de deposição de prata foi fixada com solução aquosa de tiosulfato de sódio a 2.5%, seguido de enxague em água Milli-Q. Finalmente, as seções foram contrastadas com 1% (w / v) de fast Green (F7258, Sigma Chemical Co) e visualizada com um Olympus FluoView FV 300 microscópio confocal com software FluoView 3.3 (Olympus, Tóquio, Japão). Seções de controle foram tratadas: (1) excluindo-se o anticorpo primário anti-dehidrina ou (2) bloqueando-se o anticorpo primário com a sequência peptídica de reconhecimento do segmento-K, antes da incubação.

1.2.1.7 Imunolocalização in situ por MET

Seções ultrafinas foram montadas em telas de níquel "*grids*" (Polyscience Inc., Warrington, PA, EUA) para imunomarcção por MET. *Grids* contendo seções dos embriões zigóticos foram imunomarcadas de acordo com CARJUZAÁ *et al.* (2008). Ao final, os *grids* foram contrastados com acetato de uranila seguido por citrato de chumbo e analisados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 turbo (Zeiss, Wiesbaden, Alemanha, a 90 kV). Seções de controle foram tratadas: (1) excluindo-se o anticorpo primário anti-dehidrina ou (2) bloqueando-se o anticorpo primário com a sequência peptídica de reconhecimento do segmento-K, antes da incubação.

1.2.2 Embriogênese somática

1.2.2.1 Material Vegetal

Megaestróbilos de *A. angustifolia* 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. Sementes de araucária, os pinhões, foram isolados e individualizados e embriões zigóticos imaturos foram excisados e utilizados para a indução de culturas embrionárias

1.2.2.2 Indução e manutenção da cultura embrionária

Foi utilizada a cultura embrionária 91002 de *A. angustifolia*, induzida e estabilizada no período 2009/2010, em meio de cultura ½LP (VON ARNOLD E CLAPHAM, 2008) isento de fitoreguladores, acrescido de sacarose (30 g.L⁻¹), L-glutamina (1 g.L⁻¹), mio-inositol (1 g.L⁻¹) e a caseína hidrolisada (0.5 g.L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0.5N) e HCl (0.5N) antes da adição do phytigel® (2.0 g.L⁻¹) (Figura 4A). Os compostos orgânicos foram filtroesterelizadas e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem do meio a 121°C por 15 min. A cultura embrionária foi posteriormente proliferada a cada 21 dias durante quatro meses para meio BM (GUPTA & PULLMAN, 1991), alternando entre meio sólido ou líquido (Figura 4a2), suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹), L-glutamina (1 g.L⁻¹), mio-inositol (1 g.L⁻¹) e a caseína hidrolisada (0.5 g.L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0.5N) e HCl (0.5N) antes da adição do phytigel® (2.0 g.L⁻¹), e os compostos orgânicos foram filtroesterelizadas 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 MF da cultura embrionária em 100mL 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.

1.2.2.3 Pré-tratamento das MPE

Os tratamentos descritos a partir deste ítem, que se referem a uma rota de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia* (Figura 4), foram repetidos por oito vezes, durante dois anos de trabalho, onde as MPE mostraram o mesmo padrão de desenvolvimento. As amostras para as análises descritas nos próximos ítems foram aleatoriamente coletadas as repetições do experimento.

Entre a pró-embriogênese e a embriogênese inicial, a cultura embrionária foi pré-tratada com 30 μM de fluridone (FLD) em meio DKM (VON ARNOLD & CLAPHAM, 2008) por quatro semanas (Figura 4A,B). Para isso MPE foram inoculadas em placas de Petri (90x 10 mm) contendo 15 ml do meio de cultura DKM, suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}), mio-inositol (0.1 g.L^{-1}), caseína hidrolisada (0.5 g.L^{-1}) 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^{-1}). Os compostos orgânicos foram filtroesterilizadas 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, sem necessidade de ser filtroesterilizado, uma vez que o mesmo 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 \pm 2°C e no escuro.

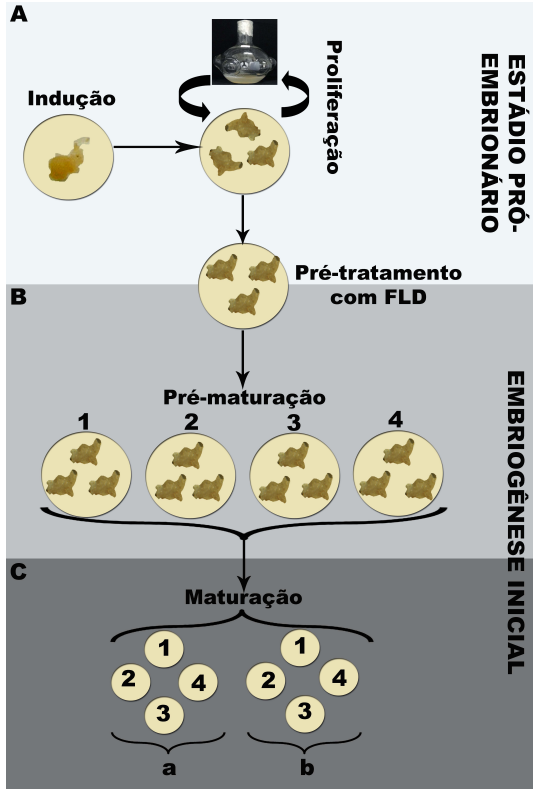


Figura 3- Representação esquemática da rota de desenvolvimento de embriões somáticos *A. angustifolia*. A- *Indução* da cultura embrionária 91002, no estágio pró-embriônico, em meio $\frac{1}{2}$ LP livre de fitoreguladores; *Proliferação* da cultura embrionária, no estágio pró-embriônico, em meio BM geleificado ou líquido, livre de fitoreguladores por um período de quatro meses, e *Pré-tratamento* em meio DKM acrescido de $30 \mu\text{M}$ fluridone (*FLD*) por quatro semanas, 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), marcando o início da embriogênese inicial. 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% de carvão ativado (b).

1.2.2.4 Pré- maturação das MPE

MPE originadas do pré-tratamento anterior foram repicadas para placas de Petri (60 x10 mm) contendo 15 ml do meio de pré-maturação (Figura 4 B), constituído de meio basal DKM, suplementado com mio-inositol (0.1 g.L^{-1}), caseína hidrolisada (0.5 g.L^{-1}) e com fonte de carbono conforme os tratamentos listados abaixo. 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^{-1}). Os compostos orgânicos foram filtroesterelizadas e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem do meio a 121°C por 15 min. Os diferentes tratamentos foram os seguintes (Figura 4B):

1. meio DKM suplementado com 9 % de maltose;
2. meio DKM suplementado com 9% de maltose e 7% de polietilenoglicol 3350 (PEG);
3. meio DKM suplementado com 9% de lactose e
4. meio DKM suplementado com 9% de lactose e 7% de PEG.

As MPE foram mantidas neste meio por quatro semana, sendo 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 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.

1.2.2.5 Maturação de embriões somáticos

O meio de maturação (Figura 4C) foi baseado na formulação salina do mesmo meio DKM, descrito acima acrescido de 9% de maltose e 7% de PEG. Os compostos orgânicos e o ABA foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem do meio a 121°C por 15 min. Os tratamentos utilizados foram (Figura 4C):

- a. meio DKM suplementado com $30 \mu\text{M}$ ABA, e
- b. meio DKM suplementado com $60 \mu\text{M}$ de ABA e 1.5 g.L^{-1} de carvão ativado.

As MPE foram mantidas neste meio por um período de quatro semanas e repicadas para meio fresco a cada duas semanas. As culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD ajustada para uma temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e no escuro.

1.2.2.6 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 captura Olympus DP-40.

1.2.2.7 Análise em microscopia de luz (ML) e testes histoquímicos

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 μm 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) Azul de Toluidina (AT-O) para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia (SCHMIDT *et al.*, 2009) e Azul brilhante de Coomassie (CBB) para identificar a presença de proteínas totais (SCHMIDT *et al.*, 2009).

1.2.2.8 Análise em microscópio confocal (MC)

Amostras das MPE de diferentes tratamentos foram fixadas em solução de paraformaldeído 2.5 % em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, *overnight* (SCHMIDT *et al.*, 2009) e mantidas no escuro a 4°C. As amostras dos diferentes tratamentos foram analisadas em microscópio confocal Leica TCS SP-5 (Wetzlar, Alemanha), utilizando laser de ultravioleta com excitação no comprimento de 350 nm (azul) e em um espectro de emissão de 510 a 566 nm. Para análise dos núcleos, as secções foram incubadas com DAPI 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 30 min para análise dos núcleos (OURIQUES & BOUZON, 2008). Para análise foi utilizada objetiva de óleo de imersão 63x/1.4-0.6 (HCX PLAPO lambda) e o processamento final das imagens

foi realizado no programa LAS-AF Lite (Leica).

1.2.2.9 Análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET)

Para observação em microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras provenientes dos diferentes tratamentos foram fixadas em solução de glutaraldeído 2.5 %, sacarose 2.0%, tamponadas com cacodilato 0.1 M (pH 7.2), pós-fixadas em 1 % tetróxido de ósmio por 4 horas, desidratadas em série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (Schmidt et al., 2010). Após a desidratação, o material foi infiltrado com resina Spurr (Spurr, 1969). As secções ultrafinas foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão, modelo Jeol (JEM)1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 80 kV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica-(LCME) da UFSC. Foram analisadas 10 telinhas “grids” para cada tratamento.

1.2.2.10 Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As amostras de MPE para análise ao MEV dos diferentes tratamentos foram fixadas e processadas com a mesma metodologia utilizada para MET descrita acima até a etapa de desidratação. As amostras foram desidratadas em séries etanólicas e secas em ponto crítico EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). Subseqüentemente as amostras foram aderidas a suportes metálicos e metalizadas (Metalizador Blatec, CED 030) com ouro. Posteriormente, os espécimes foram visualizados e fotografados em MEV Jeol 6390 LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 20 kV) no LCME-UFSC.

1.2.2.11 Determinação de AIA e ABA

Conteúdos livres de IAA e ABA dos diferentes tratamentos foram extraídos e determinados de acordo com os procedimentos descritos por STEINER (2005). Cada amostra 1 mg de MF foi macerada em 5 mL de tampão de extração (etanol 80% e polivinilpirrolidona-40 1%), sendo o extrato transferido para um tubo tipo “Falcon” (15 mL). Adicionou-se 100 µL de [³H] AIA radioativo e 100 µL de [³H] ABA como padrão interno, para a determinação das perdas do processo. O extrato foi agitado por 1:30 h, no escuro a 4°C e em seguida centrifugação a 15,500 g por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi concentrado em centrifuga sob vácuo a 45 °C (± 3:00 h), até atingir 20% do volume inicial (≤ 1.0 mL). O volume da amostra foi ajustado para 3 mL (p/v) com água, e o pH para 2.5 com a adição de HCl (1N).

As amostras foram particionadas duas vezes, usando-se éter etílico como solvente orgânico. A fase orgânica (éter), contendo o AIA e o ABA foi coletada e seca em centrifuga sob vácuo a 45 °C. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 150 µL de metanol 100% e transferidas para tubos do tipo “ependorf” e armazenadas a -20°C para análises posteriores em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A quantificação do AIA e ABA foi realizada por CLAE em fase reversa, com coluna C18 (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). As determinações foram realizadas em duplicata.

1.2.2.12 Determinação de Poliaminas (PA)

Para a determinação de PA amostras contendo 200 mg de massa fresca de culturas embrionárias de cada tratamento foram maceradas em solução de 1.6 mL de ácido perclórico 5%. PA livres foram extraídas, dansiladas e identificadas por CLAE em fase reversa, de acordo com os procedimentos descritos por SILVEIRA *et al.* (2004a). O conteúdo de PA foi determinado usando detector de fluorescência a 340 nm para excitação e 510 nm para emissão. Áreas de pico e tempos de retenção foram mensuradas pela comparação com o padrão de PA: Put, Spd e Spm. As determinações foram realizadas em triplicata.

1.2.2.13 Análise estatística

Para análise dos dados primeiramente estes foram submetidos ao teste de análise de variância (teste F), e quando significativo seguiu para o teste SNK (STUDENT-NEWMAN-KEULS) a 5% de probabilidade, para a comparação das médias. As análises foram realizadas por meio do programa SISVAR (Software livre UFLA) e os gráficos foram confeccionados pelo programa Microsoft Excel.

Os resultados desta tese estão dipostos na forma de três capítulos que serão apresentados a seguir, na forma de manuscritos científicos, publicado ou em preparo para posterior publicação. Como a metodologia utilizada pra a realização dos trabalhos já foi apresentada no item “Material e Métodos” os capítulos serão compostos apenas de resumo, introdução, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos e referências bibliográficas.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BURRIEZA, H. P.; KOYRO, H. W.; MARTÍNEZ, T. L.; KOBAYASHI, K.; MALDONADO, S. High salinity induces dehydrin accumulation in *Chenopodium quinoa* cv. Hualhuas embryos. *Plant Soil*, v. 354, p. 69–79, 2012. doi:10.1007/s11104-011-1045-y
- CARJUZAÁ, P.; CASTELLIÓN, M.; DISTÉFANO, A.; DEL VAS, M.; MALDONADO, S. Detection and subcellular localization of dehydrin-like proteins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) embryos. *Protoplasma*, v. 233, p. 149–156, 2008.
- FILONOVA LH, BOZHKOV PV, VON ARNOLD S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany*, v.51, p.249-264, 2000a.
- GUERRA, M. P. & KEMPER, E. Tecnologias futuras: aplicações da embriogênese somática para a propagação massal de plantas elite de *Araucária angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: *Congresso Nacional Sobre Essências Nativas*, 2., 1992, São Paulo. *Anais...*São Paulo: Instituto Florestal, 1992, p. 1233-1236.
- GUERRA, M. P.; REIS, M. S.; SCHEINEDE, L.; SILVEIRA, V. Inventário dos Recursos Florestais da Mata Atlântica- *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 1999. 135 p.
- GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; SCHNAIDER, L.; REIS, M. S.; NODARI, R.O. In SIMÕES, L. L. & LINO, C. F. (eds) 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. *Bio/Technology*, v. 5, p.710-712, 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.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

OURIQUES, L. C.; BOUZON, Z. L.; Organização estrutural e ultra-estrutural das células vegetativas e da estrutura plurilocular de *Hincksia mitchelliae* (Harvey) P C Silva (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Rodriguesia*, v.59, p.435–447, 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, 2011, 934p.

SCHMIDT, E.C.; dos SANTOS, R.; HORTA, P. A. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron*, v. 41, p. 919–930, 2010

SHIMIZU, J. Y.; OLIVEIRA Y. M. M. Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da araucaria no sul do Brasil. 1981, Curitiba: EMBRAPA-URPFCS. Curitiba-PR. 9p.

SPENCE, J. Plant histology. In: HAWES C., SATHIAT- JEUNEMAITRE B. (Eds) *Plant cell biology*, v. 2, Oxford: Oxford University Press, 2001, p. 189–206.

SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res*, v. 26, p. 31–43, 1969.

STEFENON, V. & CAPRESTRANO, C. Monoicy in *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae): I. Morphological aspects of the reproductive structures. *An Acad Bras de Cienc*, 81:701-705, 2009.

STEINER, N. *Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante e embriogênese zigótica e somática de Araucaria angustifolia Bert O.*

Kuntze. 2005. Dissertação (Mestrado. em Recursos Genéticos Vegetais)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2005.

STEINER, N. *Embriogênese somática em Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze, Pinus sylvestris (Linneaus) e Picea abies (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK.* 2009. 155 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2009.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; Lima, J. C. A. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal.* Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE, 1991. 124p.

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, 2006.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZKOV, P.; DYACHOK, J.; FILANOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult*, v. 69, p. 233-249, 2002.

VON ARNOLD, S. & CLAPHAM, D. Spruce embryogenesis. *Methods Mol Biol*, v. 427, p. 31–47, 2008.

ZECHINI, A. A. *Morfometria, produção, fenologia e diversidade genética: subsídios para a conservação da Araucaria angustifolia (Bert.). Ktze e coleta sustentável do pinhão no planalto catarinense.* 2012. 160 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

CAPÍTULO 1

Manuscrito publicado no periódico Protoplasma

Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos

Farias-Soares, FL; Burrieza, HP; Steiner, N; Maldonado, S; Guerra, MP.
201. Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos.
Protoplasma, 250:911-918.

Abstract

The aim of this study was to describe the dehydrin content of mature *Araucaria angustifolia* embryos, a species of endangered and economically important conifers, native to southern Brazil, northeastern Argentina, and eastern Paraguay. The *A. angustifolia* seeds have been categorized as recalcitrant. Dehydrins were studied by western blot analysis and in situ immunolocalization microscopy using antibodies raised against the K segment, a highly conserved lysine-rich 15-amino acid sequence extensively used to recognize proteins immunologically related to the dehydrin family. Western blot analysis of the heat-stable protein fraction, as estimated by 15 % SDS-PAGE, revealed three main bands of approximately 20-, 26-, and 29-kDa; when 17.5 % SDS-PAGE was used, each band resolved into two other bands. Two thermosensitive dehydrin bands of around 16 and 35 kDa were common to the axis and cotyledons, and another thermosensitive band, with molecular mass of approximately 10 kDa, was present in the cotyledons only. Following alkaline phosphatase (AP) treatment, a gel mobility shift was detected for each one of the four main bands that can be due to phosphorylation. Dehydrins were detected in all axis and cotyledon tissues using in situ immunolocalization microscopy. At the subcellular level, dehydrins were immunolocalized in the nuclei, protein bodies, and microbodies. In the nucleus, dehydrins were found to be associated with chromatin. We concluded that the gel mobility shift for the four main bands (probably due to phosphorylation), the presence of thermosensitive bands, and the specific localizations in nuclei and protein bodies provide key starting points to understand the function of dehydrins in the embryo cells of this species.

Keywords: *Araucaria angustifolia* seed, dehydrin western blot analysis, dehydrin *in situ* immunolocalization, phosphorylated dehydrins, dehydrin subcellular localization, thermosensitive dehydrins

CAPÍTULO 2

Este manuscrito segue a formatação do periódico Plant Cell Tissue and Organ Culture

Transition of proembryogenic masses to somatic embryos in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze is related to the endogenous contents of IAA, ABA and PA

Francine L. Farias-Soares, Neusa Steiner, Éder C. Schmidt, Maria L. T. Pereira, Gladys D. Rogge-Renner, Zenilda L. Bouzon, Eny S. I. Floh, Miguel Pedro Guerra

Abstract

The aim of the present work was to determine the endogenous contents of indole-3-acetic acid (IAA), abscisic acid (ABA) and polyamines (PA) in the transition from proembryogenic masses (PEM) to early somatic embryos of an embryogenic culture of *A. angustifolia*. The embryogenic culture was pretreated with fluridone (FLD) (30 μ M) for four weeks in the proembryogenic stage, followed by prematuration with the following combinations of carbon sources and polyethylene glycol 3350 (PEG): 9% of maltose; 9% of maltose and 7% of PEG; 9% of lactose and 9% of lactose and 7% of PEG in early embryogenesis. The contents of IAA and ABA decreased after FLD pretreatment, while the contents of PA increased at the proembryogenic stage. The putrescine (Put) was the most abundant PA present in the embryogenic stage, followed by spermidine (Spd) and spermine (Spm). At this stage occurred the proliferation of the embryogenic culture, and after FLD pretreatment was observed the transdifferentiation of PEM I and II to PEM III. In early embryogenesis the contents of IAA, ABA and PA varied according to prematuration treatment, as indicated above. The IAA and ABA contents increased at this stage, and the treatments supplemented with maltose presented the highest contents of ABA. A decrease of the total free PA levels was observed, and treatment with maltose plus PEG resulted in the highest level of PA. Of the most common PA, Put was again the most abundant, followed by Spd and Spm, mainly in the treatment supplemented with PEG. The increase of Spd and Spm in the treatments maltose or lactose plus PEG, resulting in decrease of the PA ratio (Put/Spd+Spm). The treatments supplemented with maltose or lactose plus PEG enhanced the PEM-to-early somatic embryos transition. These results suggest that the endogenous contents of IAA, ABA and PA together play an important role in the development of *A. angustifolia* somatic embryos.

Keywords: *Araucaria angustifolia*; somatic embryos; polarization; endogenous IAA, ABA and PA

CAPÍTULO 3

Este manuscrito segue a formatação do periódico Protoplasma

Morphological and component characterization of somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze

Francine L. Farias-Soares, Neusa Steiner, Éder C. Schmidt, Maria L. T. Pereira, Bruna Scheid, Gladys D. Rogge-Renner, Zenilda L. Bouzon, Miguel Pedro Guerra

Abstract

Somatic embryogenesis has been widely used in conifers, both for plant regeneration as model system for embryonal development studies. In *Araucaria angustifolia* this developmental route has been studied for over many years, however, a detailed description of the events that occurs during this developmental process was not performed. In the present work the morphological and cellular studies allowed to describe some of these events. The developmental fates of somatic embryos (SE) was followed from proembryogenic masses (PEM) to early embryogenesis. Two types of cells: the embryogenic (EC) and suspensor-like (SC) were present in both PEM and SE. The EC, densely cytoplasmic, had a large and active nuclei, while SC were highly vacuolated. The proembryogenic stage comprised the step of induction, proliferation and pretreatment with fluridone (FLD) of embryogenic culture. The main feature of the proembryogenic stage was associated with the multiplication of PEM, which evolved through three stages: PEM I, II and III. The early embryogenesis stages was observed after four weeks in prematuration treatment (9% of maltose or lactose 9%, associated or not with PEG 7%), and this step was marked by PEM-to-SE transition. It was observed SE emerging from PEM III, and the organization of the EC and SC in two different poles, giving rise to two well-defined regions: the embryonal mass (EM) composed by EC and suspensor region compose of SC. In the prematuration treatments supplemented with 7% of PEG this process was accelerated and early SE were observed. The cells of first layers of the suspensor region showed similar features of embryonal tube cells (TC), since they were transitional among EC and SC. In EC the storage products deposition showed a few small starch grains and an increased number and size of starch grains from TC to SC. After four weeks in the maturation medium containing 30 μ M or 60 μ M of abscisic acid (ABA), early SE showed more dense EM and more elongated suspensors. The TEM analysis of the cells of the early SE showed that EC presented a large and central nucleus, with one or two nucleoli, many cytoplasmic organelles such as mitochondria, plastids with or without starch grains, rough endoplasmic reticulum (RER), ribosomes and small provacuoles. In the suspensor region the TC presented an increase of number of provacuoles and plastids around the nuclei and in some cases, the round nuclei became lobed showing degraded the nuclear envelope, indicating the beginning the cellular dismantling. Starting these cells until SC completely developed different degrees of the cellular dismantling were observed, especially marked by an increased vacuolation through many

provacuoles, derived from vesicles of Golgi bodies, and plastolysome-like structures, resulting in a single autolytic vacuole. It's possible that degree of cellular dismantling of the SC in suspensor regions is an important factor in the determination of the embryo developmental pattern of *A. angustifolia*

Key words: *Araucaria angustifolia*, early somatic embryogenesis, polarization

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho analisou parâmetros celulares e bioquímicos envolvidos nos processos de embriogênese zigótica e somática de *A. angustifolia*.

Dehidrinas são proteínas da família das proteínas LEA, que protegem as células da morte frente a situações de drásticas perdas de água, como ocorre durante a dessecação da semente, estresse hídrico ou devido a alta salinidade do solo. Estas proteínas por terem uma natureza hidrofílica, se ligam a moléculas de água, assegurando que essas moléculas permaneçam dentro das células, mantendo a estabilização de outras proteínas e componentes celulares, evitando assim a morte celular. Devido a esta natureza, essas proteínas eram tidas como proteínas de sementes ortodoxas e ausentes em sementes recalcitrantes. No entanto, como descritos anteriormente, muitos autores já provaram que estas proteínas também fazem parte da fisiologia de muitas sementes recalcitrantes. Neste trabalho foram detectadas desidrinas em eixos embrionários e cotilédones de embriões zigóticos de *A. angustifolia* por ensaios de western blot e imunolocalização *in situ*. Os ensaios de western blot mostraram que eixos embrionários e cotilédones apresentam as mesmas bandas de desidrinas (29, 26, 20 e 16 kDa) na fração proteica total ou termoestável. Na fração de proteínas totais foram detectadas ainda outras duas bandas uma de 35 kDa comum aos eixos embrionários e cotilédones e outra de 10 kDa presente somente nos cotilédones. Após o ensaio de defosforilação foi verificado redução no tamanho das quatro principais bandas de desidrinas detectadas, indicando que um possível mecanismo de modulação de desidrinas através da fosforilação de proteínas pode ocorrer em embriões zigóticos desta espécie. Além disso as imunolocalizações *in situ* por ML e MET mostram que desidrinas estão presentes em todos os tecidos dos eixo embrionário e cotilédones, e a nível subcelular estas proteínas se encontraram associadas aos corpos proteicos, microcorpos e a cromatina no núcleo. Estes dados fornecem embasamento para a compreensão da fisiologia das sementes da *A. angustifolia*, mostrando que seus embriões zigóticos possuem proteínas ligadas a tolerância a dessecação, e que possivelmente estas proteínas participam da proteção das suas células, conferindo à esta espécie um certo grau de tolerância a perda de água.

O desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia* foi acompanhado por análises de ML, MC, MEV e MET. Os resultados mostram que o padrão de proliferação de culturas embrionárias desta espécie durante a pró-embriogênese segue similar ao descrito para *P.*

abies (Filonova *et al.*, (2000a). As análises citoquímicas e histoquímicas mostraram que, MPE são compostas dos dois tipos celulares comuns em culturas embrionárias de coníferas: células embriogênicas (CE) e células de suspensor (CS), e seus diferentes estádios de crescimento (I, II e III) estão relacionados ao número destas células nestes agregados celulares, o que já havia sido descrito por Steiner (2009). As CE são pequenas e altamente citoplasmáticas, possuem um núcleo grande que pode conter um ou dois nucléolos. CS apresentam diferentes graus de vacuolização, o que as torna mais ou menos alongadas. Foi possível verificar que, dependendo do grau de vacuolização CS podem ainda, possuir conteúdos citoplasmáticos e algumas até mesmo núcleo, e a medida que se tornam mais alongadas se observa diminuição nestes conteúdos e desaparecimento do núcleo, e ao final resta somente um célula com um grande vacúolo.

Neste trabalho foi convencionado chamar o início do surgimento dos ES, a partir das MPE durante a pré-maturação, como a embriogênese inicial. No entanto, um tratamento de transição foi utilizado para desencadear a transição entre MPE para ES. O tratamento proposto neste trabalho é a adição de um pré-tratamento da cultura embrionária com um inibidor do ABA, o FLD. O objetivo foi justamente diminuir os conteúdos endógenos de ABA da cultura embrionária. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que essa diminuição foi fundamental para a transição de MPE à ES iniciais, e as análises endógenas de ABA quando relacionadas com análises microscópicas confirmam isso. Durante o pré-tratamento com FLD a cultura embrionária continuou somente proliferando MPE, no entanto foi verificado, nas análises de ML, diferenças entre as MPE III do tratamento controle com as do pré-tratado, principalmente pelo aumento do número das CS e alongamento dessas nas MPE III pré-tratadas com FLD. Devido a isso, o pré-tratamento com FLD foi colocado com uma etapa de transição entre a pró-embriogênese e a embriogênese inicial.

Tratamentos de pré-maturação, combinando duas fontes de carbono, maltose e lactose, com um agente osmótico, o PEG foram utilizados pra promover a formação dos ES iniciais. Nossos dados mostraram que embriões somáticos surgiram a partir de MPE III, e uma única MPE III pode dar a origem a mais de um ES. Foi observado que, ocorre uma alteração organizacional entre as CE e as CS, onde cada tipo celular ocupa um pólo do ES, caracterizando assim um ES inicial individualizado e polarizado. A região composta pelas CE foi chamada de massa embrionária (ME) e a região composta pelas células de suspensor de região do suspensor. No entanto, foi observado que,

células localizadas logo abaixo da ME, no início da região do suspensor, apresentavam muitas características da CE, como um grande e ativo núcleo e elevado conteúdo citoplasmático, e também características presentes nas CS, como aumento do número de vacúolos e grãos de amido, caracterizando assim, uma célula híbrida ou transicional, a qual foi convencionalmente chamada embrionária do tubo (CT). Dessa maneira os ES iniciais foram compostos de três tipos celulares, as CE, as CS e as CT.

As análises dos conteúdos endógenos de AIA, ABA e PA, mostraram que a cultura embrionária continha uma grande quantidade de ABA e uma baixa quantidade de AIA. Após o pré-tratamento com FLD o conteúdo de ABA foi reduzido consideravelmente, assim como o conteúdo de AIA. Em relação a PA foi observado aumento no conteúdo total de PA livres, principalmente da Put, e aumento na taxa de PA (Put/Spd+Spm) após o pré-tratamento com FLD.

Durante a embriogênese inicial novamente os conteúdos de ABA voltaram a subir, e em tratamentos suplementados com maltose, por exemplo, esse aumento superou a quantidade de ABA apresentada na cultura embrionária em proliferação. Os conteúdos de AIA também aumentaram, de acordo com o aumento do ABA. No entanto não foi encontrada uma relação direta entre os conteúdos de AIA e ABA com a eficiência dos tratamentos na transição de MPE para ES. O tratamento maltose combinado com PEG foi o tratamento mais eficiente para promover esta transição, seguido dos tratamentos lactose combinado com PEG, maltose e por último a lactose. Quanto aos conteúdos de PA, uma redução do conteúdo total de PA livres em relação a cultura embrionária pré-tratada com FLD foi observada. A Put continuou sendo a PA mais abundante, mas os conteúdos de Spd e Spm sofreram um aumento para valores próximos da Put, com exceção do tratamento suplementado somente com lactose. Relacionando os conteúdos de PA com as análises morfológicas, pode-se observar que os tratamentos mais eficientes na transição de MPE para ES, maltose e lactose combinadas com PEG, foram os que apresentaram menor taxa de PA, ou seja, quanto mais próximos os conteúdos de Spd e Spm estiverem dos conteúdos de Put, mais eficiente foi o tratamento na transição de MPE para ES.

Após a cultura embrionária ser cultivada por quatro semanas nos tratamentos de pré-maturação, ela foi submetida a dois diferentes tratamentos de maturação com adição de ABA. Após quatro semanas de cultivo em ABA, independente da concentração deste fitorregulador e do tratamento prévio de pré-maturação, as análises de ML e MEV mostraram uma completa individualização dos ES iniciais, alongamento

da região do suspensor e a alteração na ME, que se tornou opaca e densa. Além disso, em alguns embriões se observou que células da camada externa da ME começaram a apresentar vacuolização e alongamento, levando a perda polarização do ES.

Análises subcelulares por MET mostraram que CE apresentam núcleos com presença de um ou dois nucléolos, eucromatina e heterocromatia e envelope nuclear intactos, além de muitas organelas como, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, ribossomos, plastídeos contendo ou não grãos de amido, corpos lipídicos, pré-vacúolos e complexo de Golgi. As CT apresentaram diferenças das células da ME, uma vez que, a partir das CT verifica-se um grau constante de dismantelamento celular até as CS completamente desenvolvidas, que estão localizadas no final da região do suspensor.

O primeiro indício no citoplasma deste processo de destruição celular foi um grande aumento no número de pré-vacúolos e plastídeos, ao redor do núcleo. Os plastídeos deram origem a amiloplastos, ou então as estruturas semelhantes aos lisossomos nas células animais, denominados "plastolisossomos", os quais, como já descrito anteriormente, foram observados em células vegetais em processo de dismantelamento celular durante a MCP. Estas estruturas são precursoras de vacúolos autolíticos e englobam parte do citoplasma, o qual será degradado dando origem assim a novos pré-vacúolos. Pré-vacúolos também foram formados a partir de grandes vesículas provenientes do aparelho de Golgi. A função dos pré-vacúolos, independente da sua origem, parece estar associada a degradação do citoplasma e suas organelas. Em diferentes graus de dismantelamento celular foi observada uma cinética de vacuolização, ou seja, quanto mais avançado este processo, maior o tamanho do vacúolo autolítico e o número de pré-vacúolos nas células. Observou-se também que a formação do vacúolo autolítico ocorre através imersão dos pré-vacúolos neste vacúolo. A quantidade de aparelhos de Golgi também aumentou consideravelmente em células em estádios avançados de dismantelamento celular, o que possivelmente está associado com a necessidade de aumento do número de pré-vacúolos, para a degradação do citoplasma. Em células em estádios avançados de degradação celular foi observado tanto a presença de amiloplastos intactos como amiloplastos se tornando etioplastos, os quais apresentaram corpo prolamelar e em alguns casos, membranas de tilacóides. Mitocôndrias e parede celular permanecem intactas até os últimos estádios de dismantelamento celular. Foi observado que o último estágio desta degradação celular é caracterizado pela ruptura do tonoplasto do

vacúolo autolítico e completa lise celular, resultando em uma célula vazia composta somente de parede celular e o conteúdo do vacúolo.

Alterações nos núcleo também foram observadas durante o processo de dismantelamento celular. E, alguns casos os núcleo permanecem intactos até estádios avançados da degradação celular, e em outros, no início do processo se observou alteração no formato do núcleo, onde núcleos redondos e intactos começaram a se tornar lobulados, e esta característica se tornou mais proeminente conforme o grau de dismantelamento celular aumentou. Outras alterações nucleares observadas foi aumento do conteúdo de heterocromatina e degradação do envelope nuclear, com o vazamento do conteúdo nuclear para o citoplasma.

Estes resultados mostram que o processo de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia* é dependente de vários fatores, dentre eles, a relação endógena dos hormônios vegetais, como AIA, ABA e PA, e o processo de determinação celular, caracterizado aqui por células que parecem ter sido pré-determinadas a morrer de forma gradativa, como as CT e CS, entrando num processo de MCP. A embriogênese inicial não progrediu para os estádios de maturação dos embriões somáticos, e apesar de grandes avanços no protocolo de embriogênese somática da espécie terem sido propostos, alguns pontos ainda precisam ser elucidados.

Steiner (2009) propôs melhorias no processo de embriogênese somática da espécie, indicando o estudo de fatores relacionados aos hormônios vegetais e a MCP. Seguindo esta linha de raciocínio, pode-se concluir que de fato estes fatores contribuem de forma importante para o desenvolvimento embrionário desta espécie. A transição de MPE para embriões somáticos foi alcançada efetivamente pela primeira vez para esta espécie, através da manipulação dos conteúdos endógenos de ABA, que consequentemente alterou também os conteúdos de AIA e PA. O acompanhamento do desenvolvimento dos ES permitiu observar características, a nível subcelular, como por exemplo, a cinética vacuolização e alterações nucleares, característicos respectivamente da autofagia e apoptose, ambos os processos de MCP bem descritos na literatura. No entanto, nossos resultados mostram que após a exposição ao ABA embriões somáticos de *A. angustifolia* mantém um por um longo período a região do suspensor, e isso pode, de alguma forma interferir no completo desenvolvimento da ME, que futuramente daria origem aos meristemas apicais aéreos e radiculares do embrião somático. Sendo assim, estudos futuros focando especificamente na relação endógena de AIA, ABA e PA, MCP e a padronização dos

embriões, podem contribuir para elucidar pontos ainda indefinidos da embriogênese final e maturação dos embriões somáticos de *A. angustifolia*.