



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

Regulação da Embriogênese Somática de *Araucaria angustifolia* (Bert) O.
Kuntze pelo Mecanismo Redox

Leila do Nascimento Vieira

Florianópolis – SC
Junho – 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

Regulação da Embriogênese Somática de *Araucaria angustifolia* (Bert) O.
Kuntze pelo Mecanismo Redox

Relatório de Estágio de Conclusão de
Curso apresentado como parte dos
requisitos para obtenção de graduação em
Agronomia pela Universidade Federal de
Santa Catarina

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Florianópolis – SC
Junho – 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

Regulação da Embriogênese Somática de *Araucaria angustifolia* (Bert) O.
Kuntze pelo Mecanismo Redox

Leila do Nascimento Vieira

Trabalho submetido à banca examinadora como parte dos requisitos para
conclusão do curso de Agronomia

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Miguel Pedro Guerra (Dr.)
(Orientador)

Douglas André Steinmacher (Dr.)

Prof. Rosete Pescador (Dr.)

Florianópolis – SC
Junho - 2011

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Eloisa do Nascimento Vieira e Rogério Alano Vieira, e ao Felipe e Eloysa por todo o amor, carinho e apoio durante todo o decorrer do curso de graduação.

Ao meu orientador, Professor Miguel Pedro Guerra, por toda a confiança, por todos os ensinamentos e pela oportunidade de estagiar no LFDGV durante boa parte da minha graduação e em especial durante o Estágio de Conclusão de Curso.

Aos Professores Claudete Santa Catarina e Vanildo Silveira pela oportunidade da realização de boa parte das análises desse trabalho no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, pela excelente recepção em Campos, por todas as conversas e contribuições dadas ao trabalho e à minha formação pessoal e profissional.

À Professora Eny Iochevet Segal Floh pela contribuição dada a esse trabalho.

Ao Paulo Sérgio Schlogl e André Luis Wendt dos Santos pela infinita paciência em responder os também infinitos questionamentos da sua ex-estagiária de iniciação científica (EU) e pela confiança e colaboração na idealização desse projeto.

Aos eternos amigos, Douglas, Julia, Clarissa, Hugo, Aline, André, Ângelo, Lili, Sarah, Carol e Flor por todas as jantas, cafés e principalmente os happy hours. Ah, e por toda a colaboração técnico-científica também!

À Sara Ferrigo por todo o companheirismo durante toda a graduação, os trabalhos, as festas, as conversas, congressos, saídas de campo... por toda a amizade e carinho que são para a vida toda!!

Ao Hugo Fraga pelo indispensável e essencial apoio durante toda realização desse trabalho.

À todo o pessoal do CBB da UENF pela excelente recepção.

À Gabrielle, Júlia, Laura, Bruno, Adeli, Lucas, Ricardo, Tatiana e Aline por tornarem os dias em Campos agradáveis e divertidos!!!

À todo o pessoal do laboratório por tornar o dia-a-dia muito mais prazeroso...

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1.1. <i>Araucaria angustifolia</i>	6
1.2. Embriogênese somática	7
1.3. Glutathione como moduladora da embriogênese somática	8
2. INTRODUÇÃO	11
3. OBJETIVO GERAL	13
3.1. Objetivos Específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Indução e manutenção das culturas embriogênicas	14
4.2. Pré-maturação das CE em suspensão celular	15
4.2.1. Visualização de óxido nítrico	15
4.2.2. Análise morfológica	16
4.3. Pré-maturação das CE em meio de cultura semi-sólido	16
4.3.2. Quantificação do NO liberado extracelular	17
4.3.3. Quantificação de Poliaminas livres (PAs).....	17
4.3.4. Maturação das CE de <i>A. angustifolia</i>	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1. Quantificação de NO	19
5.2. Avaliação Morfológica	22
5.2.1. Pré-maturação em suspensão celular	22
5.2.2. Pré-maturação em meio de cultura semi-sólido	24
5.3. Quantificação do conteúdo endógeno de PAS	26
5.4. Maturação das CE.....	27
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS	30

RESUMO

A *Araucaria angustifolia* é uma conífera subtropical nativa do Brasil. A sua intensa exploração nas últimas décadas a levou a uma categoria de ameaça como espécie em perigo crítico de extinção pela IUCN. Assim, estratégias de conservação são requeridas, dentre elas destaca-se a possibilidade de emprego da embriogênese somática, como ferramenta biotecnológica para a multiplicação em massa. O protocolo de embriogênese somática para essa espécie encontra-se parcialmente desenvolvido junto ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC, sendo seu limitante o processo de maturação das culturas embriogênicas. Em outras espécies, foram descritas melhores taxas de formação e maturação de pró-embriões e embriões viáveis por meio da suplementação do meio de cultura com glutatona reduzida (GSH). Sabe-se também que o óxido nítrico (NO) atua como sinalizador em processos como a germinação de sementes e divisão celular, sendo, no caso da *A. angustifolia*, possivelmente, um dos responsáveis pela polarização dos pró-embriões. Dessa forma, o presente trabalho visou avaliar a influência da suplementação do meio de cultura semi sólido e suspensão celular de pré-maturação de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* com glutatona reduzida (0,01; 0,1; 1; 5 mM), glutatona dissulfeto (0,1 mM) e butionina sulfoximina (0,1 mM) no conteúdo endógeno de NO, no NO extracelular liberado ao meio de cultura, nas características morfológicas, no conteúdo endógeno de poliaminas (PA) e no processo de maturação dos embriões somáticos. A suplementação dos meios de cultura de pré-maturação com GSH apresentou influência direta no conteúdo endógeno de NO e no desenvolvimento dos pró-embriões de *A. angustifolia*. Destacando os tratamentos com GSH (0,01 e 0,1 mM), que resultaram em um aumento de pelo menos 4x no número de pró-embriões formados. O tratamento com 5 mM de GSH na pré-maturação resultou na formação de embriões globulares com alto conteúdo endógeno de NO no ápice embrionário. No entanto, as culturas embriogênicas resultaram na formação de embriões torpedo anormais quando submetidas à maturação.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Araucaria angustifolia*

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze é uma conífera subtropical da família Araucariaceae, conhecida como araucária, pinheiro do Paraná ou pinheiro brasileiro. A família Araucariaceae engloba cerca de 40 espécies, divididas em três gêneros: *Araucaria*, *Agathis* e *Wollemia* (CODRINGTON *et al.*, 2005). O gênero *Araucaria* conta com 19 espécies somente no hemisfério sul, das quais duas são oriundas da América do Sul, sendo elas *A. angustifolia* (Brasil e Argentina) e *A. araucana* (Argentina e Chile) (MATTOS, 1994).

A *A. angustifolia* pode ser encontrada em uma vasta área do planalto sul brasileiro, em regiões acima de 500m e entre 18° e 30° de latitude Sul. Sua ocorrência é predominante nos estados do sul do Brasil e alguns pontos descontínuos no sudeste, além de pequenas manchas existentes na Argentina, (extremo nordeste) e no leste do Paraguai (MATTOS, 1994).

Essa espécie é a gimnosperma nativa de maior importância econômica do Brasil. Devido a sua alta qualidade de madeira, resina e uso das sementes para a alimentação, a *A. angustifolia* sofreu uma grande exploração nas últimas décadas. Essa exploração levou ao desenvolvimento de diversas regiões do sul do país, porém foi realizada de forma predatória, seja do ponto de vista social, econômico ou ecológico (GUERRA *et al.*, 2008). Com isso as populações naturais desta espécie ficaram limitadas a valores em torno de 2% da sua extensão original (GUERRA *et al.*, 2008). Esses fatores levaram a *A. angustifolia* a ser classificada como espécie em perigo de extinção na lista brasileira de espécies ameaçadas (BRASIL, 2008) e em perigo crítico de extinção segundo listagem da IUCN (IUCN, 2011).

Porém, mesmo após a inclusão da *A. angustifolia* na lista oficial de espécies brasileiras ameaçadas de extinção, remanescentes florestais com esta espécie continuam a ser explorados (STEFENON *et al.*, 2009). Neste contexto, a *A. angustifolia* é uma das espécies nativas do Brasil com grande potencial para estudos que auxiliem sua conservação genética através do estabelecimento de coleções de germoplasma *in situ* e *ex situ* (GUERRA *et al.*, 2008).

Dentre as tecnologias que visam à conservação e melhoramento genético de espécies vegetais destaca-se a embriogênese somática, ferramenta importante e de larga aplicação para a conservação da biodiversidade e programas de melhoramento.

1.2. Embriogênese somática

A embriogênese somática (ES) é um processo pelo qual células somáticas mitoticamente quiescentes podem recuperar seu potencial embriogênico e originar novos embriões viáveis através da reprogramação da expressão gênica (MARSONI *et al.*, 2008).

Existem duas formas diferentes para a indução da embriogênese somática: a embriogênese somática direta, onde ocorre uma mínima proliferação de tecido desorganizado precedendo a formação de embriões, e a embriogênese somática indireta, onde calos se proliferam antes da formação do embrião (SHARP *et al.*, 1980).

Os calos embriogênicos são formados por massas proembrionárias (PEMs). A partir das PEMs os processos de formação, maturação, dessecação e regeneração são obtidos (von ARNOLD *et al.*, 2002).

A regeneração de plantas via embriogênese somática inclui cinco principais etapas: iniciação das culturas embriogênicas a partir da inoculação de um explante primário em meio de cultura, em geral, suplementado com fitorreguladores, principalmente auxinas e citocininas; multiplicação das culturas embriogênicas em meio de cultura líquido ou sólido, na maioria das vezes suplementado com fitorreguladores, principalmente auxinas e citocininas; pré-maturação dos embriões somáticos em meio de cultura sem fitorreguladores, visando inibir a multiplicação e estimular diferenciação celular; maturação dos embriões somáticos em meio de cultura suplementado com ABA e com alto potencial osmótico; desenvolvimento das plântulas em meio de cultura sem fitorreguladores (von ARNOLD *et al.*, 2002)

A propagação de diversas espécies florestais tem sido realizada com sucesso por esse processo, principalmente as espécies do gênero *Picea* (LI *et al.*, 2008). Porém, as gimnospermas são, em geral, mais recalcitrantes à propagação *in vitro* que a maioria das angiospermas e plantas herbáceas (von ADERKAS & BONGA 2000). Em decorrência disso, as culturas embriogênicas de gimnospermas têm sido obtidas, em sua maioria, de embriões imaturos e jovens. (STASOLLA *et al.*, 2002).

Para a *A. angustifolia*, o processo básico de embriogênese somática é caracterizado pela indução de culturas embriogênicas, originadas a partir do ápice do embrião zigótico cultivado *in vitro* em presença ou não de auxinas e citocininas, resultando na formação de pró-embriões que caracterizam os estágios iniciais da embriogênese. A formação de embriões somáticos é estimulada quando sinais químicos de ajuste osmótico (Polietilenoglicol e maltose) e hormonal (ABA) são fornecidos aos pró-embriões durante a etapa de maturação (dos SANTOS *et al.*, 2002).

Atualmente, em algumas linhagens celulares pode ser observada a formação de poucos embriões globulares, que raramente evoluem para estágios de desenvolvimento torpedo e pré-cotiledonar. Assim, embora uma série de avanços tenha sido gerada até o momento, a regeneração de plântulas por esta rota morfogênética ainda não foi obtida por completo. Apenas embriões em seu estágio de desenvolvimento inicial têm sido formados, sendo o processo de maturação dos embriões o atual limitante da técnica (SANTOS *et al.*, 2008; ANDRADE, 2010).

1.3. Glutathione como moduladora da embriogênese somática

A glutathione reduzida (GSH) é um tripeptídeo tiólico formado pelo ácido glutâmico, cisteína e glicina (γ -glu-cys-gly) que pode ser encontrado na grande maioria das células de eucariotos e procariotos (NOCTOR *et al.*, 1998). Sabe-se que nas células de plantas a concentração intracelular de glutathione gira em torno de 2-5 mM (FOYER & NOCTOR, 2005). Mais especificamente, no estroma do cloroplasto essa concentração está próxima de 5 mM (NOCTOR *et al.*, 1998).

A síntese da GSH conta com duas principais etapas ATP-dependentes, catalisadas pela γ -glutamylcysteína sintetase e glutathione sintetase, culminando na formação da γ -glutamylcisteína e posteriormente da GSH (Fig. 1).

Em muitas reações bioquímicas, a GSH age como um agente redutor, essa capacidade redutora é determinada pela presença do grupamento -SH na cisteína. Um exemplo disso é a enzima Glutathione Peroxidase (GPX), que usa a GSH como doador de elétrons para redução do H_2O_2 a H_2O , auxiliando na desintoxicação da célula. Após doar um elétron, a GSH em si se torna reativa (GS^\cdot), porém, devido à alta concentração de sua molécula encontrada na célula, rapidamente a GS^\cdot reage com outra GS^\cdot , formando, através de uma ponte dissulfeto, a glutathione oxidada (GSSG) (HARMAN *et al.*, 1986; NOCTOR & FOYER, 1998; FOYER & NOCTOR, 2011). Dessa forma, a

GSH exerce um importante papel na manutenção do equilíbrio redox da célula (FOYER & NOCTOR, 2005).

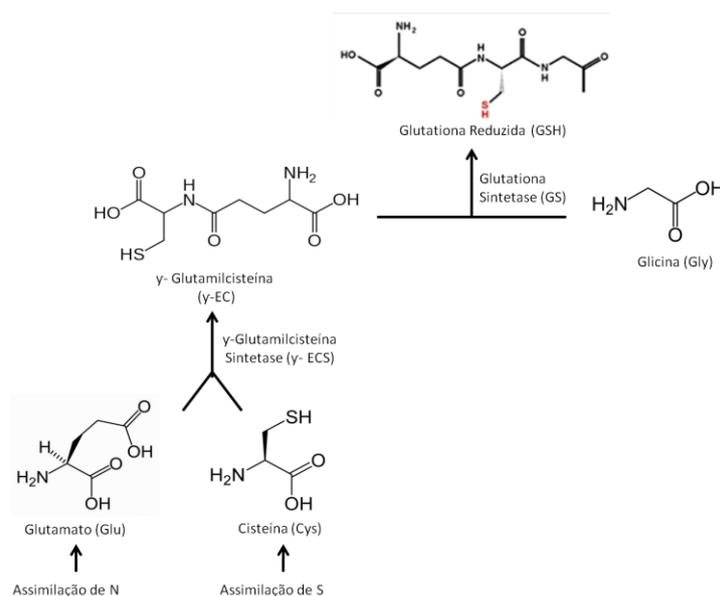


Fig 1. Biosíntese da Glutationa reduzida a partir de seus aminoácidos constituintes. (Adaptado de NOCTOR & FOYER, 1998; NOCTOR *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, tem sido relatada a influência do estado redox na morte celular, defesa contra patógenos e resposta contra estresse abiótico (DOYLE, DIAMOND & McCABE, 2010; FOYER & NOCTOR 2005; MEHDY, 1994; SCHUTZENDUBEL & POLLE, 2002). Porém, dentre os inúmeros antioxidantes presentes na célula, a razão GSH/GSSG é o principal indicador utilizado para avaliação biológica do organismo através do estado redox (SCHAFER & BUETTNER, 2001; STASOLLA, 2010).

Estudos *in vitro* têm sido realizados a fim de ser obter dados com maior fidelidade dessas alterações, visto que os ensaios são realizados em ambiente controlado (STASOLLA, 2010). No caso de cultura de tecidos, há ainda a vantagem da possibilidade da avaliação das implicações da adição de compostos ao meio de cultura no mecanismo redox (STASOLLA, 2010).

Em diversas espécies de plantas foi observada a influência da GSH na divisão e diferenciação celular (EARNSHAW & JOHNSON, 1985; HENMI *et al.*, 2001; BELMONT *et al.*, 2005a; BELMONT *et al.*, 2006). Em estudos realizados com *Picea glauca*, foi demonstrado que a manipulação da razão GSH/GSSG, através da suplementação do meio de cultura com GSH e GSSG, apresentou efeitos na quantidade e qualidade dos embriões somáticos gerados. Sendo que, no desenvolvimento inicial, a

suplementação do meio de cultura com GSH resultou em um aumento na proliferação dos pró-embriões. A inversão da razão GSH/GSSG após esse desenvolvimento inicial dos embriões imaturos, através da suplementação do meio de cultura com GSSG, resultou em um maior número de embriões normais (BELMONT & YEUNG, 2004).

O processo de inversão da razão GSH/GSSG ocorre também durante os processos da embriogênese zigótica, o que pode ser observado em espécies como *Brassica napus* e *Picea glauca* (BELMONT *et al.*, 2005b; STASOLLA *et al.*, 2008).

Aliado a alta relação GSH/GSSG necessária no início do desenvolvimento de embriões de coníferas, sabe-se que a presença de NO nas células embriogênicas pode ser responsável pela manutenção da polarização dos pró-embriões (SILVEIRA *et al.*, 2006). No entanto, ainda não foi elucidado se há relação entre os benefícios gerados pela suplementação do meio de cultura de maturação de culturas embriogênicas de coníferas com GSH e o conteúdo endógeno de NO. A GSH, na presença de oxigênio, pode formar o complexo GSNO, juntamente com o NO (DURZAN, 2002, KESZLER, ZHANG & HOGG, 2010). O GSNO é de fácil difusão dentro do sistema celular, servindo como transportador do NO de meios/tecidos ricos em oxigênio para tecidos pobres em oxigênio (DURZAN, 2002; ZHANG & HOGG, 2005).

2. INTRODUÇÃO

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze é uma conífera nativa do Brasil de alto potencial econômico, visto que, é possível a exploração da sua madeira, resina e sementes para alimentação humana. Essas características levaram a uma intensa exploração da espécie nas últimas décadas, que resultou na inclusão da espécie na lista oficial de espécies brasileiras ameaçadas de extinção.

Neste contexto, a *A. angustifolia* é uma das espécies nativas do Brasil com grande potencial para estudos que auxiliem sua conservação genética através do estabelecimento de coleções de germoplasma *in situ* e *ex situ*.

Assim, o Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, sob coordenação do Prof. Miguel Pedro Guerra, vem realizando, nos últimos anos, estudos relacionados a técnicas de conservação para essa espécie. Dentre elas destaca-se a embriogênese somática.

O processo básico de embriogênese somática em *A. angustifolia* é caracterizado pela indução de culturas embriogênicas a partir embrião zigótico, resultando na formação de pró-embriões que caracterizam os estágios iniciais da embriogênese. A formação de embriões somáticos é estimulada por sinais químicos de ajuste osmótico (Polietilenoglicol e maltose) e hormonal (ABA) durante a etapa de maturação. Porém, embora uma série de avanços tenha sido gerada até o momento, a regeneração de plântulas por esta rota morfogenética ainda não foi obtida por completo. Apenas embriões em seu estágio de desenvolvimento inicial têm sido formados, sendo o processo de maturação dos embriões o atual limitante da técnica.

Sabe-se que o sucesso de um protocolo de embriogênese somática está ligado, em grande parte, às questões relacionadas ao meio de cultura utilizado. Assim, em outras diversas espécies, tem-se observado que a suplementação do meio de cultura com compostos antioxidantes, como a glutatona reduzida, tem sido um ponto chave no aprimoramento de protocolos de pré-maturação e maturação.

Em estudos realizados com *Picea glauca*, foi demonstrado que a manipulação da razão GSH/GSSG, através da suplementação do meio de cultura com GSH e GSSG, apresentou efeitos na quantidade e qualidade dos embriões somáticos gerados. (BELMONT *et al.*, 2005b; STASOLLA *et al.*, 2008).

Aliado a alta relação GSH/GSSG que tem sido apontada como necessária no início do desenvolvimento de embriões de coníferas, sabe-se que a presença de NO nas

células embriogênicas pode ser responsável pela manutenção da polarização dos pró-embriões (SILVEIRA *et al.*, 2006). No entanto, ainda não foi elucidado se há relação entre os benefícios gerados pela suplementação do meio de cultura de maturação de culturas embriogênicas de coníferas com GSH e o conteúdo endógeno de NO.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da suplementação do meio de cultura de pré-maturação de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* com diferentes concentrações de glutathione reduzida, glutathione dissulfeto (GSSG) e butionina sulfoximina (BSO) em aspectos bioquímicos e morfológicos das culturas embriogênicas.

3.1. *Objetivos Específicos*

- Submeter culturas embriogênicas de *A. angustifolia* aos tratamentos de pré-maturação em sistema de suspensão celular e em meio de cultura semi-sólido suplementados com GSH (0,01; 0,1; 1 e 5 mM), GSSG (0,1 mM) e BSO (0,1 mM);
- Quantificar o conteúdo endógeno de NO nas culturas embriogênicas em ambos os sistemas testados;
- Avaliar a morfologia das culturas em ambos os sistemas testados;
- Quantificar o NO extracelular liberado ao meio de cultura pelas culturas embriogênicas em sistema de pré-maturação semi-sólido;
- Quantificar o conteúdo endógeno das poliaminas livres putrescina, espermidina e espermina durante a pré-maturação no tratamento que apresentar melhor resposta morfológica;
- Avaliar o desempenho das culturas embriogênicas do tratamento que apresentar melhor resposta morfológica na maturação através de dupla coloração com Carmim acético e Azul de Evans.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Indução e manutenção das culturas embriogênicas*

Foi realizada a indução de culturas embriogênicas segundo metodologia descrita por dos Santos *et al.* (2002). As pinhas foram coletadas, em dezembro de 2008, de uma população natural de *A. angustifolia* da cidade de São Joaquim – SC. Nessa época, os embriões ainda estão imaturos, no estágio globular, ideal para a indução das culturas embriogênicas (CE).

Imediatamente após a chegada do material ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal – CCA/UFSC foi realizada a assepsia dos pinhões com álcool etílico a 70% por 10 minutos e hipoclorito de sódio 40% por 20 minutos, seguida pela e tríplice lavagem com água destilada autoclavada.

Os embriões imaturos foram excisados em câmara de fluxo e inoculados em placas de petri contendo 25 ml de meio de cultura BM (GUPTA & PULMAN, 1991) suplementado com L-glutamina (1g.L⁻¹), mio-inositol (1g.L⁻¹) e caseína hidrolisada (0,5g.L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de Phytigel® (2,0g.L⁻¹). Os compostos orgânicos foram filtro-esterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem a 121 °C por 15 min. Em seguida, as placas foram incubadas no escuro a 25 ± 2°C.

Foi selecionado um dos calos em que se observou a presença de estruturas com potencial embriogênico através da dupla coloração com Carmin Acético (2%) e Azul de Évans (0,1%) de acordo com metodologia descrita por Durzan (1988).

O calo selecionado foi transferido para biorreatores de imersão permanente (aparato de Steward) contendo 150 ml de meio de cultura MSG (BECWAR, 1989) suplementado com l-glutamina (1,46 g.l⁻¹), sacarose (30 g.l⁻¹) e pH ajustado para 5.7. Os frascos de suspensão celular foram incubados no escuro, sob agitação na horizontal (60 rpm) e temperatura de 24° C (± 2° C). A cada 20 dias foram realizadas repicagens para novos frascos, mantendo-se a concentração de 2 g de CE / 150 ml de meio de cultura.

Após a obtenção de material vegetal suficiente para realização dos posteriores experimentos, uma parte do material foi mantida na suspensão celular e outra transferida para meio de cultura MSG suplementado de l-glutamina (1,46 g.l⁻¹), sacarose

(30 g.L⁻¹), Phytigel (2,0 g.L⁻¹) para posteriores experimentos. Em ambos os casos, foram realizados subcultivos a cada 20 dias.

4.2. Pré-maturação das CE em suspensão celular

As CE foram submetidas a tratamentos de pré-maturação em suspensão celular com meio de cultura MSG básico suplementado com l-glutamina (1,46 g.L⁻¹), maltose (90 g.L⁻¹), polietilenoglicol (70 g.L⁻¹) em diferentes tratamentos de GSH (0,01; 0,1; 1,0 e 5,0 mM), BSO (0,1 mM), GSSG (0,1 mM) e controle.

Para tanto, foi realizada a filtração das CE da suspensão celular com peneira para dissociação celular (Sigma S1145, em malha 150 µM). O material retido na peneira foi pesado em alíquotas de 100 mg e inoculado em placas de culturas de células de 12 poços. A cada poço foram adicionados 2 ml de meio de cultura de pré-maturação contendo diferentes tratamentos. Foram inoculados 3 poços de cada tratamento para cada tempo de coleta. As placas foram mantidas no escuro, em mesa agitadora horizontal (80 rpm) a 24° C (± 2).

As coletas para visualização de óxido nítrico (NO) e análise morfológica foram realizadas nos dias 0, 7, 14 e 21 a partir da incubação.

4.2.1. Visualização de óxido nítrico

A visualização de NO foi realizada de acordo com metodologia descrita por Silveira *et al.* (2006) com pequenas modificações. O reagente DAR-4M AM (Alexis), permeável a parede celular, foi utilizado como marcador pra quantificação intracelular de NO.

Alíquotas de 1 ml de suspensão celular de cada poço foram pipetadas para uma nova placa de cultura de células. As placas foram mantidas no escuro, em mesa agitadora horizontal (80 rpm) durante 30 min para estabilização das CE. Em seguida, foi adicionado a cada poço 1,5 µl de solução estoque de DAR-4M AM (5 mM). Após 2 horas de incubação as CE foram lavadas com o meio de cultura contendo os mesmos tratamentos aos quais foram submetidas na pré-maturação e preparadas para visualização em microscópio de fluorescência Axioplan-Zeiss (Carl Zeiss, Alemanha). Foram utilizados os comprimentos de onda de 450-490 nm para excitação e 500 nm para emissão. Foram capturadas 7 fotos representativas de cada tratamento, em campo claro e com os filtros para efeitos de comparação posterior. A intensidade da

fluorescência foi medida com o auxílio do software AxioVisionLE 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

4.2.2. Análise morfológica

Foram preparadas lâminas contendo alíquotas de 300 µl de cada poço das placas de pré-maturação. As lâminas foram visualizadas no microscópio Axioplan-Zeiss. Em cada lâmina foi realizada a contagem de pró-embriões polarizados e de massas embriogênicas sem organização. Os resultados foram expressos em % de pró-embriões polarizados em relação ao total de estruturas contabilizadas.

4.3. Pré-maturação das CE em meio de cultura semi-sólido

As CE foram submetidas a tratamentos de pré-maturação em placas de petri contendo meio de cultura semi-sólido MSG suplementado com l-glutamina (1,46 g.L⁻¹), maltose (90 g.L⁻¹), polietilenoglicol (70 g.L⁻¹), carvão ativado (1,5 g.L⁻¹) e Phytigel® (2,0 g.L⁻¹) em diferentes tratamentos de GSH (0,01; 0,1; 1,0 e 5,0 mM), BSO (0,1 mM), GSSG (0,1 mM) e controle. Foram inoculadas 4 placas por tratamento, cada uma contendo 3 colônias de 500 mg de CE. As placas foram mantidas no escuro, à temperatura de 25° C (± 2).

As coletas para visualização de NO e NO extracelular liberado foram realizadas nos dias 0, 10, 20 e 30 a partir da incubação.

4.3.1 Visualização de óxido nítrico

A visualização de NO foi realizada de acordo com metodologia descrita no *item 4.2.1* com pequenas modificações.

Foram pesadas três alíquotas de 500 mg de CE de cada tratamento e transferidas para uma placa de cultura de células contendo 1 ml de meio de cultura igual ao do tratamento ao qual foram submetidas, porém sem a adição de Phytigel®. As placas foram mantidas no escuro, em mesa agitadora horizontal (80 rpm) durante 30 min para estabilização das CE. Em seguida, foi adicionado a cada poço 1,5 µl de solução estoque de DAR-4M AM (5 mM). Após 2 horas de incubação as CE foram lavadas com meio de cultura contendo os mesmos tratamentos aos quais foram submetidas na pré-maturação e preparadas para visualização em microscópio de fluorescência Axioplan-Zeiss (Carl Zeiss, Alemanha). Foram utilizados os comprimentos de onda de 450-490 nm para

excitação e 500 nm para emissão. Foram capturadas 7 fotos representativas de cada tratamento, em campo claro e com os filtros para efeitos de comparação posterior. A intensidade da fluorescência foi medida com o auxílio do software AxioVisionLE 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

4.3.2. *Quantificação do NO liberado extracelular*

A quantificação do NO liberado extracelular foi baseada em metodologia descrita por Silveira *et al.* (2006). O reagente DAR-4M, impermeável a parede celular, foi utilizado como marcador.

Foram pesadas cinco alíquotas de 500 mg de CE de cada tratamento e transferidas para uma placa de cultura de células contendo 1 ml de meio de cultura igual ao do tratamento ao qual foram submetidas, porém sem a adição de Phytigel®. As placas foram mantidas no escuro, em mesa agitadora horizontal (80 rpm) durante 30 min para estabilização das CE. Em seguida, foi adicionado a cada poço 1,5 µl de solução estoque de DAR-4M (5 mM). Após 2 horas de incubação, foram pipetados 500 µl da solução de incubação sem presença de células das CE para uma microplaca. A leitura foi realizada em fluorômetro Chamaleon™V (Hidex) com os filtros de excitação 540 nm e de emissão 590 nm. Um controle negativo com meio de cultura sem adição de DAR-4M e outro positivo com adição de DAR-4M, ambos sem adição de CE, foram realizados.

4.3.3. *Quantificação de Poliaminas livres (PAs)*

Foram realizadas coletas aos 15 e 30 dias de cultivo em meio de cultura de pré-maturação para quantificação das PAs livres. As coletas foram realizadas dos tratamentos controle e do tratamento que apresentou melhor características morfológicas. A quantificação de PAs livres foi baseada em metodologia descrita por Silveira *et al.* (2004).

Foram coletadas duas alíquotas de 200 mg de MF de cada tratamento. As amostras foram maceradas em 1400 µL de ácido perclórico 5% (v/v). O material macerado foi coletado e incubado no gelo por 1 hora em microtubos de 2 ml. Posteriormente foi realizada centrifugação a 14000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi reservado. O pellet foi ressuscitado em 200µL de PCA 5% e submetido a uma nova centrifugação. O sobrenadante da última centrifugação foi adicionado ao primeiro sobrenadante para quantificação das PAs livres.

Foram retiradas alíquotas de 40 µL do sobrenadante coletado. As alíquotas foram derivatizadas utilizando-se 100 µL de cloreto de dansil (5 mg.mL⁻¹ em acetona), 50 µL de solução saturada de NaHCO₃ e 20 µL de 1,7-diaminoheptano (DAH). Após a derivatização as amostras foram incubadas no escuro por 50 min à temperatura de 70°C. O excesso de cloreto de dansil foi transformado em dansil-prolina pela adição de 25 µL de solução de prolina. As amostras foram então incubadas no escuro em temperatura ambiente. As PAs foram particionadas com tolueno e a fase orgânica, contendo as poliaminas, foi coletada, seca em rotador concentrativo à vácuo (RVC 2-25, Analítica) a 40°C e ressuspensa em 175 µL de acetonitrila (fase móvel). As quantificações das poliaminas foram realizadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), sendo injetados 20 µL de cada amostra em coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). As áreas dos picos e tempos de retenção de cada PA da amostra foram avaliados por comparação com concentrações conhecidas: Put, Spd, Spm e DAH.

4.3.4. *Maturação das CE de A. angustifolia*

Após 30 dias de cultivo em meio de pré-maturação semi-sólido, as culturas foram transferidas para meio de cultura de maturação MSG suplementado com l-glutamina (1,46 g.L⁻¹), maltose (90 g.L⁻¹), polietilenoglicol (70 g.L⁻¹), carvão ativado (1,5 g.L⁻¹), ABA (150 µM) e Phytigel® (2,0 g.L⁻¹). Foram transferidas as culturas do tratamento controle e do tratamento que apresentou melhores características morfológicas durante a pré-maturação. Foram inoculadas 3 placas por tratamento, cada uma contendo 3 colônias de 500 mg de CE. As placas foram mantidas no escuro, à temperatura de 25° C (± 2).

Aos 10, 20 e 30 dias de inoculação foi avaliada a morfologia das CE de *A. angustifolia* através da dupla coloração com Carmin Acético (2%) e Azul de Evans (0,1%) de acordo com metodologia descrita por Durzan (1988).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação de NO

Durante a pré-maturação das CE em suspensão celular, pode-se observar expressiva queda no conteúdo endógeno de NO nos tratamentos contendo GSH nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM (Fig. 2).

O tratamento controle, GSH (1 mM), BSO (0,1 mM) e GSSG apresentaram comportamentos semelhantes, ou seja, aumento no conteúdo endógeno de NO nos tempo 7 e 14 dias, seguida por expressiva queda aos 21 dias.

Já o tratamento com alta concentração de GSH (5 mM) apresentou os maiores níveis de NO, em relação aos outros tratamentos, durante todo o cultivo. Aos 21 dias, diferentemente dos outros tratamentos, houve uma queda no conteúdo endógeno de NO, essa queda, porém, não foi maior do que o conteúdo de NO endógeno encontrado no tempo 0 (Fig. 2).

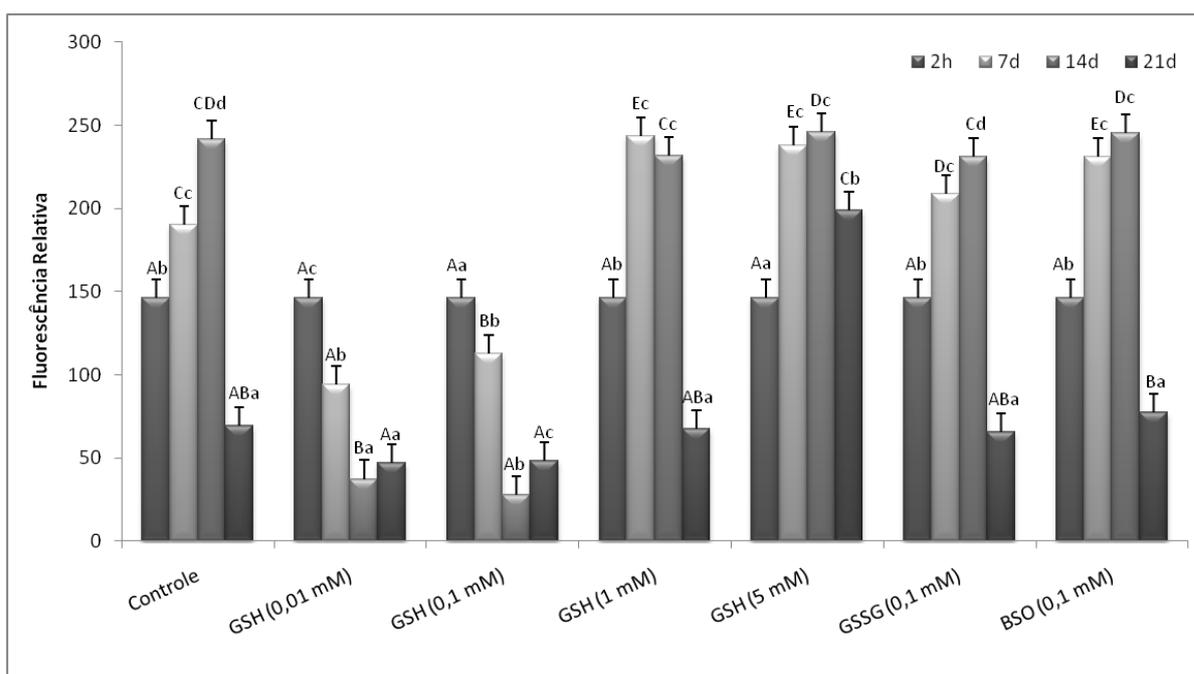


Fig 2. Fluorescência relativa do NO intracelular observado no diferentes tratamentos com GSH (0,01; 0,1; 1 e 5 mM), GSSG 0,1 mM e BSO 0,1 mM durante a pré-maturação de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* em suspensão celular. Valores expressos em fluorescência relativa \pm Desvio Padrão. Médias seguidas por letras maiúsculas marcam diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os tratamentos. Médias seguidas por letras minúsculas marcam diferenças significativas ($p < 0,01$) dentro do tratamento nos diferentes tempos de cultivo. Ambos segundo teste de separação de médias SNK.

As CE submetidas à pré-maturação em meio de cultura semi-sólido apresentaram comportamento semelhante das CE submetidas à pré-maturação em suspensão celular.

Foi avaliado o conteúdo endógeno de NO nos tempos 0, 10, 20 e 30 após a inoculação das CE nos diferentes tratamentos. Pode-se observar que as CE submetidas aos tratamentos com suplementação do meio de cultura com GSH (0,01 e 0,1 mM) apresentaram diminuição no conteúdo endógeno de NO (Fig 3).

Já as CE submetidas aos tratamentos contendo GSH (1 e 5 mM), GSSG (0,1 mM) e BSO (0,1 mM) apresentaram comportamento semelhante ao tratamento controle. Sendo que, o conteúdo endógeno de NO foi sofrendo aumento progressivo durante o cultivo na pré-maturação (Fig. 3).

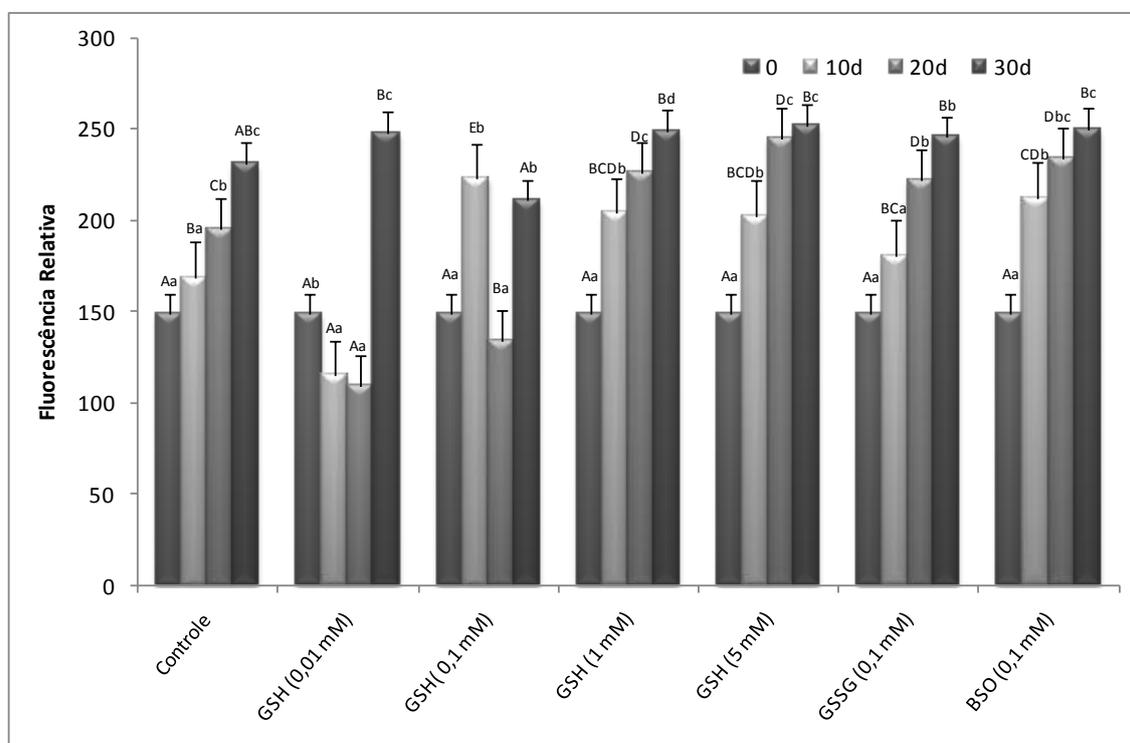


Fig 3. Fluorescência relativa do NO intracelular observado no diferentes tratamentos com GSH (0,01; 0,1; 1 e 5 mM), GSSG 0,1 mM e BSO 0,1 mM durante a pré-maturação de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* em meio de cultura semi-sólido. Valores expressos em fluorescência relativa \pm Desvio Padrão. Médias seguidas por letras maiúsculas marcam diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os tratamentos. Médias seguidas por letras minúsculas marcam diferenças significativas ($p < 0,01$) dentro do tratamento nos diferentes tempos de cultivo. Ambos segundo teste de separação de médias SNK.

Da mesma forma, a quantificação de NO liberado ao meio de cultura nos tempos 0, 10, 20 e 30 dias de pré-maturação mostrou a diminuição nos teores de NO nos tratamentos contendo GSH (0,01 e 0,1 mM) (Fig 4).

As culturas submetidas aos tratamentos com GSH (1 mM), GSSG (0,1 mM) e BSO (0,1 mM) apresentaram um queda no conteúdo de NO liberado ao meio de cultura aos 10 dias de inoculação, seguido por um aumento aos 20 dias e estabilização aos 30 dias (Fig 4).

Já as culturas submetidas ao tratamento com GSH (5 mM) apresentou um progressivo aumento no conteúdo de NO liberado ao meio de cultura durante todo o tempo de cultivo. Sendo aos 20 e 30 dias o tratamento que apresentou maior liberação de NO (Fig 4).

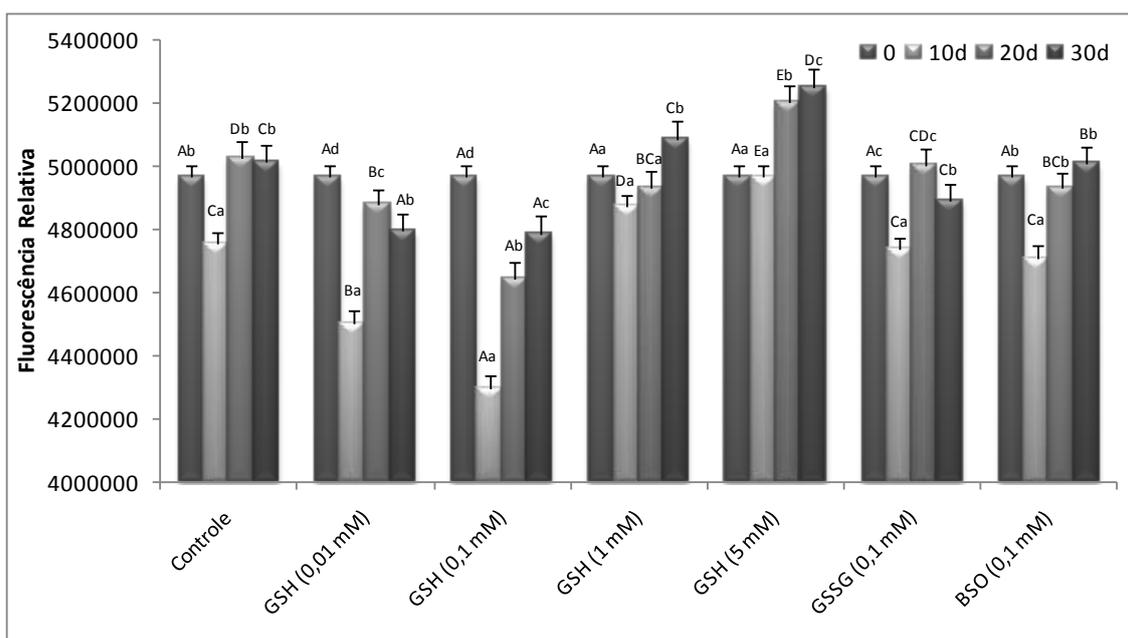


Fig 4. Fluorescência relativa do NO liberado ao meio de cultura observado nos diferentes tratamentos com GSH (0,01; 0,1; 1 e 5 mM), GSSG 0,1 mM e BSO 0,1 mM durante a pré-maturação de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* em meio de cultura semi-sólido. Valores expressos em fluorescência relativa \pm Desvio Padrão. Médias seguidas por letras maiúsculas marcam diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os tratamentos. Médias seguidas por letras minúsculas marcam diferenças significativas ($p < 0,01$) dentro do tratamento nos diferentes tempos de cultivo. Ambos segundo teste de separação de médias SNK.

Os presentes resultados sugerem que a GSH pode ser utilizada em sistemas vegetais em baixas concentrações como um seqüestrador de NO. Mostra também uma forte relação entre a adição exógena de GSH e o conteúdo endógeno e exógeno liberado ao meio de cultura de NO.

Sabe-se que na presença de oxigênio a GSH e o NO formam o complexo S-nitrosoglutationa (GNSO) (SINGH, HOGG & KALYANARAMAN, 1996). Isso pode explicar a queda no conteúdo endógeno de NO após a adição exógena de GSH, visto

que o reagente DAR4M – AM não possui afinidade pelo GSNO. Segundo Durzan (2002), o GSNO é uma reserva de NO, que pode ser transportada para tecidos com baixas concentrações de oxigênio livre para conseqüente liberação do NO, sendo que esse transporte de NO se mostra essencial no desenvolvimento dos tecidos internos de sementes.

Curiosamente, o aumento tanto no conteúdo endógeno de NO, quando no conteúdo exógeno de NO, em ambos os sistemas de pré-maturação podem ser explicados pelo fato de que altas concentrações de GSH aliado a presença de GSNO representa uma das principais formas de decomposição da GSNO em NO (Singh, Hogg & Kalyanaraman, 1996).

5.2. Avaliação Morfológica

5.2.1. Pré-maturação em suspensão celular

A suplementação do meio de cultura com concentrações de GSH de 0,01 e 0,1 mM em culturas embriogênicas mantidas em suspensões celulares resultou na indução de polarização das CE. Resultados semelhantes foram encontrados por trabalhos anteriores com *Picea glauca*, onde a GSH favoreceu a multiplicação dos pró-embriões (Belmonte *et al.*, 2005).

A estimativa da porcentagem de pró-embriões polarizados durante a pré-maturação das CE foi realizada contabilizando-se o número de estruturas embriogênicas desorganizadas (Fig 5A) e de pró-embriões polarizados (Fig 5B).

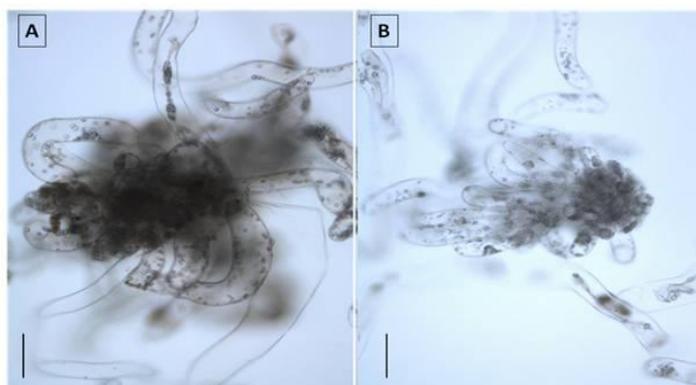


Fig 5. A – Complexos celulares suspensor-embriônários de *A. angustifolia* sem aparente polarização. B – Pró-embrião de *A. angustifolia* polarizado. Barra = 100 μ M.

Aos 7 dias de cultivos foi observada a presença de 35% de pró-embriões polarizados (Fig. 6) nos tratamentos suplementados com GSH 0,01 e 0,1 mM. Houve um expressivo aumento na polarização dos embriões, visto que os demais tratamentos, incluindo o controle, não passaram de 8% de pró-embriões polarizados.

Já aos 14 e 21 dias de cultivo, as CE dos tratamentos 0,01 e 0,1 mM apresentaram uma expressiva queda no conteúdo endógeno de NO, juntamente com a “despolarização” das estruturas (Fig. 10C). O que pode ser explicado por trabalhos anteriores realizados em CE de *A. angustifolia*, que apontaram a presença de NO nas células embriogênicas como um possível responsável pela manutenção da polarização dos pró-embriões somáticos (Silveira *et al.*, 2006).

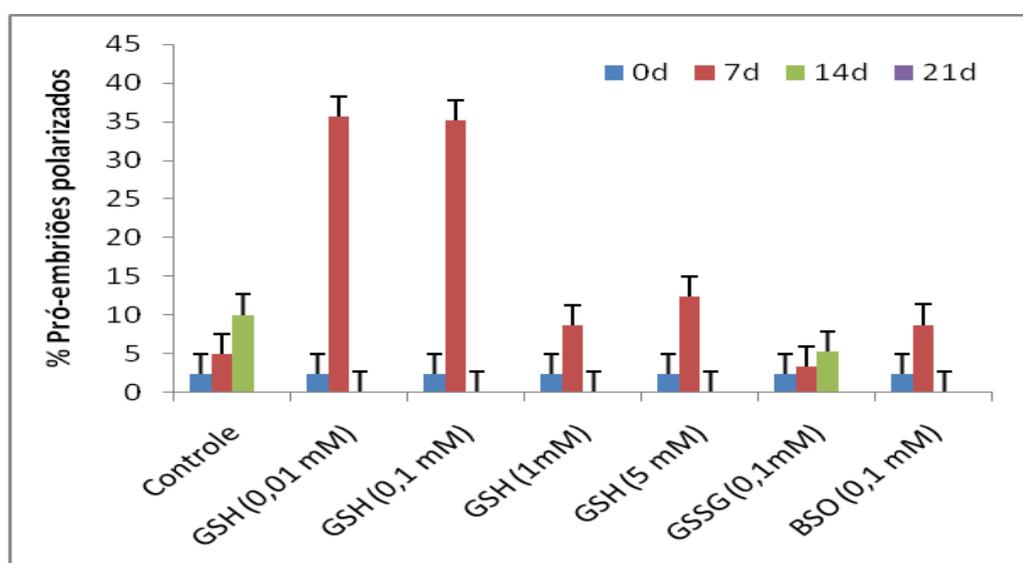


Fig 6. Porcentagem de pró-embriões polarizados nas CE de *A. angustifolia* submetidas a diferentes tratamentos de pré-maturação em suspensão celular, sendo eles: GSH (0,01;0,1;1;5 mM), GSSG (0,1 mM) e BSO (0,1 mM) aos dias 0, 7, 14 e 21 após a inoculação das CE.

Dessa forma, o aumento da GSH se mostrou favorável ao desenvolvimento inicial dos pró-embriões de *A. angustifolia*. Porém, a manutenção das culturas por mais de 7 dias em ambiente com alto potencial Redox mostrou-se prejudicial ao desenvolvimento dos pró-embriões. Esses resultados são coerentes com aqueles obtidos com *Picea glauca*, onde há a necessidade da inversão da alta taxa GSH/GSSG para que haja a diferenciação dos tecidos (Belmonte *et al.*, 2006).

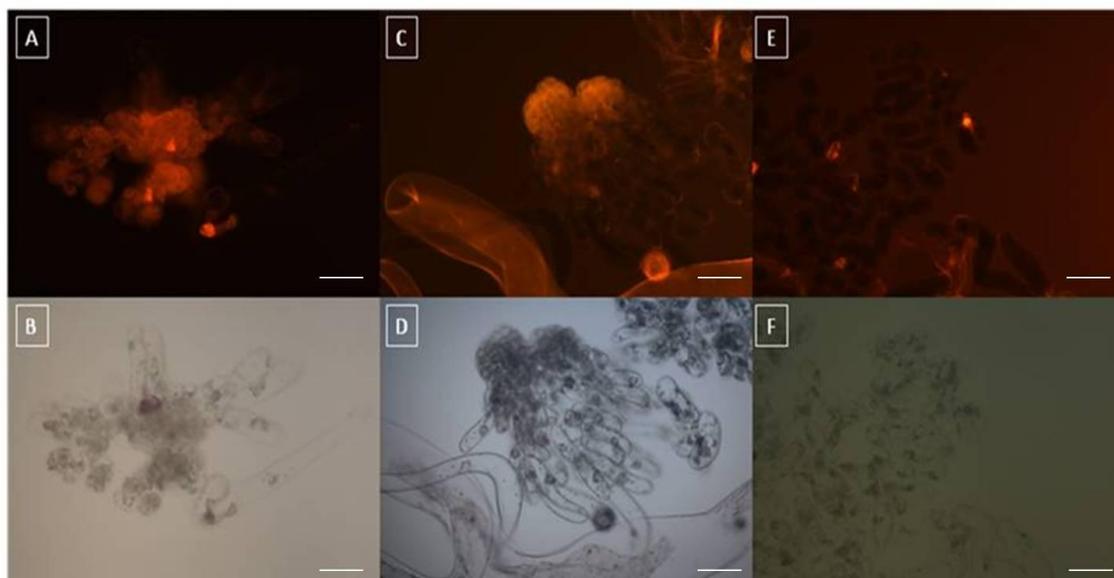


Fig 7. Estruturas predominantemente visualizadas em CE de *A. angustifolia* submetidas à pré-maturação em suspensão celular com GSH (0,1 mM). A, C e E – Visualização do NO endógeno aos 0, 7 e 14 dias de cultivo, respectivamente. B, D e F – Micrografias em campo claro para efeitos de comparação com as micrografias com filtros para visualização de NO. A e B – Massas embriogênicas sem polarização. C e D – pró-embriões polarizados. E e F – Células com características de células embriogênicas, porém soltas. Barra = 100µm.

5.2.2. Pré-maturação em meio de cultura semi-sólido

Durante a pré-maturação das CE em meio de cultura semi-sólido pode-se observar a formação de embriões globulares aos 30 dias de cultivo apenas no tratamento com GSH (5 mM) (Fig 8G-H). Nesse caso, há também altas concentrações de NO endógeno no ápice embrionário durante todas as fases de desenvolvimento, pró-embrião (Fig 8A – F) e embrião globular (8G-H).

Estudos realizados por Silveira et al., (2006) apontaram que o NO poderia ser responsável pela manutenção da polarização das estruturas pró-embrionárias de *A. angustifolia*. Os resultados obtidos nesse trabalho confirmam tais dados e ainda demonstram que o NO está presente em concentrações ainda mais altas no ápice dos embriões globulares.

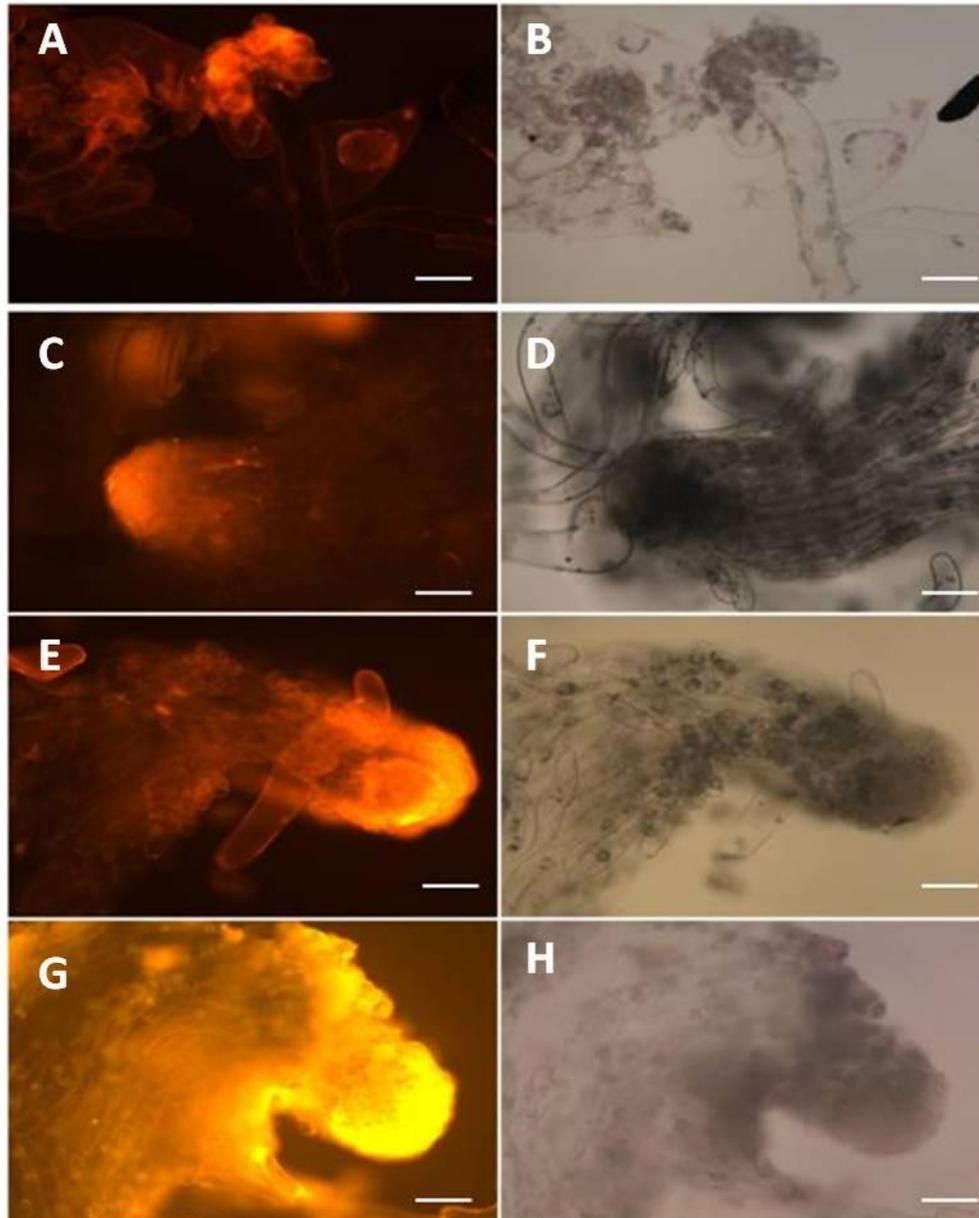


Fig 8. Visualização das CE de *A. angustifolia* submetidas à pré-maturação em meio de cultura semi-sólido suplementado com 5 mM de GSH nos tempos 0, 10, 20 e 30 dias de cultivo. A, C e E – Pró-embriões aos 0, 10 e 20 dias, respectivamente, visualizado em microscópio ótico com corante DAR 4M – AM. B, D e F – Visualização dos pró-embriões A, C e F, respectivamente, em microscópio ótico em campo claro. G e H – Embrião globular formado aos 30 dias de cultivo com corante DAR 4M – AM e em visualização em campo claro, respectivamente. Barra = 100µm.

A organização das estruturas embrionárias visualizadas na pré-maturação com suplementação de GSH (5 mM) sugerem que esse sistema de pré-maturação possibilita melhor organização das estruturas embrionárias do que o sistema de pré-maturação em suspensão celular.

Dessa forma, os experimentos visando à quantificação de poliaminas (PAs) livres endógenas durante a pré-maturação foram realizadas em meio de cultura semi-sólido com suplementação de 5 mM de GSH. O ensaio visando avaliar o desempenho das CE na maturação foi realizado a partir de CE de *A. angustifolia* previamente submetidas à pré-maturação em meio de cultura semi sólido suplementado com 5 mM de GSH.

5.3. Quantificação do conteúdo endógeno de PAS

As CE submetidas à pré-maturação em meio de cultura semi-sólido com suplementação de GSH 5 mM e 0 mM apresentaram o mesmo comportamento em relação ao conteúdo endógeno de putrescina (PUT), espermidina (SPD), espermina (SPM) e PAs totais. Dessa forma, as mudanças nos perfis de PAs obtidas se deve ao tratamento de pré-maturação, e não a suplementação com GSH (Fig 9 e 10).

Na pré-maturação há, diferentemente da multiplicação, a indução de estresse osmótico pela adição de PEG (7%) e maltose (9%) ao meio de cultura.

Durante a pré-maturação, foi observada uma diminuição de mais de 50% no conteúdo de PAs livres totais e SPD aos 15 dias, valor esse que se manteve estável até os 30 dias. Os níveis de PUT foram reduzidos à quase 0 já aos 15 dias de cultivo, também se mantendo aos 30 dias. Os níveis de SPM se mantiveram durante todo o cultivo (Fig 9 e 10).

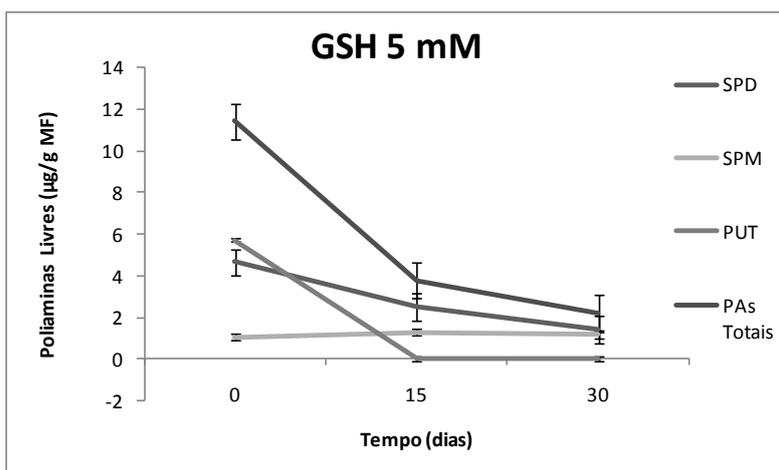


Fig 9. Quantificação de PAs livres em CE submetidas à pré-maturação com GSH 5 mM. Valores médios seguidos de \pm Desvio Padrão.

Resultados semelhantes foram encontrados em *Picea glauca* com a suplementação do meio de cultura com PEG (10%). Nesse caso, foi observada uma

queda nos níveis de PUT aos 15 e 30 dias e a manutenção no conteúdo endógeno de SPM (KONG *et al.*, 1998). Esses resultados são também confirmados por estudos realizados com *Picea abies* e *P. Rubens*, onde, durante a maturação das culturas embriogênicas foi observada uma queda nos conteúdos endógenos de PUT e SPD (MINOCHA *et al.*, 2003). Minocha *et al.*, (2003) sugerem também que, diferentemente das angiospermas, durante o desenvolvimento dos embriões somáticos de coníferas, há uma diminuição no conteúdo endógeno de PAs.

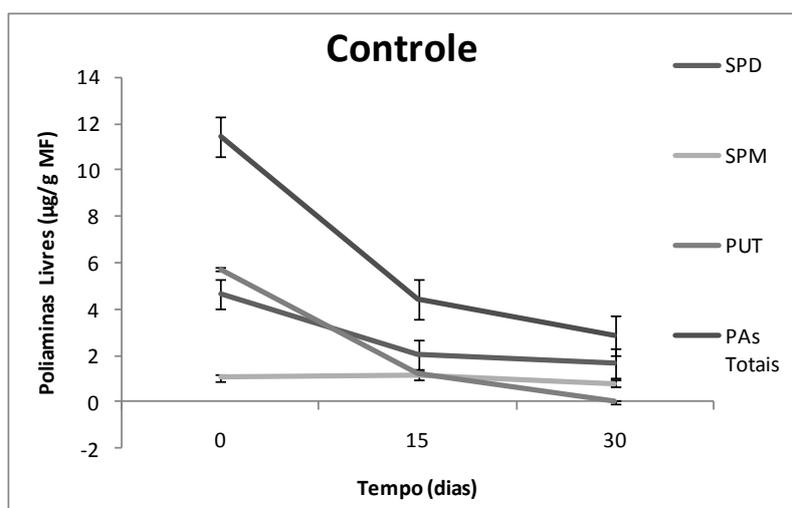


Fig 10. Quantificação de PAs livres em CE submetidas à pré-maturação sem suplementação com GSH. Valores médios seguidos de \pm Desvio Padrão.

5.4. Maturação das CE

As CE submetidas à maturação com ABA (150 μ M) após a pré-maturação em meio de cultura semi-sólido sem a suplementação de GSH não apresentaram formação de pró-embriões polarizados.

Já para as CE que passaram pela pré-maturação com GSH 5 mM, foi observado, durante a maturação das culturas embriogênicas, um alongamento do ápice embrionário estimulado pela presença do ABA (Fig 11). Aos 30 dias de maturação, são encontradas estruturas alongadas semelhantes ao apresentado por estruturas torpeda. No entanto, apesar do ápice embrionário estar bem definido, há a formação de estruturas do suspensor por todo o embrião somático (Fig 11F-H), caracterizando um desenvolvimento embrionário anormal.

Dessa forma, apesar da suplementação com GSH 5 mM ter causado um aumento da formação de pró-embriões e apresentado a formação de embriões globulares, a maturação desses embriões com 150 μ M de ABA ocorreu de forma anormal, sendo necessário o desenvolvimento de estudos posteriores visando o aprimoramento dos meios de maturação de CE de *A. angustifolia*.

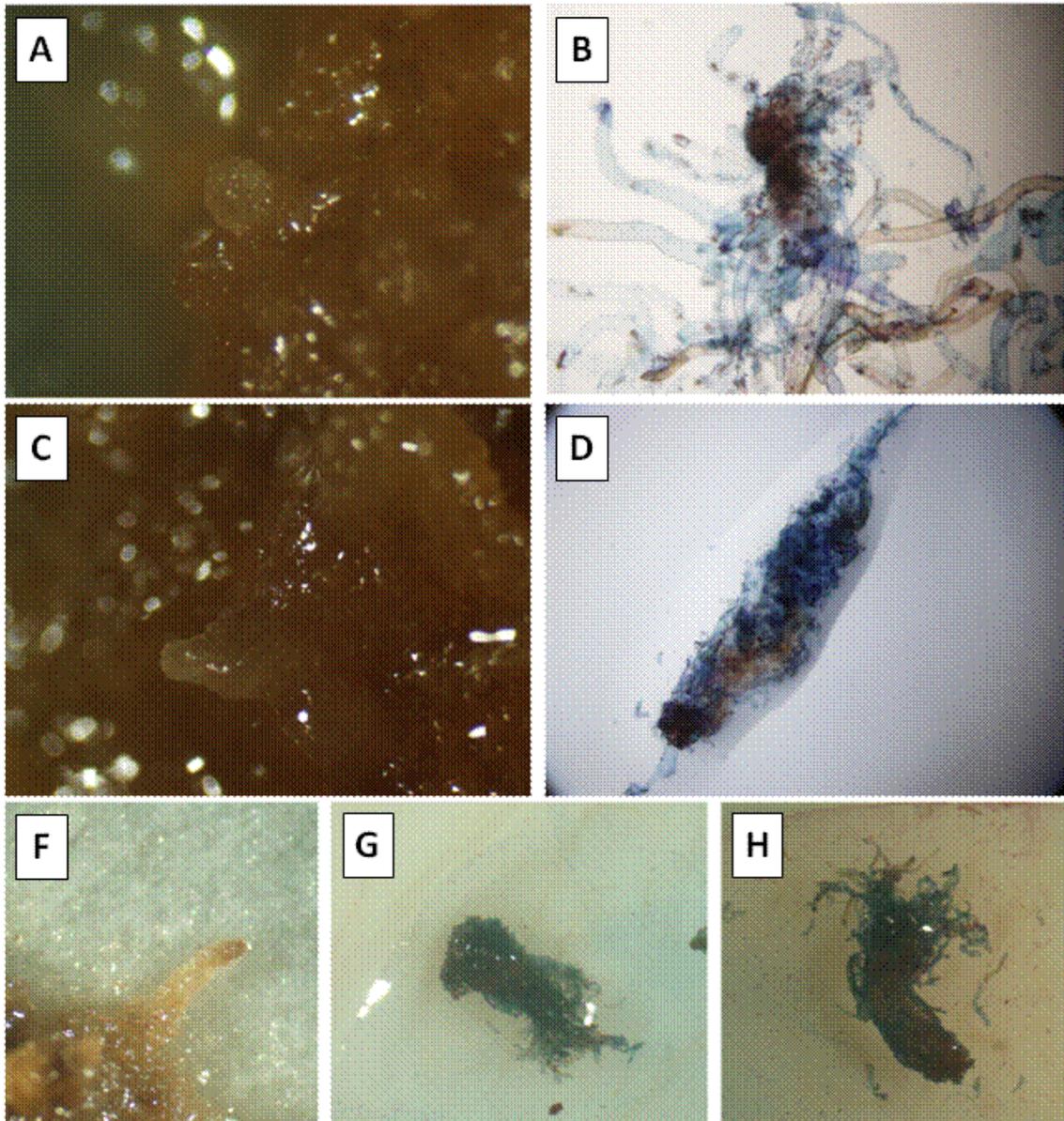


Fig 11. Visualização das CE de *A. angustifolia* submetidas à maturação com 150 μ M de ABA. A, C e E - micrografias das CE em lupa aos 10, 20 e 30 dias de cultivo, respectivamente. B, D, F e G - CE coradas com Carmim Acético, aos 10 (B), 20 (D) e 30 (F e G) dias de cultivo.

6. CONCLUSÃO

- a) A suplementação do meio de cultura de pré-maturação de CE de *A. angustifolia* com GSH influencia as concentrações endógenas e exógenas de NO;
- b) A suplementação do meio de cultura de pré-maturação de CE de *A. angustifolia* em suspensão celular com GSH (0,01 e 0,1 mM) resulta em um aumento no número de pró-embriões polarizados;
- c) A manutenção das CE em meio de pré-maturação em suspensão celular suplementado com (0,01 e 0,1 mM) por mais de 7 dias leva a perda da polarização dos pró-embriões;
- d) A concentração de 5 mM de GSH no meio de cultura de pré-maturação em meio de cultura semi-sólido leva a um melhor desenvolvimento dos embriões somáticos globulares;
- e) Durante a pré-maturação das culturas embriogênicas, o estresse osmótico e o desenvolvimento dos pré-embriões resultam na diminuição nos conteúdos endógenos das PAs livres;
- f) Há um alongamento do ápice embrionário dos embriões submetidos à maturação após a pré-maturação com GSH 5 mM em meio de cultura semi-sólido.

7. REFERÊNCIAS

ANDRADE JBR. Efeito dos agentes de maturação, ABA, PEG e maltose na produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. 2010. 74p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

BECWAR MR, Noland TL, Wyckoff JL: Maturation, germination, and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plant. - *In Vitro cell. dev. Biol. Plant* 25: 575-580, 1989.

BELMONTE MF, YEUNG EC. The effects of reduced and oxidized glutathione on white spruce somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*. 40:61–66, 2004.

BELMONTE MF, DONALD G, REID DM, YEUNG EC, STASOLLA C. Alteration of glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce (*Picea glauca*). *Journal of Experimental Botany*. 56: 2355-2364, 2005.

BELMONTE MF, MACEY J, YEUNG EC, STASOLLA C. The effect of osmoticum on ascorbate and glutathione metabolism during white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 337-346, 2005.

BELMONTE MF, AMBROSE SJ, ROSS ARS, ABRAMS SR, STASOLLA C. Improved development of microspore-derived embryo cultures of *Brassica napus* cv Topaz following changes in glutathione metabolism. *Physiologia Plantarum*. 127: 690-700, 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Reconhece como espécies da flora brasileira ameaçada de extinção aquelas constantes do Anexo I e reconhece como espécies da flora brasileira com deficiência de dados aquelas constantes do Anexo II a esta Instrução. Instrução Normativa MMA nº 06, de 23 de setembro de 2008. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_0512200_8033615.pdf

CODRINGTON TA, SCOTT LJ, SCOTT KD, GRAHAM GC, ROSSETTO M, RYAN M, WIFFEN T, HENRI RJ, HILL K. Unresolved phylogenetic position of *Wollemia*, *Araucaria* and *Agathis*. In: BIELESKI R. (ED.). *Araucariaceae*. London: IDS, 2005. 86-91.

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

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

DOYLE SM, DIAMOND M & McCABE PF, Chloroplast and reactive oxygen species involvement in apoptotic-like programmed cell death in Arabidopsis suspension cultures. *Journal of Experimental Botany*. 61: 473-482, 2010.

DURZAN DJ. Process control in somatic polyembryogenesis. In: Hallgren, J.E. (Ed). *Frans Symposium Department of Forest Genetics and Palnt Physiologi, Swedish. Proceedings...* Swedish: University of Agricultural Sciences. 8: 147–186, 1988.

DURZAN DJ. Stress-induced nitric oxide and adaptive plasticity in conifers *Journal of Forest Science*, 48: 281–291, 2002.

EARNSHAW BA & JOHNSON MA. The effect of glutathione on development in wild carrot suspension cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 133: 988-93, 1985.

FOYER CH & NOCTOR G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses *The Plant Cell*, Vol. 17, 1866–1875, 2005.

FOYER CH & NOCTOR G. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*. 155: 2–18, 2011.

GUERRA MP, STEINER N, MANTOVANI A, NODARI RO, REIS MS, SANTOS KL. Araucária: Evolução, ontogênese e diversidade genética. In: Barbieri, RL, Stumpf ERT. *Origem e evolução de plantas cultivadas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 149-184, 2008.

GUPTA PK, PULLMAN GS (1991) Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. *US patent 5,036,007*.

HARMAN LS, CARVER DK, SCHREIBER J, MASON RP. One- and Two-electron Oxidation of Reduced Glutathione by Peroxidases. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 261: 1642-1648, 1986.

HENMI K, TSUBOI S, DEMURA T, FUKUDA H, IWABUCHI M, OGAWA K. A possible role of glutathione and glutathione disulfide in tracheary element differentiation in the culture mesophyll cells of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Physiology*. 42:673-676, 2001.

IUCN. Red List. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/> Acesso em: 01/05/20110.

KESLER A, ZHANG Y, HOGG N. The Reaction between Nitric Oxide, Glutathione and Oxygen in the Presence and Absence of Protein: How are S-Nitrosothiols Formed?. *Free Radical Biological Medicine*. 48: 55-64, 2010.

KONG L, ATTREE MS, FOWKE LC. Effects of polyethylene glycol and methylglyoxal bis(guanylhydrazone) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*). *Plant Science*. 133:211-220, 1998.

LI C, LIU B, KIM T, MOON H, CHOI Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite genotypes of *Picea koraiensis*. *Plant Biotechnology Report*. 2:259–265, 2008.

MARSONI M, BRACALE M, ESPEN L, PRINSI B, NEGRI AS, VANNINI C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Report*. 27:347–356, 2008.

MATTOS, J. R. O pinheiro brasileiro. 2a. ed. Lages: Artes Gráficas Princesa, 1994. 225.

MEHDY MC. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*. 105:467-472, 1994.

MINOCHA R, KVAALEN H, MINOCHA SC, LONG S. Polyamines in embryogenic cultures of Norway spruce (*Picea abies*) and red spruce (*Picea rubens*). *Tree Physiology*.13:365-337, 2003.

NOCTOR G, ARISI ACM, JOUANIN L, KUNERT KJ, RENNENBERG H, FOYER CH. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants *Journal of Experimental Botany*. 49:623–647,1998.

NOCTOR G, FOYER CH. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Plant Molecular Biology*. 49:249–79, 1998.

SCHAER FQ & BUETTNER GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*. 30: 1191–1212, 2001.

STASOLLA C, KONG L, YEUNG EC, THORPE TA. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell. Development Biology - Plant*. 38:93–105, 2002.

STASOLLA C, BELMONTE M, TAHIR M, ELHITI M, JOOSEN R, MALIEPAARD C, SHARPE A, BOUTILIER K. Buthionine sulfoximine (BSO)-mediated improvement in in vitro cultured embryo quality is associated with major changes in transcripts involved with ascorbate metabolism, meristem development and embryo maturation. *Planta*. 228:255-272, 2008.

STASOLLA C. Glutathione redox regulation of in vitro embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 319-327, 2010.

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

SILVEIRA V, SANTA-CATARINA C, TUN NN, SCHERER GFE, HANDRO W, GUERRA MP, FLOH EIS. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant Sci* 171, 91-98, 2006.

SHARP WR, SONDAHL MR, CALDAS LS, MARAFFA SB. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticul Rev* 268–310, 1980.

SHING RJ, HOGG N, JOSEPH J, KALYANARAMAN B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 18596-18603, 1996.

STEFENON VM, STEINER N, GUERRA MP, NODARI RO. Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: a case study of *Araucaria angustifolia*, *Biodivers Conserv*. 18: 2433-2448, 2009.

von ADERKAS P & BONGA JM. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol*. 20:921–928, 2000.

von ARNOLD S, SABALA I, BOZHKOV P, KYACHOK J, FILONOVA L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 233–249, 2002.

WILLIAMS EG & MAHESWARAN G. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot*. 57: 443–462, 1986.

ZHANG Y, HOGG N. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radical Biology and Medicine*. 38:831:838, 2005.