

NEUSA STEINER

**Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris*
(Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten:
ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK**

Florianópolis
Estado de Santa Catarina- Brasil

2009

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

**Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus
sylvestris*(Linneaus) e *Picea abies*(Linneaus) Karsten:
ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK**

**Discente: Neusa Steiner
Orientador: Prof. Miguel Pedro Guerra**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial à obtenção do título
de Doutor em Ciências. Área de
Concentração: Recursos Genéticos
Vegetais.**

Florianópolis, junho de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Steiner, Neusa

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.

163f. : il., tabs.

Orientador: Miguel Pedro Guerra

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias.

1. *Araucaria angustifolia*. 2. biologia do desenvolvimento 3. coníferas 4. Proteomica 5. expressão genica.

I. Título.

*Dedico este trabalho a vida...
e aos meus pais que me ensinaram sobre a simplicidade e perseverança*

AGRADECIMENTOS

Uma parte de mim nestes últimos anos está refletida neste trabalho e é uma grande alegria e responsabilidade agradecer a inúmeras pessoas que contribuíram durante esta rica etapa de minha vida. Tantos já se foram e muitos ainda estão entre nós...

Meu muito obrigado a todos.

A minha família (Pai (*in memoriam*), Mãe, Marcelo, Tiago e Felipe) por me ajudar a superar, a acreditar e que apesar da distância sempre estiveram presentes

Ao meu marido José Sidinei pelo amor e apoio incondicional

Aos amigos que compartilharam minhas conquistas
e me fortaleceram em momentos difíceis

Ao meu orientador Prof. Miguel Pedro Guerra pelo tempo dedicado, por acreditar no meu trabalho e pelas oportunidades construídas

Aos demais professores os quais me deram oportunidade para discutir sobre este tema e realizar meu trabalho, em especial Profa. Dra. Sara Maldonado (UBA), Profa. Dra. Sara von Arnold (SLU), Profa. Dra. Eny I.S. Floh (USP), Profa. Dra. Marguerita Barraco (UFSC), Profa. Dra. Claudete Santa Catarina (UENF), Prof. Dr. Vanildo Silveira (UENF), Profa. Dra. Zenilda L. Bouzon (UFSC), Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (UFSC), Dr. André Luis Wendt dos Santos (USP), Profa. Dra. Alexandra Mastroberti (UFGRS), Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath (UFRGS), Prof. Dr. Emmanuel Maltempo (UFPR) e Prof. Dr. Luciano Huergo (UFPR)

Aos professores que aceitaram gentilmente fazer parte
da banca deste trabalho

Aos professores do curso de Pós Graduação Recursos Genéticos Vegetais
pelas discussões e por todos os ensinamentos repassados

Aos meus colegas de laboratórios, viagens, bancadas, discussões científicas e
“filosóficas”, chás e cafés

A todos os alunos de Iniciação científica, em especial a Daniela Schmitz, que
compartilharam comigo o trabalho, as dúvidas, as discussões
e as descobertas

A todos que admiram e que contribuem para o estudo
da biologia do desenvolvimento

Aos funcionários desta universidade
A oportunidade de ter ensino público
Ao CNPq pelo apoio financeiro

Agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para minha
formação e para que este trabalho se concretizasse.

Muito Obrigado, Gracias, Thank you, Tack så mycket!

INDICE

<i>AGRADECIMENTOS</i>	v
<i>INDICE</i>	6
<i>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</i>	8
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	11
<i>RESUMO</i>	14
<i>ABSTRACT</i>	15
<i>CAPÍTULO II</i>	16
<i>Análise proteômica durante a embriogênese somática de A. angustifolia</i>	16
<i>3.1. INTRODUÇÃO</i>	17
<i>3.2. MATERIAL E MÉTODOS</i>	19
3.2.1. Material vegetal	19
3.2.2. Extração e quantificação de proteínas	20
3.2.3. Eletroforese bidimensional (2-DE)	21
3.2.4. Análise do gel	22
3.2.5. Digestão dos spots	22
3.2.6. Análise em espectrômetro de massa e interpretação dos dados	23
3.2.7. Análise estatística	24
<i>3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	24
3.3.1. Estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos	24
3.3.2. Conteúdo de proteínas e perfil protéico em géis bidimensionais	25
3.3.3. Identificação e perfil de expressão de proteínas	31
3.3.4. Conclusões	39
<i>CAPITULO III</i>	41
<i>Expressão do homólogo do gene SERK em culturas embriogênicas de Araucaria angustifolia</i>	41
<i>4.1. INTRODUÇÃO</i>	42
<i>4.2. MATERIAL</i>	<i>E</i>
	<i>MÉTODOS</i>
	44
4.2.1. Material vegetal	44
4.2.2. Extração de RNA	44
4.2.3. Quantificação de RNA total	45
4.2.4. RT-PCR para clonagem de homólogos de SERK	46
4.2.5. Caracterização dos possíveis homólogos de SERK por análise de seqüências	48
4.2.6. Caracterização do padrão de expressão dos possíveis homólogos de SERK por hibridização <i>in situ</i>	48

<i>4.3.RESULTADOS</i>	<i>E</i>	<i>DISCUSSÃO</i>
		<u>49</u>
4.3.1. Quantificação de RNA		<u>49</u>
4.3.2. Obtenção de homólogos de SERK		<u>50</u>
4.3.3. Clonagem e caracterização dos possíveis homólogos de SERK		<u>51</u>
4.3.4. Caracterização do padrão de expressão dos possíveis homólogos de SERK por hibridização <i>in situ</i>		<u>56</u>
<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</i>	<i>Erro!</i>	<i>Indicador não</i>
		<i>definido.</i>
6. REFERÊNCIAS		<u>61</u>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO II

Figura 1. (a) Padrão de desenvolvimento de embriões somáticos de A. angustifolia correspondentes aos estádios de desenvolvimento utilizados neste estudo. (b) Tratamentos e períodos de coleta das amostras correspondente as diferentes fases do desenvolvimento do embrião somático (a). Amostra 1 (0 dias) - cultura embriogênicas provenientes da etapa de proliferação em meio de cultura BM (Gupta & Pullmann, 1991) suplementado com 2,4-D (2 μ M), BAP e Kin (0,5 μ M cada) contendo predominantemente pró-embriões somáticos. Amostra 2 (30 dias) - culturas embriogênicas coletadas após 30 dias de subcultivo em meio de cultura BM (Gupta & Pullmann, 1991) suplementado com ABA (150 μ M), Maltose (9% p/v) e PEG (7%p/v) isento de fitorreguladores contendo embriões somáticos em estádios iniciais do desenvolvimento. Amostra 3 (60 dias) - culturas coletadas após 60 dias de cultivo nas mesmas condições da amostra 2 contendo embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento. _____ 25

Figura 2. Conteúdo de proteínas da fase pró-embriônica, embriogênese inicial e embriogênese final durante a o desenvolvimento do embrião somático de A. Angustifolia. Barras verticais sobre colunas representam \pm desvio padrão da média. _ 26

Figura 3. Distribuição do número médio de “spots” de acordo com o parâmetro peso molecular (Kda) e ponto isoelétrico (pI) no gel 2-DE dos estádio de pró-embriônico, embriogênese inicial e embriogênese tardia durante o desenvolvimento do embrião somático de A. Angustifolia. Valores foram obtidos dos spots presentes nas três repetições de cada estádio. Barras verticais sobre colunas representam \pm desvio padrão da média. _____ 27

Figura 4. Perfil 2-DE da fase pró-embriônica (A), embriogênese inicial (B) e embriogênese final (C) durante o desenvolvimento do embrião somático de A. angustifolia. As imagens representam o perfil de proteínas expressas a partir das amostras coletadas durante a proliferação (0 dias), maturação (30 e 60 dias). O gradiente de pH e a posição dos marcadores de peso molecular estão indicados no topo e lado esquerdo das imagens, respectivamente. Os números indicados nos géis se referem as proteínas identificadas durante as diferentes fases de desenvolvimento do embrião, as quais estão especificadas na Tabela 1. Os mesmos números em diferentes géis representam a mesma proteína. Números únicos representam proteínas específicas. _ 29

Figura 5. Expressão diferencial de proteínas, em número de “spots”, entre a fase pró-embriônica, embriogênese inicial e embriogênese final durante o desenvolvimento do embrião somático de A. angustifolia. Valores entre parêntesis representam o número total de spots em cada fase. Valores foram obtidos a partir do gel sintético contendo somente os spots presentes nas três repetições de cada estádio. _____ 30

Tabela 1. Lista de proteínas identificadas durante a embriogênese somática de A. angustifolia _____ 36

Figura 6. Dinâmica de expressão, com o critério percentagem de volume, das 35 proteínas identificadas durante a fase pró-embriônica, embriogênese inicial e embriogênese final do desenvolvimento do embrião somático de A. angustifolia. Valores obtidos a partir dos géis contendo somente spots presentes em todas as três repetições de cada estágio. _____ 38

Figura 7. Classificação funcional das proteínas identificadas durante o desenvolvimento do embrião somático de A. angustifolia. A classificação funcional de acordo a base de dados do gene ontology (<http://www.expasy.org>) _____ 39

CAPÍTULO I

Tabela 1. Rendimento e qualidade do RNA total por espectrofotômetro em amostras de A. angustifolia. _____ 50

Figura 1. RNA em gel de agarose (1%) obtidos em 4 amostras de A. angustifolia. BM00 = Meio de cultura BM sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2µM) BAP e Kin (0,5µM) (fase proliferação); BM0 35d - culturas provenientes do meio BM00 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 µM) (fase maturação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 µM) (fase maturação). _____ 50

Figura 2. RT-PCR a partir de RNAs extraídos de culturas celulares de A. angustifolia, com utilização de primers degenerados para o gene SERK. Os códigos em cada canaleta representam os diferentes meios de cultura onde foram cultivados os materiais utilizados para extração de RNA: BM00 = Meio de cultura BM sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2µM) BAP e Kin (0,5µM) (fase proliferação); BM0 35d - culturas provenientes do meio BM00 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 µM) (fase maturação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 µM) (fase maturação). Mkb: Marcador molecular. _____ 51

Figura 3. Comparação da seqüência protéica de AbSERK1 de A. angustifolia com outros homólogos de SERK: As seqüências deduzidas de aminoácidos de proteínas SERK de milho (ZmSERK1 e ZmSERK2), Arabidopsis (AtSERK1-5), Medicago (MtSERK1) e cenoura (DcSERK1) foram alinhados e os domínios relevantes indicados por retângulos abaixo do alinhamento. Os aminoácidos totalmente conservados são indicados por "" e os parcialmente conservados, indicados por ":". "Gaps" incluídos para otimização do alinhamento são indicados por "-". ZIP: zíper de leucina putativo; LRR1-5: domínios contendo os padrões repetitivos de leucina (Leucine Rich Repeats); SPP: região rica em prolina; TM: domínio transmembrana; I-XI: domínios característicos de proteínas-kinase I a XI; C-terminal: domínio carboxi-terminal.* _____ 54

Figura 4. Relações filogenéticas entre homólogos de SERK. As seqüências protéicas correspondentes aos domínios kinase I-XI de diferentes homólogos de SERK foram alinhados e uma matriz de distância (Saitou & Nei, 1987) gerada. Esta matriz foi utilizada para a construção do cladograma por neighbour-joining. A barra indica 10% de substituições não-sinônimas. Os números indicam valores de bootstrap, em porcentagem (1000 repetições). Apenas os valores acima de 75% são mostrados. _____ 55

Figura 5. Estereomicroscopia e microscopia eletrônica de varredura de culturas embriogênicas de A. angustifolia em fase de proliferação (cultivados em BM0) (a,c) e durante a embriogenese inicial na: fase de maturação (em meio BM2 35d (Meio de) (b,d). Nas culturas em BM0 não há formação aparente de embriões somáticos iniciais, apenas pro-embriões. Em culturas cultivadas em meio BM2 35d, observa-se a formação de embriões somáticos em fases iniciais do desenvolvimento sobre a superfície da cultura. BM0 - Meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2µM) BAP e Kin (0,5µM) (fase proliferação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 µM) (fase maturação). Barras: 500µm. _____ 57

Figura 6. Hibridização in situ com a utilização de sondas sense (E-F) e antisense (B-D) de AaSERK em A. angustifolia O sinal de hibridização é observado pela presença da coloração rosa-arroxeadado. A: Cultura em meio de proliferação (BM0); B: Cultura em meio BM2 35d. A seta indica um grupo de células em intensa divisão celular apresentando sinais de hibridização. C: cultura em meio de maturação (BM2 35d) apresentando estruturas semelhantes a embriões iniciais. A seta indica o ápice embrionário, com sinal intenso de hibridização e a ponta de seta indica a células do suspensor as quais estão em processo de degeneração, com sinal menos intenso de hibridização. D: Embriões somáticos apresentando sinal de hibridização apenas nas regiões periféricas do ápice embrionário (ep). Culturas em meio BM0 (E) e em meio BM2 35 dias (F) não apresentaram sinais de hibridização acima do ruído de fundo, quando hibridizados com a sonda sense. ep: ápice embrionário; su: suspensor. BM0 - Meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2µM) BAP e Kin (0,5µM) (fase proliferação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 µM) (fase maturação). Barras: 500µm. Barras: A, C e E: 250µm. B, D e F: 100µm. ____ 58

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenóxiacético

2-DE: eletroforese bidimensional

ABA: ácido abscísico

ADN: ácido desoxirribonucleico; **DNA:** *deoxyribonucleic acid*

AGPs: proteínas arabinogalactanas

AIA: ácido indol -3- acético

Ala: alanina

ANOVA: análise de variância

ARN: ácido ribonucleico; **RNA:** *ribonucleic acid*

Asp: ácido aspártico

BAP: 6-benzilaminopurina

BM: meio de cultura proposto por Gupta e Pullman, 1991

BSA: albumina do Soro Bovino

CBB: azul brilhante de Coomassie

Cc: célula de capa

cDNA: DNA complementar

Ce: célula embriogênica

Cev: célula embriogênica vizinha

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

Cs: célula de suspensor

DAPI: *4'-6-Diamidino-2-phenylindole*

DEPC: dimetil pirocarbonato

DTT: ditioneitol

Glu: ácido glutâmico

HCL: ácido clorídrico

HSPs: *heat shock proteins*

IEF: focalização isoeletrica

JIM: *john Innes Monoclonal*

JIM13: anticorpo monoclonal de arabinogalactana (*beta*)GlcA1->3(*alpha*)GalA1->2Rha

kDa: kilodaltons

Kin: cinetina

LEA: *late embryogenesis abundant*

MALDI Tof/Tof: *matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*

MCP: morte celular programada

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MF: matéria fresca

MO: microscopia ótica

MPEs: massas pró-embriônicas

MS: matéria seca

MW: massa molecular

N: nitrogênio

NAOH: hidróxido de sódio

NPA: ácido naftiltálmico (*naphthylphthalamic acid*)

°C: graus Celsius

PAs: poliaminas

PCIB: *parachlorophenoxy isobutyric acid*

PEG: polietilenoglicol

pI: ponto isoeletrico

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

Put: putrescina

Rpm: rotações por minutos

RT PCR: transcriptase reversa – reação da polymerase em cadeia (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

SDS: dodecil sulfato de sódio

SERK: *somatic embryogenesis receptor kinase*

Spd: espermidina

Spm: espermina

TCA: ácido tricloro acético

TUNEL: *terminal deoxinucleotidil transferase dUTP(Uracil) Nick End Labeling*

v/v: volume/volume

w/v: peso/volume

Zn: zinco

RESUMO

O estudo dos mecanismos do desenvolvimento embrionário em plantas pode ser facilitado pelo estabelecimento de sistemas modelos associados a embriogênese *in vitro*. Avanços no conhecimento básico e aplicações biotecnológicas são decorrentes dos estudos destes sistemas biológicos. Com a finalidade de regular eficientemente a regeneração de plantas por meio da embriogênese somática é importante entender como os embriões somáticos são formados e como este desenvolvimento é influenciado por sinalização endógena ou exógena. O objetivo do presente trabalho foi estudar o padrão de organização morfológica e a histogênese durante o desenvolvimento inicial do embrião somático em *Araucaria angustifolia*, *Pinus sylvestris* e *Picea abies* assim como o perfil de proteínas e o padrão de expressão do gene SERK durante a embriogênese somática em *A. angustifolia*. O modelo de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia* se caracteriza pela formação de culturas embriogênicas a partir de embriões zigóticos imaturos que proliferam na forma de massas pró-embriônicas (MPEs). Embriões somáticos desenvolvem-se a partir das PEMs por meio da retirada de fitorreguladores e pela suplementação de ABA, PEG e Maltose. A transição das MPEs para embriões somáticos é um dos pontos críticos observados e diversas anormalidades morfológicas são observadas. A morte celular programada (MCP) ocorre nos primeiros estádios finais da embriogênese não nos estádios iniciais do desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*. Células embriogênicas e células do suspensor são eliminadas durante o início da embriogênese final por meio da MCP caracterizada pela autofagia. As proteínas arabionogalactanas (AGPs) são marcadores espaciais e temporais da morte celular em embriões somáticos de *A. angustifolia*. O epítipo JIM 13 foi detectado principalmente em células do suspensor em processo de degradação. Foi utilizado, como modelo comparativo, o sistema de embriogênese somática em *P. abies* para estudar o efeito do ABA na morfologia e MCP durante os estádios iniciais de desenvolvimento de embriões somáticos em *P. abies* visando melhor entender as anormalidades morfológicas observadas em *A. angustifolia*. O tratamento com ABA durante os estádios iniciais da embriogênese induz morfologias anormais do embrião e um aumento da frequência de células TUNEL positivas embrionárias e de suspensor. O Fluoridone promove a diferenciação dos estádios iniciais do desenvolvimento dos embriões somáticos em *P. sylvestris*. No entanto os estádios tardios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *P. sylvestris* mantêm a capacidade autoreplicativa. Foi caracterizado o perfil de expressão de proteínas durante a fase pró-embriônica, embriogênese inicial e final do embrião somático de *A. angustifolia* por meio da análise em eletroforese bidimensional (2-DE). Foram identificadas proteínas que apresentaram expressão diferencial durante os distintos estádios. Proteína de reserva vicilina foi observada em embriões somáticos no início da embriogênese final de forma similar ao observado na embriogênese zigótica. A expressão do gene SERK foi avaliada durante a fase de pró-embriônica e embriogênese inicial e sua expressão foi detectada, por meio de hibridação *in situ*, em células do ápice embrionário em meio de cultura suplementado com ABA, PEG e maltose. Os resultados aqui obtidos ampliam a base científica para aprofundar a compreensão dos fatores associados a biologia do desenvolvimento embrionário em coníferas e a embriogênese somática em *A. angustifolia*. O estabelecimento de um protocolo completo de embriogênese somática em *A. angustifolia* se configura em uma ferramenta para o estabelecimento de programas de conservação e melhoramento de germoplasma desta conífera nativa.

ABSTRACT

The study of the mechanisms involved during embryonic development in plants can be facilitated by the establishment of *in vitro* systems of plants embryogenesis models. Biotechnological advances in the basic knowledge and applications are decurrent of the studies of these biological systems. In order to efficiently regulate the formation of plants via somatic embryogenesis it is important to understand how somatic embryos develop and how the development is influenced by endogenous and exogenous signals. The aim of the present work was to study the morphological organization and histogenesis during the early development of somatic embryo in *A. angustifolia*, *Pinus sylvestris* and *Picea abies* as well as to study the protein profile and expression of gene SERK during somatic embryogenesis in *A. angustifolia*. The pathways of somatic embryos development in *A. angustifolia* was characterized by the extrusion of embryogenic cultures from immature zygotic embryos that proliferate like pro-embryonic masses (PEMs). Somatic embryos develop from PEMs by the withdrawal of plant growth regulators and plus of ABA, PEG and Maltose. The transition of the PEMs for somatic embryos is one of the critical points observed and diverse morphological abnormalities in somatic embryos were observed. The programmed cell death (PCD) occurs at the beginning of late embryogenesis and not in the early embryogenesis of somatic embryos in *A. angustifolia*. Embryogenic and suspensor cells are eliminated during the beginning of late embryogenesis through autophagic PCD. Arabionogalactanas proteins (AGPs) are time and space markers of cell death in somatic embryos of *A. angustifolia*. Epítopo JIM 13 was detected mainly in suspensor cells which started the degradation process. It was used, as comparative model, the somatic embryo development in *P. abies* to study the effect of ABA in the morphology and MCP during early somatic embryo development aimed to understand the morphologic abnormalities observed in *A. angustifolia*. The ABA treatment during the early embryogenesis induces abnormal morphologies of the somatic embryo and increases the frequency of TUNNEL positive cells. The Fluoridone promotes the embryo differentiation during early embryogenesis in *P. sylvestris*. However late somatic embryos keeping autoreplicative capacity. The profile of protein expression was characterized during the pro-embryonic, early and late phase of somatic embryo development in *A. angustifolia* by the bidimensional eletroforese analysis. Proteins had been identified and diferente level of expression was observed during distinct steps. Vicilin storage protein was observed in somatic embryos at the beginning of late embryogenesis similar with what was observed in zygotic embryogenesis. The expression of gene SERK was evaluated during proembryonic phases and early embryogenesis and its expression was detected, by *in situ* hibridization, in cells of the embryonic apex when the culture medium was supplemented with ABA, PEG and maltose. These results extend the scientific basic and help to understanding the biology of embryonic development in conifers and somatic embryogenesis in *A. angustifolia*. The establishment of somatic embryogenesis protocol to the *A. angustifolia* is an auxilliary tool for the germoplasm conservation and breeding programs for this native conifer.

CAPÍTULO II

Análise proteômica durante a embriogênese somática de *A. angustifolia*

3.1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos diversos estudos vêm sendo realizados buscando caracterizar a dinâmica de proteínas durante o desenvolvimento vegetal, associado à caracterização do genoma e transcriptoma (Chen & Harmon 2006; Gallardo *et al.*, 2007; Baginski, 2009). A análise proteômica pode gerar informação relevante para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de desenvolvimento (Rossignol *et al.*, 2006). Para algumas espécies de coníferas o padrão de acúmulo de proteínas de reserva durante o desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos é similar e pode ser utilizado como marcador molecular do desenvolvimento embrionário destas espécies (Hakman, 1993). A caracterização do perfil e da dinâmica de proteínas torna possível analisar comparativamente o desenvolvimento do embrião *in vivo* e *in vitro* (Finnie *et al.*, 2002). Neste sentido, também análises relacionadas ao metabolismo de proteínas, aminoácidos e hormônios tem sido utilizados para estabelecer marcadores bioquímicos e moleculares para estádios específicos do desenvolvimento embrionário em espécies florestais (Silveira *et al.*, 2004a,b; Tun *et al.*, 2006; Santa Catarina *et al.*, 2006; Steiner *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2007; Steiner *et al.*, 2008).

As principais proteínas presentes nas sementes são as proteínas LEA e proteínas de reserva. As proteínas LEA são sintetizadas após a histodiferenciação do embrião e conferem tolerância a desidratação que ocorre no final do desenvolvimento da semente (Bewley & Black, 1994; Sallandrouze *et al.*, 2002). As proteínas de reserva são responsáveis pelo suprimento de N orgânico e de aminoácidos durante a germinação e crescimento da plântula para a síntese de proteínas estruturais e enzimáticas, essenciais para o metabolismo celular normal (Higgins, 1984; Shewry *et al.*, 1995). Proteínas de reserva também tem sido consideradas marcadores do processo de maturação em embriões zigóticos de gimnospermas e angiospermas (Dunstan *et al.*, 1998). Nas coníferas, tanto

embriões somáticos quanto embriões zigóticos acumulam proteínas de reserva em abundância durante a fase de maturação dos embriões (Hakman *et al.*, 1993).

A dinâmica de proteínas nos sistemas biológicos é influenciada por vários fatores internos e externos. A análise proteômica permite avaliar mudanças simultâneas e classificar o padrão temporal de acúmulo de proteínas que ocorrem durante os processos de desenvolvimento, entre os quais a embriogênese (Skylas *et al.*, 2000; Bove *et al.*, 2001).

Estudos referentes ao controle do processo de maturação em embriões somáticos requerem um melhor entendimento das mudanças estruturais nos tecidos ativos na acumulação de substâncias de reserva (Hakman, 1993; Lippert *et al.*, 2005), assim como a identificação de proteínas marcadoras para situações específicas, tais como a diferenciação celular e respostas celulares a estímulos externos diversos (Wilkins *et al.*, 1997).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar e caracterizar o perfil de expressão de proteínas por meio da análise proteômica durante diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

As análises proteômicas foram realizadas durante três diferentes estádios de desenvolvimento (pró-embrionário, embriogênese inicial e final) do embrião somático de *A. angustifolia*. Foram utilizadas culturas embriogênicas induzidas a partir de embriões zigóticos imaturos no período 2006/2007. O estádio pró-embrionário foi proveniente da etapa de proliferação. Os estádios embrionário inicial e embrionário tardio, foram provenientes de dois períodos da etapa de maturação (30 e 60 dias após a inoculação, respectivamente) sendo armazenadas em freezer (-20°C) até a posterior utilização nas análises.

Durante a etapa de proliferação as culturas embriogênicas foram subcultivadas com intervalos de 20 dias em meio de cultura BM (Gupta & Pulman, 1991) suplementado com L-glutamina (1 g.L⁻¹), mio-inositol (1 g.L⁻¹), caseína hidrolisada (0,5 g.L⁻¹) e sacarose (3% p/v), 2,4-D (2µM), BAP e Kin (0,5µM cada). Durante a etapa de maturação as culturas embriogênicas foram inoculadas em placas de petri contendo 25 mL de meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) acrescido de PEG 4000 (7%), maltose (9% v/v), carvão ativado 1,5 g.L⁻¹ e ABA (150µM). A L-glutamina (1 g.L⁻¹), mio-inositol (1 g.L⁻¹), caseína hidrolisada (0,5 g.L⁻¹) e o ABA foram filtro-esterelizados e adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem. Em todas as etapas o pH do meio de cultura foi ajustado para 5.8 com NaOH (0,5N) e HCl (0,5N) antes da adição do phytigel (2,5 g/L⁻¹). As culturas foram mantidas no escuro a uma temperatura de 25 ± 2°C.

3.2.2. Extração e quantificação de proteínas

O experimento foi conduzido utilizando-se três amostras de 500 mg de matéria fresca (MF) de cada estágio de desenvolvimento dos embriões. A extração foi realizada de acordo com metodologia descrita por Natarajan *et al.* (2005). As amostras foram maceradas em 1,2 mL de tampão de extração Uréia/Tiouréia contendo Uréia (7M), Tiouréia (2 M), ditioneína (DTT) (1%), Triton 100 (2%), Pharmalyte[®] (GE Healthcare[®]) (0,5%), Fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF) (1 mM) e Pepstatina (5 µM). Após, as amostras foram agitadas em vortex por 5 min e, posteriormente, centrifugadas por 5 min a 12000 g a 4°C. O sobrenadante contendo a fração protéica foi coletado e armazenado a -20°C até a quantificação de proteínas e preparação dos géis bidimensionais. Impurezas foram removidas dos extratos protéicos através da precipitação com ácido tricloroacético (TCA) (100%) de acordo com Silveira *et al.* (2007). Amostras foram incubadas em 10% v/v de TCA (100%) durante 30 min. a 4°C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 8 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi submetido a três lavagens com acetona gelada intercaladas por centrifugações a 10.000 g por 5 min a 4°C. Após a última lavagem a acetona foi descartada com cuidado e o tubo de polipropileno (1,5 mL) foi mantido aberto para secagem do “pellet” ao ar por pelo menos 3 min, até o tubo de polipropileno secar. Em seguida o *pellet* foi solubilizado em 200µl de tampão de extração uréia/ tiouréia (Natarajan *et al.*, 2005) e centrifugado a 10000g por 5 min. a 4°C. O sobrenadante contendo a fração protéica foi coletado e armazenado a -20°C até o momento da análise em gel 2-DE. Foram preparados três géis para cada amostra. A concentração de proteínas foi determinada utilizando o método do 2D-Quanti Kit (GE-Healthcare[®]). Albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão.

3.2.3. Eletroforese bidimensional (2-DE)

Alíquotas do extrato protéico contendo 200 µg de proteína foram concentradas através da precipitação em TCA 10% (v/v) conforme descrito no item 2.2.2. O “pellet” resultante foi solubilizado em 375 µL de tampão de reidratação (Uréia (7M), Tiouréia (2 M), CHAPS (2%), (gradiente de proteínas imobilizado) IPG Buffer (pH 4-7) (0,5%), DTT (1%) e azul de bromofenol (0,002%). Amostras foram aplicadas em tiras de gel IPG (gradiente imobilizado pH) 11 cm com escala linear de separação, pH 4-7 (GE Healthcare[®]) e mantidas em reidratação por 12 h a 20 °C em IPGphor II (GE Healthcare[®]). Após reidratação, foi iniciada a focalização isoeétrica (IEF) em uma unidade IPGPhor (GE-Healthcare[®]), a 20 °C com corrente elétrica limitada a 50 mA/IPG. O ajuste de voltagem foi de 500 V a 0.5 kVh, 1.000 V a 0.8 kVh, 8.000 V a 13.5 kVh e 8.000 V a 20 kVh conforme recomendação do fabricante. Antes de iniciar a análise em segunda dimensão, as tiras de gel IPG foram reduzidas por 20 min em 3 mL de tampão de equilíbrio (Tris-HCl (50mM), Uréia (6M), glicerol (30%), SDS (2%), azul de bromofenol (0,002%) contendo DTT (125mM), seguido de alquilação por 20 min em 3 mL de tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida (125 mM). A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 12%, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Foi utilizado o sistema Protean II (Bio-Rad[®]), acoplado a um sistema de resfriamento MultitempII (GE-Healthcare[®]) a 15°C. A separação eletroforética foi conduzida a 12.5 mA/gel por 50 min e 25 mA/gel até o Azul de Bromofenol atingir a base inferior do gel. Marcador de peso molecular (Bio-Rad[®]) com 6 bandas de proteína entre 14 e 94 kDa foi utilizado como padrão.

As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com Comassie de acordo com Westermeier *et al.* (2002). Os géis foram incubados durante uma noite em solução de fixação contendo metanol (50%), ácido acético (12%) e água destilada (38%). Após, os

géis foram incubados por 12 h em solução de Azul de Coomassie Coloidal G-250 em tiosulfato de sódio (0,02%) seguidos de três lavagens de 1 min em H₂O Milli-Q. Após, os géis foram submergidos em Tris base 0,1M com pH 6,5 por 3 min e incubados com sulfato de amônio 20%. Os géis foram descorados com ácido acético 1% (v/v) e armazenados em ácido acético (1%) até a análise de imagens.

3.2.4. Análise do gel

Os géis foram digitalizados com Image Scanner (GE-Healthcare[®]) e analisados no programa Image Master Platinum (GE-Healthcare[®]). Foi utilizado o termo “*spot*” para designar peptídeos observados nos géis. A autenticidade e o contorno de cada “*spot*” de proteína foram validados e editados por inspeção visual em todas as repetições de cada estágio de desenvolvimento. Avaliou-se o número, a porcentagem de volume e distribuição dos “*spots*”. As proteínas foram consideradas diferencialmente expressas quando exibida uma variação de ± 2 vezes e foram consideradas significativas pelo teste Tukey com 95% de significância.

Para visualizar a diferença de expressão dos volumes nos diferentes estádios da embriogênese, foi construída uma matriz de similaridade das proteínas identificadas durante as diferentes fases da embriogênese com base na distância euclidiana, usando o software GENESIS (versão 1.7.2 Graz University of Technology, Institute for Genomics and Bioinformatic, Áustria, (www.genome.tugraz.at)).

3.2.5. Digestão dos spots

A metodologia seguida para a digestão com tripsina foi descrita por Westermeier *et al.* (2002). Os “*spots*” foram manualmente recortados géis e colocados em tubos de polipropileno de 0,5 mL. Foi adicionada a solução de descoloração com acetonitrila (50%)

e bicarbonato de amônio (25 mM) por 1h na temperatura ambiente ou até a remoção do corante. As amostras foram desidratadas com acetonitrila (100%) por 2 min e mantidas em bomba de vácuo 5 min. Para reidratação foi utilizado 10 µL de solução de tripsina (10 µg.mL⁻¹ de Tripsina Promega, Madison, USA) em bicarbonato de amônio (25mM), pH 8. A digestão foi realizada durante a noite a 37°C. Para a remoção dos peptídeos do gel adicionou-se 30 µL de solução de extração (50% acetonitrila, 5% Trifluoracético - TFA), homogeneizado no vortex por 30 min a temperatura ambiente e o homogenizado foi coletado em novos tubos tipo eppendoff de 500 µL.

3.2.6. Análise em espectrômetro de massa e interpretação dos dados

A identificação de proteínas foi realizada no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, com a colaboração do Prof. Dr. Emmanuel Maltempi e Prof. Dr. Luciano Huergo.

O volume obtido foi seco e depois hidratado com 2 µL da solução (4% TFA (2,5%), 75% acetonitrila (100%), 21% de água ultra pura). Foi misturado 1 µL dos peptídeos contendo TFA com 1 µL da matriz saturada (ácido α-ciano-4- hidroxibenzóico, Sigma) e aplicado na placa leitora. Os espectros MS e MS/MS foram determinados no espectrômetro de massa MALDI Tof/Tof (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) (Ultraflex, Bruker Daltonic). O equipamento foi calibrado com padrão interno de peptídeos II (Sigma). Os espectros MS e MS/MS gerados foram analisados usando o programa Flex Analysis (Bruker Daltonics). As massas dos peptídeos foram utilizadas para buscas na base de dados NCBI e SwissProt utilizando Mascot *on line* (matrixsciences.com). Os parâmetros utilizados para a aceitação da identificação foram: taxonomia: plantas verdes; enzima: tripsina; clivagem perdida: 1; modificações variáveis:

carbamidometil; modificações fixas: Oxidação Metionina; tolerância de massa do peptídeo: 100 ppm e tolerância de massa do fragmento: 0,6 Da.

3.2.7. Análise estatística

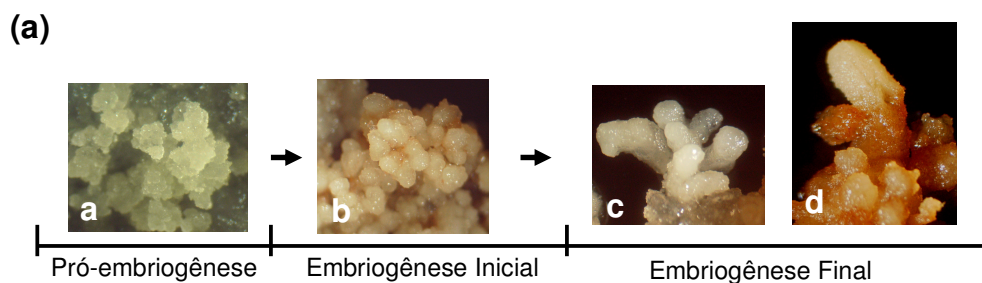
Todos os tratamentos dos experimentos da cultura *in vitro* foram realizados em triplicata. Também foram realizadas triplicatas de géis 2-DE para cada estágio de desenvolvimento do embrião. Somente foram avaliados “spots” presentes nos três géis sendo assim considerados reproduzíveis.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos

A embriogênese somática em *A. angustifolia* se inicia com a formação de PEMs constituídos por um grupo de células embriogênicas conectadas a células de suspensor o que constitui a fase pró-embriônica (Figura 1a). Após 30 dias no tratamento de maturação os proembriões se tornam individualizados das PEMs pelo alongamento do suspensor e estabelecimento da polaridade (Figura 2b). Nesta etapa os fitorreguladores, são completamente retirados do meio de cultura, o qual foi então suplementado com ABA, maltose e PEG. Nestas condições após 60 dias de cultura observou-se a formação de embriões em estádios tardios do desenvolvimento em que o ápice torna-se coeso e o suspensor em degeneração (Figura 2c,d). O perfil proteico em géis bidimensionais correspondeu a estas três fases do desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*.

Padrão de desenvolvimento de embriões somáticos em *A. angustifolia*



Tratamentos e pontos de coleta das amostras

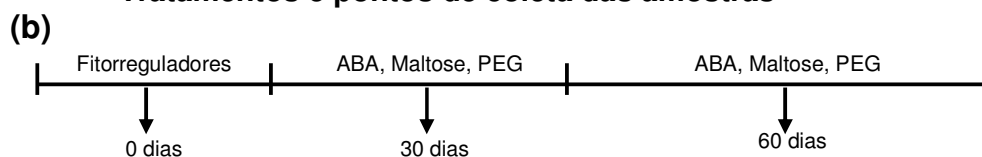


Figura 1. (a) Padrão de desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia* correspondentes aos estádios de desenvolvimento utilizados neste estudo. (b) Tratamentos e períodos de coleta das amostras correspondente as diferentes fases do desenvolvimento do embrião somático (a). Amostra 1 (0 dias) - cultura embriogênica proveniente da etapa de proliferação em meio de cultura BM (Gupta & Pullmann, 1991) suplementado com 2,4-D (2 μ M), BAP e Kin (0,5 μ M cada) contendo predominantemente pró-embriões somáticos. Amostra 2 (30 dias) - culturas embriogênicas coletadas após 30 dias de subcultivo em meio de cultura BM (Gupta & Pullmann, 1991) suplementado com ABA (150 μ M), Maltose (9% p/v) e PEG (7%p/v) isento de fitorreguladores contendo embriões somáticos em estádios iniciais do desenvolvimento. Amostra 3 (60 dias) - culturas coletadas após 60 dias de cultivo nas mesmas condições da amostra 2 contendo embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento.

3.3.2. Conteúdo de proteínas e perfil protéico em géis bidimensionais

A concentração de proteínas totais aumentou durante os diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático (Figura 2). Pequenas variações não significativas na concentração de proteínas durante a fase pró-embriônica e embriogênese inicial foram observadas. Já durante a embriogênese final foi a concentração de proteínas foi o dobro comparativamente aos estádios iniciais (Figura 2). Nesta mesma espécie, ao longo da embriogênese zigótica foi também observado um acúmulo de proteínas nos estádios

tardios do desenvolvimento (Balbuena *et al.*, 2009), corroborando assim os resultados do presente trabalho. Além disso, durante os estádios iniciais do desenvolvimento grande parte de proteínas são expressas continuamente devido a alta demanda de proteínas envolvidas no processo de divisão celular (Gallardo *et al.*, 2003).

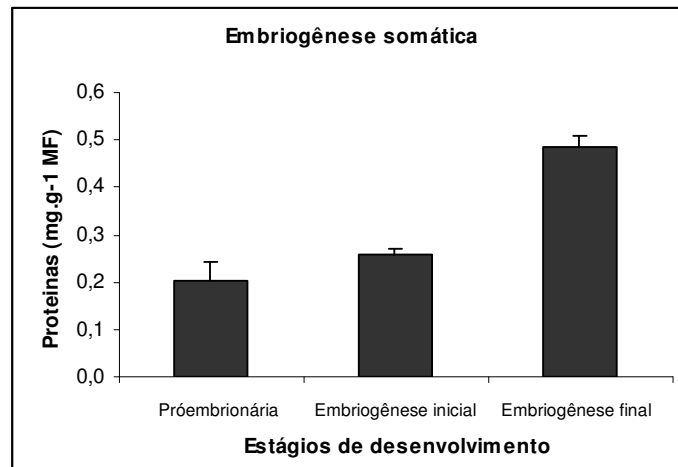


Figura 2. Conteúdo de proteínas da fase pró-embriônica, embriogênese inicial e embriogênese final durante o desenvolvimento do embrião somático de *A. Angustifolia*. Barras verticais sobre colunas representam \pm desvio padrão da média.

O mapa 2-DE apresentou diferentes perfis de proteínas durante o desenvolvimento embrionário, evidenciando alterações na expressão relacionadas ao número de polipeptídeos em diferentes classes de peso molecular e ponto isoelétrico (Figura 3). Observou-se um aumento do número de proteínas de alto peso molecular e uma diminuição de proteínas de baixo peso molecular durante o desenvolvimento dos embriões somáticos (Figura 3). Todos os estádios de desenvolvimento avaliados apresentaram predominância de proteínas com peso molecular entre 20 kDa e 60 kDa. Nas coníferas, as proteínas de reserva possuem peso molecular entre 55 e 60 kDa, que em condições desnaturantes podem resultar em polipeptídios com peso molecular entre 22 e 42 kDa (Hakman, 1993). O incremento da expressão de proteínas com alto peso molecular é

fundamental para o desenvolvimento embrionário e isto se relaciona com atividades de manutenção e reserva, enquanto que proteínas de baixo peso molecular estão relacionadas a processos de síntese manutenção do metabolismo (Vensel *et al.*, 2005).

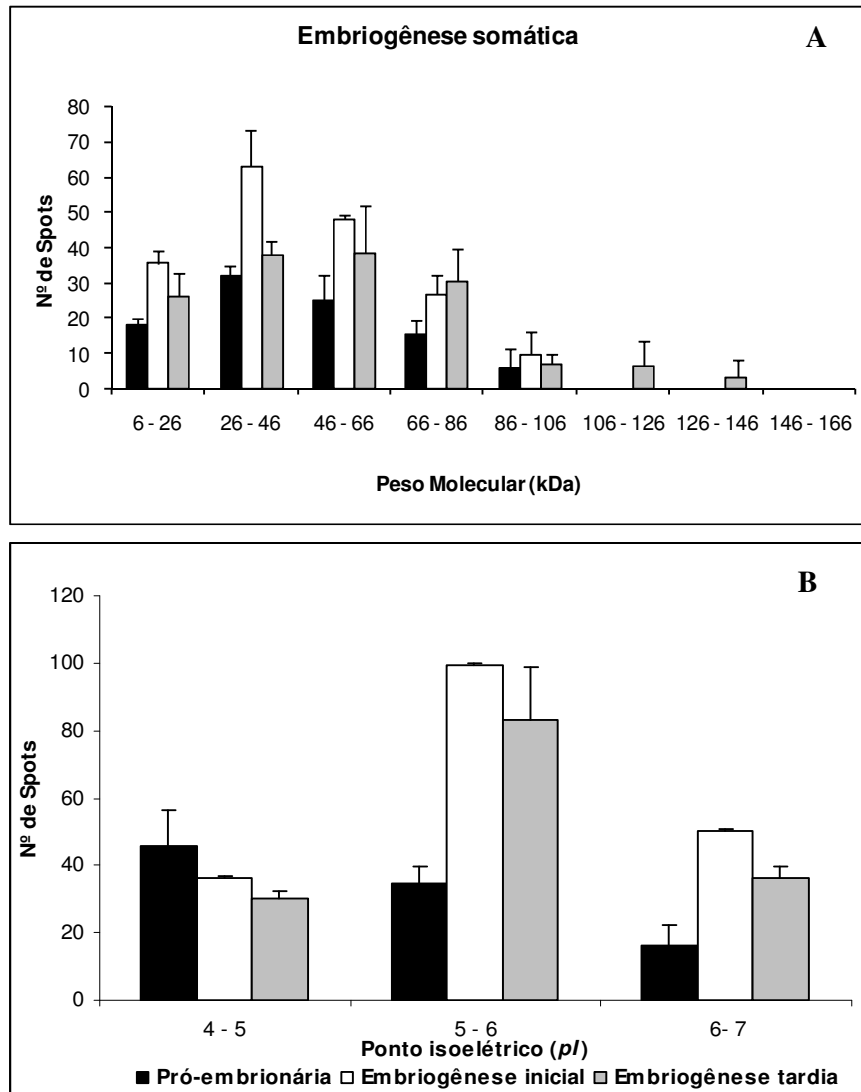


Figura 3. Distribuição do número médio de “spots” de acordo com o parâmetro peso molecular (Kda) e ponto isoelétrico (pI) no gel 2-DE dos estádio de pró-embriônico, embriogênese inicial e embriogênese taradia durante o desenvolvimento do embrião somático de *A. Angustifolia*. Valores foram obtidos dos spots presentes nas três repetições de cada estádio. Barras verticais sobre colunas representam \pm desvio padrão da média.

A análise do perfil 2-DE das diferentes fases de desenvolvimento durante a embriogênese somática de *A. angustifolia* revelou a dinâmica de proteínas envolvidas no desenvolvimento do embrião (Figura 4). Evidenciou-se a presença de proteínas específicas e comuns durante o processo de desenvolvimento (Figura 5).

O número de “spots” detectados nos diferentes estádios de desenvolvimento da embriogênese somática foi de 117 polipeptídeos no estágio de pró-embriônico, 209 durante a embriogênese inicial e 168 durante a embriogênese final (Figura 3). A análise comparativa durante a embriogênese somática demonstrou que um grande número de proteínas foram observadas exclusivamente em cada estágio de desenvolvimento, com 38, 123 e 88 polipeptídeos presentes especificamente nos estádios pró-embriônico, embriônico inicial e tardio, respectivamente (Figura 3). Foram observados 37 polipeptídeos comuns aos estádios de desenvolvimento analisados; 61 polipeptídeos foram comuns aos estádios de pró-embriônico e embriônico inicial; 62 comuns aos estádios embriônicos inicial e tardio e 55 comuns aos estádios pró-embriônico e tardio (Figura 5).

A análise proteômica da embriogênese zigótica de *A. angustifolia* evidenciou 426, 425 e 353 “spots” no estágio pró-embriônico, globular e torpedo, respectivamente (Balbuena *et al.*, 2009). Assim, evidenciou-se no presente trabalho um baixo número total de spots em todos os estádios de desenvolvimento comparativamente ao outro trabalho com a mesma espécie. Esta diferença pode ser explicada por dois aspectos (i) as proteínas presentes no megametófito foram analisadas em conjunto com o embrião zigótico no trabalho de Balbuena *et al.* (2009); (ii) a utilização, no referido trabalho, de Nitrato de Prata que confere sensibilidade maior na coloração de proteínas comparativamente ao Corante Comassie Brilliant Blue (Westermeier *et al.*, 2002).

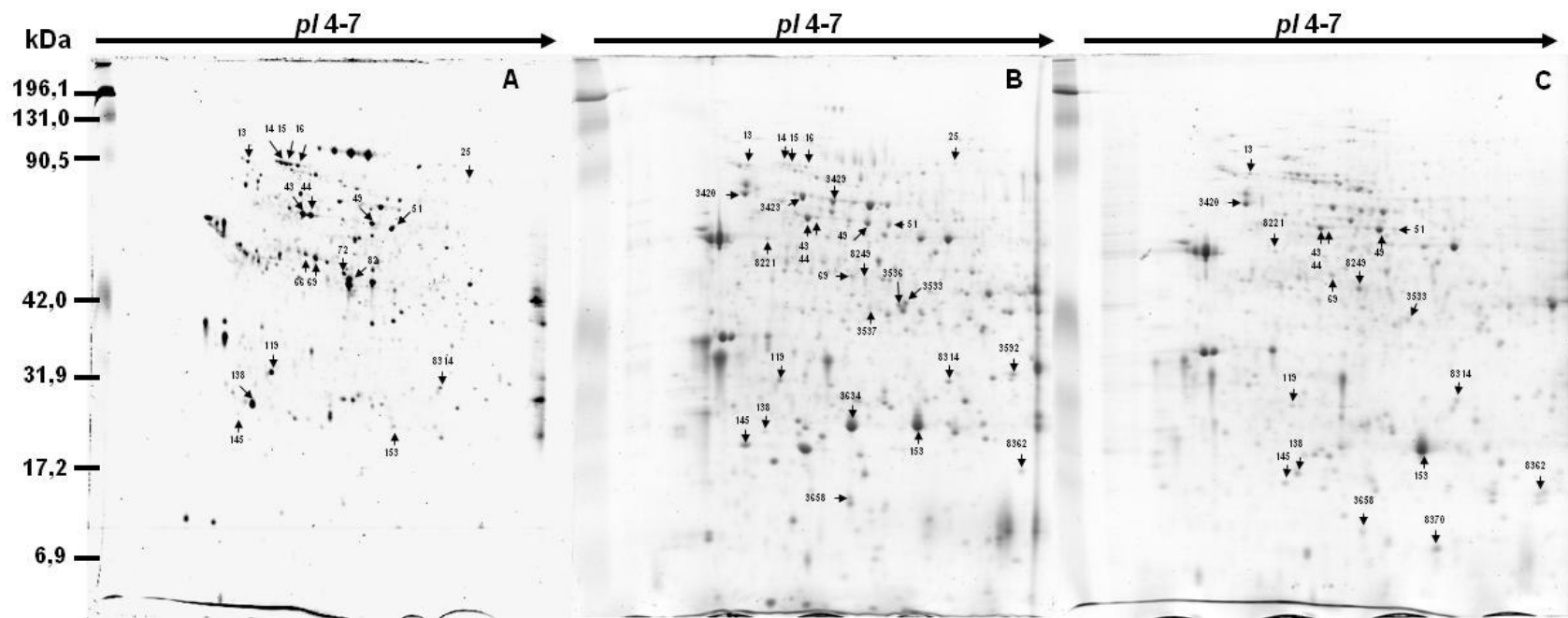


Figura 4. Perfil 2-DE da fase pró-embriônica (A), embriogênese inicial (B) e embriogênese final (C) durante o desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*. As imagens representam o perfil de proteínas expressas a partir das amostras coletadas durante a proliferação (0 dias), maturação (30 e 60 dias). O gradiente de pH e a posição dos marcadores de peso molecular estão indicados no topo e lado esquerdo das imagens, respectivamente. Os números indicados nos géis se referem as proteínas identificadas durante as diferentes fases de desenvolvimento do embrião, as quais estão especificadas na Tabela 1. Os mesmos números em diferentes géis representam a mesma proteína. Números únicos representam proteínas específicas.

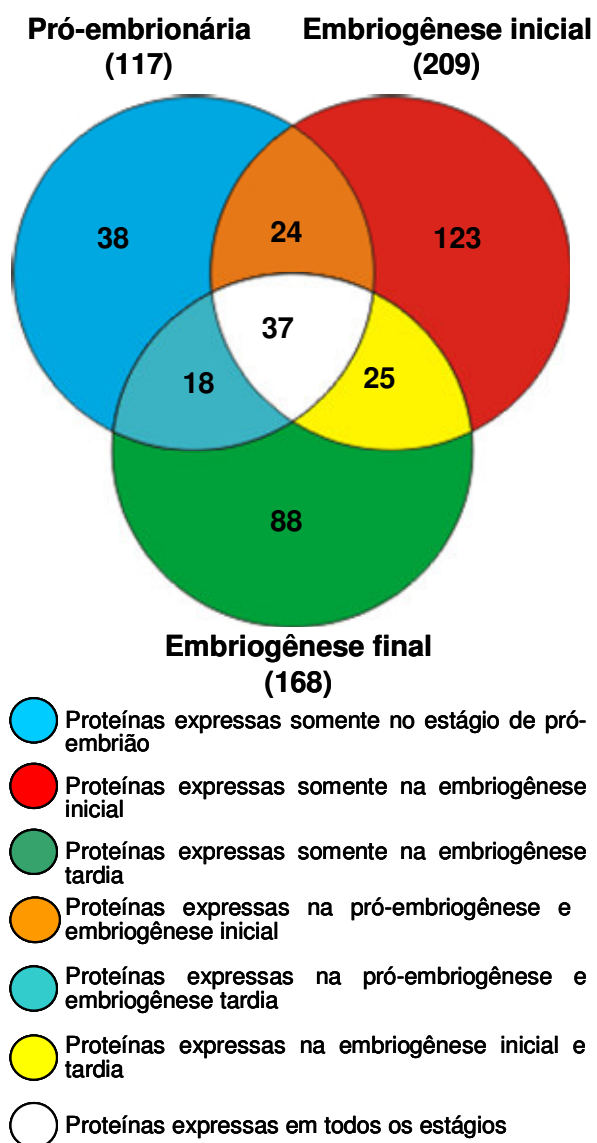


Figura 5. Expressão diferencial de proteínas, em número de “spots”, entre a fase pró-embrionária, embriogênese inicial e embriogênese final durante o desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*. Valores entre parêntesis representam o número total de spots em cada fase. Valores foram obtidos a partir do gel sintético contendo somente os spots presentes nas três repetições de cada estágio.

3.3.3. Identificação e perfil de expressão de proteínas

Apesar do número de “spots” observados nas diferentes fases do desenvolvimento do embrião somático e do fato da *A. angustifolia* não apresentar o genoma seqüenciado, no presente trabalho foram identificadas 35 proteínas durante as diferentes fases analisadas (Tabela1). A classificação funcional destas proteínas foi a agrupada de acordo a base de dados do “*gene ontology*” de acordo com os processos biológicos e componentes celulares (Figura 7). A classe mais representativa das proteínas identificadas foi a aquela relacionada com o metabolismo de carboidratos com 11,1% (Figura 7a). Com relação aos componentes celulares a mitocôndria (16,7%) seguida do núcleo e o proteassomo (13,9%) foram as organelas mais envolvidas (Figura 7b).

Avaliando a expressão diferencial através do critério percentagem de volume dos spots e com base na similaridade do padrão de expressão, foram estabelecidos três principais grupos durante as diferentes fases do desenvolvimento do embrião somático para as proteínas identificadas (Figura 6). As proteínas com maior expressão durante a fase pró-embriônica foram agrupadas no Grupo A, aquelas maior expressão durante a embriogênese inicial foram agrupadas no Grupo B e aquelas com maior expressão durante a embriogênese final foram agrupadas no Grupo C (Figura 6).

No grupo A foram detectadas observadas algumas proteínas como, por exemplo, actina (spot 66), ascorbato peroxidase (spot 138), ATP sintase (spot 44), enolase (spot 119), proteína sintase glucano α 1,4, proteína de ligação luminal (spot 14, 15, 16) e proteína de choque térmico (spot 13) (Tabela 1). Estas proteínas estão associadas tanto aos eventos de transdução de sinais, metabolismo de carbono, resposta a estresse quanto aos mecanismos de divisão celular (Alberts, 2006). A fase pró-embriônica pode ser caracterizada especialmente pela presença de proteínas envolvidas em divisão celular (Gallardo *et al.*, 2003), uma vez que nesta fase ocorre intensa proliferação de PEMs. Em

A. angustifolia, também durante esta etapa, foi observada a presença de grânulos de amido tanto em células embrionárias quanto em células de suspensor durante o processo de proliferação das PEMs (Steiner, 2005) o que certamente justifica a presença de proteínas relacionadas ao metabolismo de carbono. A proteína sintase glucano α 1,4, observada durante a embriogênese inicial, está envolvida na síntese de polissacarídeos de parede celular (Alberts, 2006). Já, a actina é considerada uma proteína altamente conservada e é essencial componente do citoesqueleto, na organização e movimento de componentes citoplasmáticos e crescimento (Alberts, 2006). Durante a embriogênese somática de *M. truncatula* a expressão da proteína de choque térmico 70 kDa (HSPs *heat shock proteins*) e a proteína de ligação luminal decresceram após oito semanas de cultivo, demonstrando que alta expressão destas proteínas foi necessária para a manutenção das células durante o crescimento inicial (Imin *et al.*, 2005). Assim a detecção destas proteínas durante a fase pró-embriônica de *A. angustifolia* sugere que as mesmas estão especialmente conectadas aos eventos relacionados à divisão celular.

Durante a embriogênese inicial as proteínas com maior percentagem no volume de expressão reunidas no grupo B incluíram proteína de ligação subunidade rubisco (spot 3423), precursor malato desidrogenase (spot 3533, 3536), adenilato quinase B (spot 3592) e DNA endonuclease (spot 3634) (Tabela 1). Esta fase é caracterizada pelo estabelecimento da polaridade e individualização do embrião a partir das PEMs (von Arnold *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2008). Conforme descrito no Capítulo I do presente trabalho, os embriões somáticos nesta fase de desenvolvimento apresentam uma série de anormalidades especialmente no que diz respeito à manutenção da atividade mitótica e balanço hormonal. A proteína adenilato quinase B tem sido descrita como sendo essencial para a manutenção do crescimento celular em arroz (Kawai *et al.*, 1992), e apresenta alta expressão durante esta fase (Figura 6). Isso pode estar relacionado com as anormalidades

observadas. Além da proteína malato desidrogenase envolvida no metabolismo de carbono, também a presença proteína de ligação subunidade rubisco foi confirmada durante a embriogênese zigótica nesta espécie (Balbuena *et al.*, 2009). Estes autores sugeriram que durante a embriogênese zigótica o aparato fotossintético é diferenciado a partir do estágio de desenvolvimento torpedo que corresponde a embriogênese final.

Já no grupo C, no qual foram detectadas as proteínas com maior expressão durante a embriogênese final observou-se a presença da glutamina sintetase (spot 8249), proteassomo subunidade α tipo 6 (spot 126), foforilase UDP-glucose (spot 49) e a proteína de reserva vicilina (spot 8362) (Tabela 1). Durante esta etapa o ápice embrionário se torna coeso e as células do suspensor são degradadas na medida em que o embrião se desenvolve (Steiner, 2005). As proteínas observadas nesta etapa estão de maneira geral associadas ao metabolismo de carboidratos, síntese de parede celular e a maturação de embriões o qual inclui o acúmulo de compostos de reserva (von Arnold, 2002; Carney & Pullman, 2007). Estes resultados estão de acordo com aqueles observados na análise proteômica da embriogênese zigótica em *A. angustifolia* as quais também apresentaram grupos específicos de proteínas durante as distintas fases de desenvolvimento do embrião (Balbuena *et al.*, 2009). A principal similaridade entre o perfil protéico durante a embriogênese zigótica e somática nesta espécie foi o acúmulo de proteínas de reserva durante a fase de embriogênese final.

A presença das proteínas glutamina sintetase (spot 8249) de reserva vicilina (spot 8362) foram sugeridas como proteínas que poderiam ser associadas aos estádios tardios do desenvolvimento e que esta última poderia ser utilizada como um marcador de qualidade do desenvolvimento dos embriões somáticos de *A. angustifolia* (Silveira *et al.*, 2008, Balbuena *et al.*, 2009). No protocolo de embriogênese somática em *A. angustifolia* previamente estabelecido por Steiner (2005), foram observados baixos números de

embriões somáticos maduros e diversas anormalidades durante a fase pró-embriônica. Apesar disso, no presente trabalho foi observada a presença de proteínas de reserva durante a embriogênese final quando as culturas foram submetidas ao ABA. Em *Picea glauca* a proteína de reserva vicilina somente foi observada após as culturas serem submetidas ao tratamento com ABA (Lippert *et al.*, 2005) corroborando com os nossos resultados.

Durante as fases finais da embriogênese somática em coníferas a síntese das proteínas de reserva e proteínas LEA pode ser estimulada em resposta ao ABA exógeno (Tautorus *et al.*, 1991). O ABA está envolvido na expressão dos genes *lea* que codificam as proteínas LEA. Dong *et al.* (1997) reportaram o aparecimento de diversas novas proteínas em resposta a retirada de fitorreguladores do meio de cultura e a exposição ao ABA em *P. glauca*. Mesmo assim, tem sido observado que apesar de embriões somáticos maduros acumularem substâncias de reserva em resposta ao ABA, estes apresentam anormalidades morfológicas as quais limitam a germinação em *Pinus taeda* (Carney & Pullman, 2007), *Feijoa sellowiana* (Pescador *et al.*, 2008) e *Pinus sylvestris* (von Arnold *et al.*, 2009, dados não publicados). Assim os resultados do presente trabalho sugerem que a presença da proteína de reserva vicilina por si só não indica que a histogênese normal dos embriões somáticos foi estabelecida, mas sim indica que a histogênese e acúmulo de substâncias de reserva são processos que ocorrem durante a embriogênese final, mas podem não acontecerem simultaneamente.

A atividade do complexo proteassomo é associada aos processos de proliferação celular e que decresce quando as células são estimuladas ao processo de diferenciação (Amsterdam *et al.*, 1993). Em *Picea glauca* foi sugerido que o decréscimo ou ausência de atividade do proteassomo pode ser um marcador confiável para estudar o desenvolvimento embrionário, uma vez que foi observado um decréscimo na expressão desta proteína

durante os estádios tardios do desenvolvimento (Lippert *et al.*, 2005). Ao contrário, no presente trabalho foi observado um incremento da proteína proteassomo subunidade α tipo 6 (spot 8314) durante a fase final do desenvolvimento do embrião (Figura 6). Um estudo do desenvolvimento embrionário de galinhas demonstrou que o incremento na atividade de proteassomo está relacionado também a anormalidades durante o desenvolvimento destes embriões (Hutson *et al.*, 1997). Assim, em *A. angustifolia* o incremento na expressão desta proteína durante os estádios tardios pode estar associado ao baixo número de embriões somáticos formados e à ocorrência de suas anormalidades.

O estudo dos diferentes padrões de expressão permite o entendimento da relação entre os diferentes grupos de proteínas com os diferentes eventos durante o desenvolvimento do embrião. Vários estudos nesse sentido foram feitos com diversas espécies, detectando variações nos níveis de expressão de determinadas proteínas, em diferentes condições de cultivo como em *Medicago truncatula* (Imin *et al.*, 2004, 2005), *Picea glauca* (Lippert *et al.*, 2005), *Cyclamen persicum* (Winkelmann *et al.*, 2006) e *Vitis vinifera* (Marsoni *et al.*, 2008). Em embriões somáticos de *Acacia sellowiana* foram detectadas 74 proteínas com diferença de expressão nos estádios de desenvolvimento destes embriões (Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos no presente trabalho se configuram em um conjunto de importante fonte de informação para o entendimento das relações complexas envolvidas no metabolismo e no controle da embriogênese somática em coníferas. Demonstrou-se a expressão diferencial de proteínas durante os estádios iniciais de desenvolvimento da embriogênese somática de *A. angustifolia*. Estas informações contribuem para o entendimento da dinâmica de expressão de proteínas durante desenvolvimento do embrião nesta espécie.

Tabela 1. Lista de proteínas identificadas durante a embriogênese somática de *A. angustifolia*

No. Spot ^a	Nome da Proteína	Espécies com proteínas homólogas	MW/PI ^b		Protein ^c Score%	Seqüência ID peptídeos ^d	Acesso ID ^e
			Obs	Teor			
13	Proteína relacionada choque térmico 70 kDa (HSPs)	<i>Pisum sativum</i>	88.0/4.5	75.6/5.2	46	IINEPTA ASLAYGFER	gil399942
14	Proteína ligação luminal 4 (BiP 4)	<i>Nicotiana tabacum</i>	88.0/4.7	73.7/5.0	46	IKDAVVTV PAYFNDAQR	gil729620
15	Proteína ligação luminal	<i>Spinacia oleracea</i>	87.0/4.8	73.7/5.0	40	DAVVTVP AYFNDAQ	BIP_SPIOL
16	Proteína ligação luminal 5 (BiP 5)	<i>Nicotiana tabacum</i>	86.0/4.9	73.9/5.0	43	DAVVTVP AYFNDAQR	gil729623
25	Possível proteinase subtitilina serina	<i>Musa acuminata</i>	79.0/6.4	79.9/6.6	46	GAHP DWSPGAIK	gil102139846
43	ATP sintase subunidade β , mitocondrial	<i>Arabidopsis thaliana</i>	66.0/4.9	59.8/6.1	38	CALVYGQMNEPPGAR	ATPBM_ARATH
44	ATP sintase subunidade β , mitocondrial	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	65.0/5.05	62.0/5.0	44	IPSAVGY PTLATDLGG LQER	ATPBM_CHLRE
49	Fosforilase UDP-glucose	<i>Pinus taeda</i>	63.0/5.5	53.1/5.2	64	YSGSNIDIHIFN QSQYPR K	gil148887793
51	Fosforilase UDP-glucose	<i>Pinus taeda</i>	61.0/5.7	53.1/5.2	41	YSGSNIDIHIFNQSQYPR M	gil148887793
66	Actina – 42 (fragmento)	<i>Solanum tuberosum</i>	53.0/5.0	37.0/5.4	34	TYEL PDGQVITIGA ER	ACT1_SOLTU
69	Proteína produto não nomeado	<i>Oryza sativa</i>	52.0/5.1	42.2/5.2	73	SYELPDGQVI TIGAER	gil20322
79	Não conhecida	<i>Picea sitchensis</i>	48.0/5.3	39.7/5.9	45	HETA DIHTFSWGVA NR	gil116779848
82	Glucano proteína sintase α 1,4	<i>Zea mays</i>	46.0/5.4	41.2/5.7	41	NLDFLEMWR	UPTG_MAIZE
119	Enolase (fosfoglicerato desidratase)	<i>Solanum lycopersicum</i>	30.0/4.7	48.0/5.6	92	YGQDAT NVGDEGGFAP NIQENK	gil119354
83 14	Proteassomo subunidade α tipo 6	<i>Glycine max</i>	28.0/6.15	27.6/6.1	43	R HITIFSPEGR L	PSA6_SOYBN
138	Ascorbato peroxidase	<i>Pinus pinaster</i>	25.0/4.5	27.4/5.4	99	YAQDEDAF FADYAEHLK	gil39939493

Tabela 1. (continuação)

No. Spot ^a	Nome da Proteína	Espécies com proteínas homólogas	MW/PI ^b		Proteín ^c Score %	Sequência ID peptídeos ^d	Acesso ID ^e
			Obs	Teor			
145	Ascorbato peroxidase	<i>Pinus pinaster</i>	24.0/4.4	27.4/5.4	86	K YAQDEDAFFADYAE AHL K L	gil39939493
153	Não conhecida	<i>Picea sitchensis</i>	23.0/5.7	23.9/5.3	46	K DVGPSLYYIDYIATLHK V	gil116778950
3420	Proteína produto não nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	81.0/4.7	50.7/8.0	50	DDGSGGDQE SR	gil157353266
3423	Proteína de ligação subunidade Rubisco	<i>Arabidopsis thaliana</i>	80.0/5.2	64.1/6.2	61	R GYISPYFVTDSEK M	RUBB_ARATH
3429	Não conhecida	<i>Populus trichocarpa</i>	78.0/5.4	45.1/4.8	50	GYIS PYFITDQK	gil118481051
3442	ATP sintase subunidade β mitocondrial	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	72.0/5.2	62.0/4.9	88	RIPSAVG YQPTLATDLGG LQER I	ATPBM_CHLRE
3533	Precursor malato desidrogenase	<i>Medicago sativa</i>		43.5/8.1	57	GVDV VVIPAGVPRK	gil2827084
3536	Precursor malato desidrogenase	<i>Medicago sativa</i>	46.0/5.9	43.5/8.1	66	GVDV VVIPAGVPR	gil2827084
3537	Precursor malato desidrogenase	<i>Medicago sativa</i>	46.0/5.7	43.5/8.1	66	GVDV VVIPAGVPR	gil2827084
3592	Adenilato quinase B	<i>Oryza sativa</i>	34.0/6.8	26.8/7.6	37	K VPGVDDVTGEPLIQR K	KAD2_ORYSJ
3634	DNA endonuclease	<i>Peperomia polybotrya</i>	26.0/5.6	32.1/9.9	39	MLISGFLVKP R	gil854348
3658	Não conhecida	<i>Picea sitchensis</i>	15.0/5.6	21.0/8.5	50	EAIEF YGDFDGR	gil116791600
8221	Homóloga protease regulatória Subunidade 26S	<i>Arabidopsis thaliana</i>	57.0/4.9	46.8/4.9	51	DSYLI LDTLPSEYDS	gil556560
8249	Glutamina sintetase	<i>Lactuca sativa</i>	47.0/5.5	39.6/5.2	43	HKEH IAAYGEGNER	GLNA_LACSA
43	ATP sintase subunidade β - 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>		59.8/6.2	38	CALVYGQMN EPPGAR	ATPBM_ARATH
8362	Proteína de reserva vicilina	<i>Araucaria angustifolia</i>	16.0/6.8	53.6/7.7	48	NPYVFKEEE QER	gil21913852
8368	Não conhecida	<i>Picea sitchensis</i>	11.0/5.5	21.0/8.5	63	EAIEF YGDFDGR	gil116791600
8370	Fator de iniciação transdução eucariótica 5A-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	9.0/6.0	17.7/5.8	44	TF PQQAGTIR	IF5A2_SOLLC

a - Nº do spot corresponde aos números indicados na Fig 4

b – Massa molecular e PI experimental e teórico

c – Score da Proteína a partir do MASCOT

d – Sequência de peptídeos identificados a partir dos dados MSMS

e – Identificação da primeira proteína usando a base de dados NCBI e SwisProt

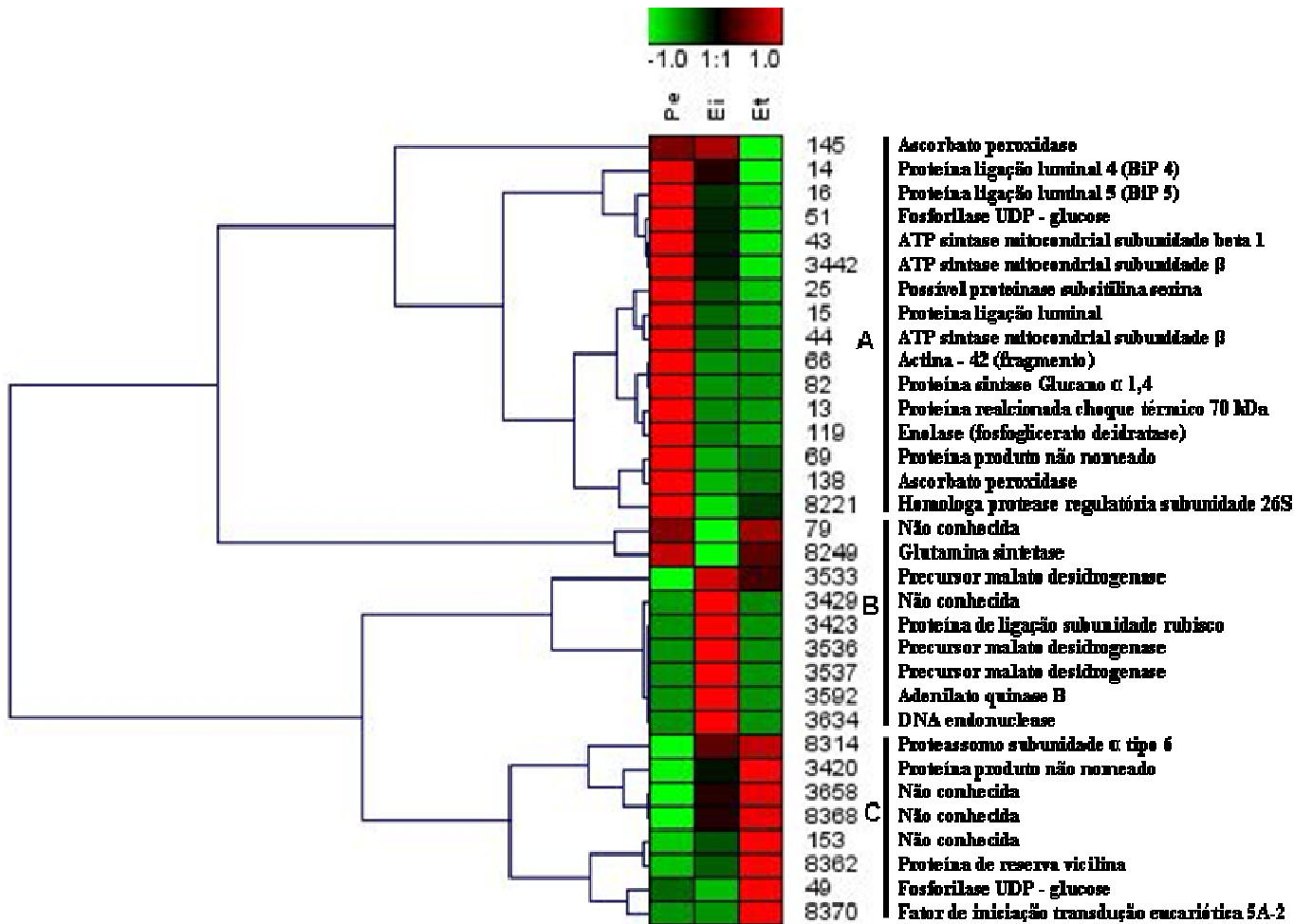


Figura 6. Dinâmica de expressão, com o critério percentagem de volume, das 35 proteínas identificadas durante a fase pró-embriônica, embriogênese inicial e embriogênese final do desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*. Valores obtidos a partir dos géis contendo somente spots presentes em todas as três repetições de cada estágio.

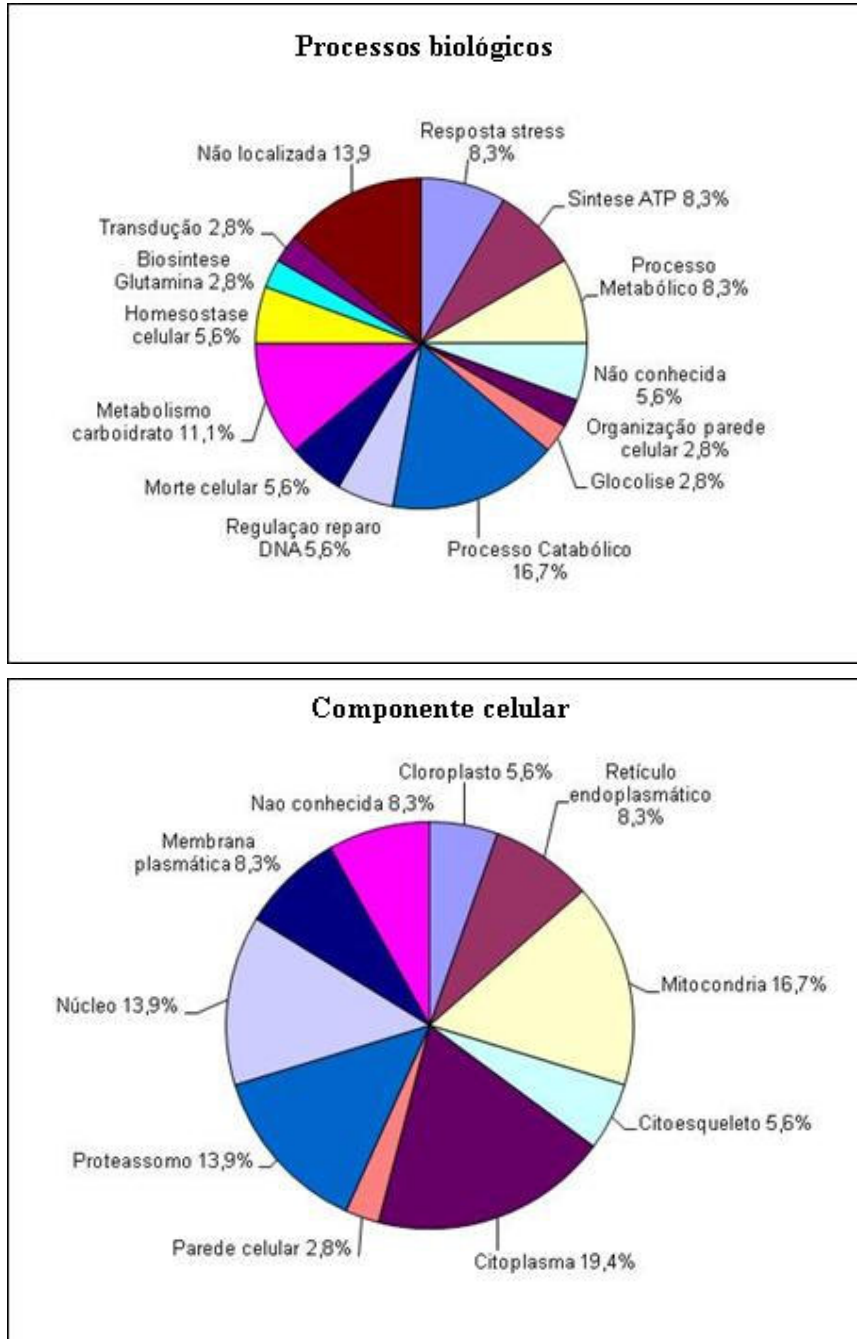


Figura 7. Classificação funcional das proteínas identificadas durante o desenvolvimento do embrião somático de *A. angustifolia*. A classificação funcional de acordo a base de dados do gene ontology (<http://www.expasy.org>)

3.3.4. Conclusões

O estudo da expressão diferencial de proteínas durante a embriogênese é fonte importante de conhecimento para o entendimento das relações complexas envolvidas no

metabolismo e no controle da embriogênese em plantas. O presente estudo demonstrou a expressão de proteínas durante os estádios iniciais de desenvolvimento da embriogênese somática de *A. angustifolia*. Estas informações contribuem para o entendimento da dinâmica de expressão de proteínas durante desenvolvimento do embrião nesta espécie. Foram identificadas proteínas associadas aos diferentes fases da embriogênese incluindo as proteínas relacionadas a histogênese assim como a proteína de reserva vicilina especificamente durante a embriogênese final. Apesar de ter sido observada diversas anormalidades durante o desenvolvimento assim como uma baixa frequência de embriões somáticos maduros foi possível a identificação de proteínas semelhantes aquelas observadas no embrião zigótico desta espécie.

Foi observada uma diferença expressiva de proteínas totais e de número de “spots” nos diferentes estádios de desenvolvimento. Apesar disso, o protocolo para a identificação de proteínas utilizando MSMS, descrito neste trabalho, precisa ser aprimorado. No Brasil, este tipo de protocolo apresenta um gargalo especialmente no que diz respeito a etapa de digestão protéica e obtenção dos espectros de massa. Esta limitação no protocolo assume grande magnitude especialmente para espécies que não possuem o genoma seqüenciado como é o caso de *A. angustifolia*. Apesar disso, trabalhos em colaboração externa ao Brasil, assim como alguns grupos pioneiros desta técnica no Brasil têm obtido sucesso na identificação. Os resultados obtidos no presente trabalho contribuem para que a técnica de proteômica de plantas apresente um aprimoramento compatível com sua importância emergente no Brasil.

CAPITULO III

**Expressão do homólogo do gene SERK em culturas embriogênicas de *Araucaria*
*angustifolia***

4.1. INTRODUÇÃO

As fases da ontogenia associadas a um programa genético e epigenético especificado a partir das primeiras divisões do zigoto resultam no desenvolvimento de um embrião vegetal (Laux & Jürgens, 1997). Durante a embriogênese somática um grupo de células sofre alterações bioquímicas e morfológicas culminando com a formação do embrião, sendo que a expressão gênica é o principal ponto de controle da ontogenia (Rojas-Herrera *et al.*, 2002).

Os processos moleculares que governam a competência para a embriogênese em células vegetais ainda não estão totalmente esclarecidos. A aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário envolve um processo complexo que inclui a desdiferenciação, reativação celular, alterações nos planos de divisões celulares e reprogramação do metabolismo e desenvolvimento (Fehér *et al.*, 2006). O gene “*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*” (*DcSERK*) foi relacionado a expressão da competência celular em cultura de tecidos de cenoura (*Daucus carota*) (Schmidt *et al.*, 1997). O gene *SERK* codifica um receptor transmembrana que contém um domínio intracelular de proteína-Kinase e um domínio extracelular rico em repetições de leucina, pertencente a uma grande e diversificada família de receptores Kinases em vegetais (Becraft, 1998). Em diversas espécies *Arabidopsis* (*AtSERK1*) (Hecht *et al.*, 2001; Salaj *et al.*, 2008), *Dactylis glomerata* (*DgSERK*) (Somleva *et al.*, 2000), *Medicago trunculata* (*MtSERK*) (Nolan *et al.*, 2003), *Theobroma cacao* (Oliveira Santos *et al.*, 2005; Alemanno *et al.*, 2008), *Triticum aestivum* (Singla *et al.*, 2008) e *Vitis vinifera* (Schellenbaum *et al.*, 2008) a expressão de homólogos do gene *SERK* foi associada a aquisição de competência embriogênica. Assim, a expressão do gene *SERK* é considerada como um marcador de células competentes para a formação de embriões somáticos sugerindo a sua utilização

para distinguir células embriogênicas competentes e não competentes para a embriogênese (Suprasanna & Bapat, 2005).

Em agregados celulares de *O. catharinensis* cultivados em diferentes meios de cultura, a expressão do gene *SERK* foi associada à competência embriogênica (Santa Catarina *et al.*, 2004). Neste trabalho, o 2,4-D foi associado à expressão do gene *SERK* e foi observada a existência de populações de células competentes e não competentes no mesmo material.

A indução do gene *SERK* pela auxina foi recentemente descrita para culturas embriogênicas de *M. trunculata* (Nolan *et al.*, 2003). Apesar de este estudo indicar que a embriogênese somática está associada com a alta expressão do gene *SERK*, a auxina isoladamente não induziu a embriogênese, como no caso de cenoura e *Arabidopsis* (Schmidt *et al.*, 1997). Em *M. trunculata* a auxina induziu a formação de raízes, existindo uma regulação positiva do gene *MtSERK1* durante a diferenciação, o que sugere que o mesmo apresenta uma participação mais ampla na morfogênese das culturas (Nolan *et al.*, 2003).

Em *A. angustifolia*, ainda não foi estabelecido um protocolo completo de embriogênese somática e estudos do monitoramento da competência das culturas embriogênicas, para a formação dos embriões somáticos, podem auxiliar na identificação dos aspectos limitantes para a regeneração completa de plantas por meio desta rota morfogênica *in vitro*. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi monitorar a expressão dos homólogos do gene *SERK* em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas a diferentes tratamentos durante a etapa de proliferação e maturação.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

Foram utilizadas culturas embriogênicas de *A. angustifolia* da etapa de proliferação e maturação. Durante a etapa de proliferação foram coletadas amostras do meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) na presença de 2,4-D (2 μ M), BAP e Kin (0,5 μ M) e ausência destes fitorreguladores, denominadas de BM20 e BM00, respectivamente. Durante a etapa de maturação estas amostras foram coletadas após serem submetidas 35 dias ao tratamento com ABA (150 μ M), PEG (7% p/v), Maltose (9% p/v) e foram denominadas de BM2 35d e BM0 35d.

A análise da competência embriogênica das culturas através do monitoramento da expressão do homólogo do gene SERK foi realizada em colaboração com Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas – Instituto de Biologia/UNICAMP.

4.2.2. Extração de RNA

Realizou-se a extração de RNA utilizando-se Trizol. As amostras foram maceradas em graal com nitrogênio líquido e em seguida, transferidas para tubo falcon (15 mL) contendo Trizol, numa relação de 10 mL de trizol para 2 gramas de amostra. A amostra foi agitada até completa homogeneização com o Trizol, seguindo-se a incubação em temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4°C para ajudar na limpeza. A fase superior foi coletada com auxílio de uma pipeta e transferida para tubo falcon de 15 mL novo, onde adicionou-se clorofórmio (temperatura ambiente) numa relação de 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de trizol coletado. Após agitação vigorosa (15 segundos), as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 3 min, e centrifugadas por 3000 rpm, por 15 min, a 4°C. Em seguida, coletou-se a fase

superior (fase aquosa), que foi transferida para tubos eppendorfs de 1,5 mL (colocado 1 mL para cada tubo de polipropileno), onde adicionou-se 600 µL de isopropanol (temperatura ambiente) para cada 1 mL de amostra, misturando-se aproximadamente 20 vezes por inversão. Após 10 min em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas 10.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado com cuidado (para evitar que o “*pellet*” seja deslocado do fundo do tubo), e o “*pellet*” foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado. A amostra foi agitada em vortex por alguns segundos e centrifugada a 6.000 rpm, por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado com cuidado, e o “*pellet*” foi lavado novamente com etanol absoluto gelado. A centrifugação foi repetida, descartando o sobrenadante com cuidado e o tubo de polipropileno foi mantido aberto para secagem do “*pellet*” ao ar por pelo menos 10 min, até o tubo de polipropileno secar. Em seguida, o “*pellet*” foi re-suspendido em 20 µL de água DEPC (dietilpirocarbamato) 1%, sob agitação em vortex, por 15 min.

4.2.3. Quantificação de RNA total

Procedeu-se a quantificação de RNA por espectrofotometria (260 nm) e a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para a quantificação por espectrofotometria, misturou-se 5 µL de amostra concentrada de RNA extraído em 600 µL de água DEPC. Após calibração do aparelho com água DEPC, procedeu-se a quantificação do RNA da amostra.

Para a eletroforese, utilizou-se o gel desnaturante de agarose 1%, onde misturou-se 0,35 g de agarose, 3,5 mL de tampão MOPS 10X (MOPS a 20mM (pH 7,0), acetato de sódio a 8 mM e EDTA a 1 mM (pH 8,0)) e 30 mL de água DEPC (para um total de 35 mL de gel), seguido de aquecimento até dissolver a agarose. Quando esta solução atingiu uma

temperatura de aproximadamente 40 °C, adicionou-se 1,75 mL de formaldeído 37%, em capela, e colocou-se este gel em cuba de eletroforese, estando pronto para uso após a solidificação. A amostra foi preparada utilizando-se 10 µL de tampão de denaturação + 2 µL de amostra de RNA extraído. Esta mistura foi mantida em temperatura de 56 °C, por 15 min. Após este período, a amostra mantida em gelo e foi aplicada no gel em contendo tampão de corrida TAE. A corrida foi realizada em 100V, 60 mA, por 30 min. Em seguida, o gel foi fotografado em luz ultravioleta.

Cada mL do tampão de denaturação é composto de: 100 µL de tampão MOPS 10X; 175 µL de formaldeído; 500 µL de formamida deionizada; 80 µL de brometo de etídio (1 mg/mL); 100 µL de tampão de amostra e 45 µL de água DEPC.

4.2.4. RT-PCR para clonagem de homólogos de SERK

Visando a avaliação dos padrões de expressão de alguns genes marcadores utilizou-se a técnica de PCR reversa (RT-PCR) para a clonagem de genes candidatos. Entre estes marcadores, estão os expressos nas células embriogênicas como o gene *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase* (SERK, Schmidt *et al.*, 1997; Santa-Catarina *et al.*, 2004). Para tal, realizou-se a extração de RNA total de culturas embriogênicas conforme descrição no item 4.4. A produção da primeira fita de cDNA foi realizada com utilização do kit de RT-PCR (Superscript, Invitrogen) e a síntese dos fragmentos correspondentes aos homólogos prováveis dos genes marcadores previstos inicialmente, com a utilização de iniciadores 5' e 3' desenhados a partir de regiões conservadas dos genes mencionados acima (Haecker *et al.*, 2004), a partir de alinhamentos de seqüências homólogas de diferentes espécies. Os iniciadores utilizados foram: SERK5 (5'-ATGGCNTTYGCNTGGTGG-3') e SERK3 (5'-YTCNGANGAYTTNCCNGT-3'). As condições de PCR variaram apenas quanto à temperatura de anelamento dos iniciadores.

Estas temperaturas foram as recomendadas pela empresa responsável pela síntese dos iniciadores (Imprint) e foram: SERK: 51°C por 40 s. As demais condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min e 40 ciclos de 94°C por 40 s; (ciclo de anelamento específico) e 72°C por 1min. Após a PCR, os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e documentados.

A seguir, as bandas foram cortadas do gel e purificadas com o Kit Purê Link Quick Gel extraction (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA assim obtidos foram quantificados e clonados no vetor PCR2.1 (TA Cloning kit, Invitrogen). As construções obtidas foram transformadas em *E. coli* (células eletro-competentes DH5-alfa) e 10 transformantes foram selecionados para posterior análise por seqüenciamento. Dez colônias brancas foram escolhidas de cada experimento de transformação e foram sub-cultivadas para extração de plasmídeos. Os plasmídeos foram extraídos com o Kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen). Após dosagem, uma alíquota das extrações plasmidiais foram testadas para a presença do inserto clonado, mediante digestão com a endonuclease EcoRI e os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose 1%. Após a confirmação da presença do inserto no vetor, amostras de DNA foram enviadas em duplicata para seqüenciamento na concentração de 100ng/ml. Os iniciadores utilizados para o seqüenciamento foram o T7 (forward) e M13 (reverso). O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) do CENA/USP. Após a clonagem e caracterização da porção conservada dos fragmentos dos genes citados, procurou-se a clonagem da seqüência completa do gene, mediante o alongamento das fitas de cDNA com emprego das técnicas de 3'-RACE e 5'-RACE, utilizando-se o kit Marathon TM cDNA Amplification (Clontech). Os sub-clones assim obtidos também foram clonados e seqüenciados como descrito acima.

4.2.5. Caracterização dos possíveis homólogos de SERK por análise de seqüências

Os cromatogramas gerados pelo seqüenciamento foram processados pelo programa PHRED e a montagem das seqüências consenso foi realizada pelo programa CAP3. As seqüências assim obtidas foram comparadas com as seqüências dos bancos de dados do NCBI com o emprego do algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)). Alinhamentos múltiplos das seqüências obtidas com os possíveis homólogos de *Arabidopsis* ou de outras espécies para as quais estas seqüências estejam disponíveis foram realizados com o emprego do programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Cladogramas e árvores filogenéticas foram obtidas utilizando-se matrizes obtidas com cálculo de distância. As árvores foram construídas por neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), com cálculo e Bootstrap para 1000 repetições. O desenho das árvores foi feito com os Programas TreeView ou MEGA (<http://www.megasoftware.net>).

4.2.6. Caracterização do padrão de expressão dos possíveis homólogos de SERK por hibridização *in situ*

Com base nos resultados preliminares das RT-PCRs, os materiais utilizados para os experimentos de hibridização *in situ* foram embriões somáticos de *A. angustifolia* cultivados em meio BM0 (meio BM sem fitorreguladores) e BM2 35d (meio BM acrescido de PEG, maltose e ABA) após o repique e após 35 dias em cultivo. Para a fixação, o material coletado foi imediatamente mergulhado em 4% paraformaldeído (p/v) em tampão fosfato e submetido a vácuo (60 mmHg) por 20 min ou até que o material afundasse completamente na solução do fixador. O material foi fixado por 24 h a 4°C ou por 2 h à temperatura ambiente.

Os tecidos fixados foram desidratados em série etílica até etanol absoluto onde permaneceram pelo menos 2 dias. Em seguida as amostras desidratadas foram emblocadas em parafina, seccionadas seriadamente (8 μm) e montados em lâminas de vidro.

As sondas sense e antisense foram obtidas com a transcrição *in vitro* dos fragmentos clonados por RT-PCR correspondentes aos cDNAs/genes estudados. As moléculas de RNA utilizadas como sonda foram sintetizadas na presença de dUTPs marcadas com digoxigenina (DIG), segundo as instruções do fabricante do material de marcação (Roche). A hibridização foi conduzida sob condições de estringência apropriadas no material desparafinado em xilol e submetido ao tratamento de pré-hibridização com proteinase-K (Dornelas *et al.*, 1999; 2000). A visualização do sinal foi obtida através de reação colorimétrica, utilizando-se anticorpos anti-DIG conjugados à fosfatase alcalina, empregando NBT/BCIP como substrato (Fastblue plus levamisole, Roche). Os resultados foram observados e documentados em um microscópio Zeiss Axioskop 50 equipado com câmera fotográfica digital (Zeiss).

4.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Quantificação de RNA

Para as amostras da fase de proliferação foi observada uma concentração de RNA total de 1,43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para a amostra BM00, e 1,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a amostra BM20. Para as amostras da fase de maturação observou-se uma concentração de RNA total de 0,99 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para a amostra BM035d, e 4,42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a amostra BM235d (Tabela 1). Foi observado, por meio de eletroforese em gel de agarose (1%), que não ocorreu degradação do RNA das amostras das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* (Figura 1).

Tabela 1. Rendimento e qualidade do RNA total por espectrofotômetro em amostras de *A. angustifolia*.

Tratamento	(PM) Peso Macerado*	RNA Total	Rendimento $\mu\text{g/g PM}$
BM0 0	1,596 g	1,43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	101,74
BM2 0	1,833 g	1,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	116,8
BM0 35d	1,19 g	0,99 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	61,0
BM2 35d	2,0 g	4,42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	293,84

* Peso macerado: Peso da matéria fresca (MF) após a maceração com Nitrogênio Líquido.

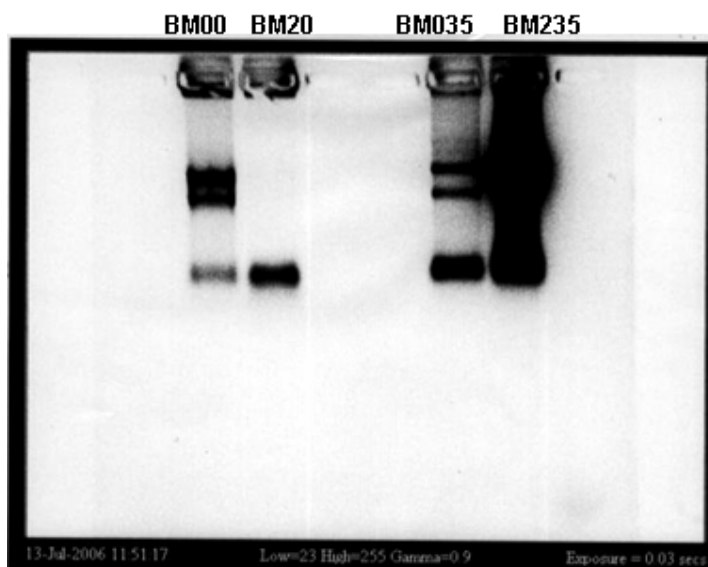


Figura 1. RNA em gel de agarose (1%) obtidos em 4 amostras de *A. angustifolia*. BM00 = Meio de cultura BM sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D ($2\mu\text{M}$) BAP e Kin ($0,5\mu\text{M}$) (fase proliferação); BM0 35d - culturas provenientes do meio BM00 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA ($150\mu\text{M}$) (fase maturação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA ($150\mu\text{M}$) (fase maturação).

4.3.2. Obtenção de homólogos de SERK

Foram obtidos fragmentos de amplificação a partir de todas as reações de PCR testadas. O produto obtido com o emprego dos primers referentes ao gene SERK, parece amplificar bandas diferencialmente, dependendo da amostra de cDNA empregada, segundo os resultados da RT-PCR (Figura 2). Este resultado concorda com outros dados de expressão diferencial de homólogos de SERK em que a expressão do gene está

correlacionada com a indução de respostas embriogênicas *in vitro* (Santa-Catarina *et al.*, 2004).

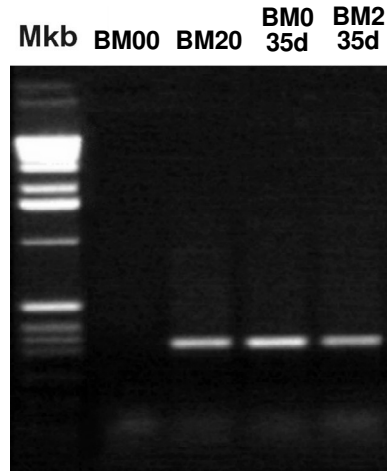


Figura 2. RT-PCR a partir de RNAs extraídos de culturas celulares de *A. angustifolia*, com utilização de primers degenerados para o gene SERK. Os códigos em cada canaleta representam os diferentes meios de cultura onde foram cultivados os materiais utilizados para extração de RNA: BM00 = Meio de cultura BM sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2 μ M) BAP e Kin (0,5 μ M) (fase proliferação); BM0 35d - culturas provenientes do meio BM00 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 μ M) (fase maturação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 μ M) (fase maturação). Mkb: Marcador molecular.

4.3.3. Clonagem e caracterização dos possíveis homólogos de SERK

A super-família de proteínas-kinase em plantas contém um grupo de receptores-kinase (Receptor-Like Kinases, RLKs) caracterizados por um domínio extra-celular, um domínio transmembrana e um domínio de proteína-kinase intracelular (para uma revisão, veja Becraft, 1998). O provável papel das RLKs em plantas é a transdução de sinais ambientais e/ou informações provenientes de células vizinhas para o acionamento de respostas específicas em processos do desenvolvimento. Um destes processos é a embriogênese somática, onde a resposta embriogênica de um grupo de células depende

não apenas do tipo de célula introduzida *in vitro*, mas também da composição do meio de cultura. Experimentos que almejavam correlacionar o potencial embriogênico de culturas celulares com o padrão de expressão diferencial de genes, permitiram o isolamento do gene *SERK* em cenoura (Schmidt *et al.*, 1997). Vários genes codificadores de RLKs semelhantes à *SERK* foram isolados em angiospermas (Santa-Catarina *et al.*, 2004), mas relatos da identificação e clonagem de genes relacionados à *SERK* em gimnospermas são escassos na literatura (Cairney & Pullman, 2007).

No presente trabalho, um clone parcial de uma RLK de *A. angustifolia* foi isolado por PCR usando-se iniciadores degenerados correspondentes a uma região altamente conservada entre as seqüências de cDNA de *SERK* de *Arabidopsis* e de cenoura. No domínio extra-celular de proteínas *SERK* típicas, o peptídeo sinal é seguido de um provável zíper de leucina (ZIP), cinco repetições ricas em leucina (LRRs, leucine-rich repeats), e um domínio rico em prolina (SPP). A análise dos diferentes clones de uma provável *SERK* de *A. angustifolia* revelou que todos codificavam uma mesma proteína, que foi denominada *AbSERK1*. Para a obtenção de maior informação a respeito da seqüência nucleotídica de *AbSERK1*, experimentos de 3' e 5'-RACE foram realizados. O maior clone obtido contém 2095pb e possui um quadro aberto de leitura (ORF) de 471 aminoácidos, no entanto, a ORF se inicia na região do quarto LRR e, portanto, não apresenta o códon codificador da primeira metionina, correspondendo a 69% da extensão da proteína *SERK1* de *Arabidopsis* (Figura 3). A identidade de seqüência entre a proteína *AbSERK* e outros homólogos de *SERK* descritos na literatura variou entre 65% e 86%. Esta similaridade não foi constante ao longo de toda a seqüência protéica e foram particularmente baixas nas regiões N-terminal, no peptídeo sinal e na região adjacente ao domínio transmembrana (Figura 3).

Com o objetivo de investigar a relação entre os homólogos vegetais de *SERK*, uma comparação filogenética da seqüência protéica de *AbSERK* com seus homólogos putativos em outras espécies vegetais foi realizada. Considerando a variação considerável de seqüência em determinadas regiões das proteínas *SERK*, o alinhamento utilizado para a construção da árvore filogenética considerou apenas a região do domínio kinase (Figura 4). A função descrita na literatura para os membros da sub-família *SERK* de proteínas kinase é bastante variável e inclui de resistência à doenças ao controle da embriogênese (Becraft, 1998; Baudino *et al.*, 2001; Santa-Catarina *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2008). Entre este grupo bastante heterogêneo de proteínas, *AbSERK* juntamente com *AtSERK1* formam um clado distinto, suportado por valores significativos de Bootstrap, de acordo com a análise comparativa de seqüências (Figura 4).

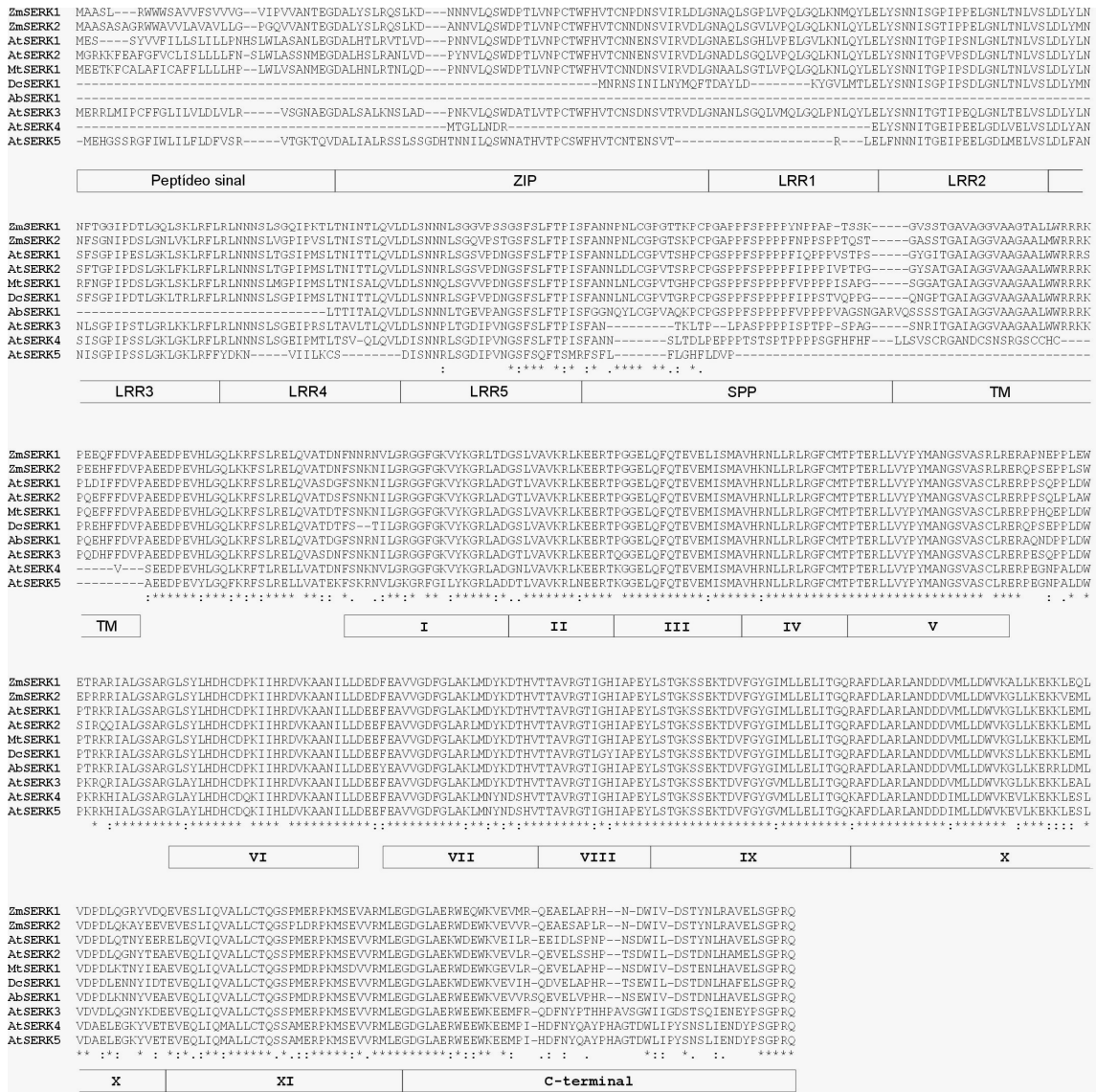


Figura 3. Comparação da sequência proteica de *AbSERK1* de *A. angustifolia* com outros homólogos de *SERK*: As sequências deduzidas de aminoácidos de proteínas *SERK* de milho (*ZmSERK1* e *ZmSERK2*), *Arabidopsis* (*AtSERK1-5*), *Medicago* (*MtSERK1*) e cenoura (*DcSERK1*) foram alinhadas e os domínios relevantes indicados por retângulos abaixo do alinhamento. Os aminoácidos totalmente conservados são indicados por "*" e os parcialmente conservados, indicados por ":". "Gaps" incluídos para otimização do alinhamento são indicados por "-". *ZIP*: zíper de leucina putativo; *LRR1-5*: domínios contendo os padrões repetitivos de leucina (Leucine Rich Repeats); *SPP*: região rica em prolina; *TM*: domínio transmembrana; *I-XI*: domínios característicos de proteínas-quinase I a XI; *C-terminal*: domínio carboxi-terminal.

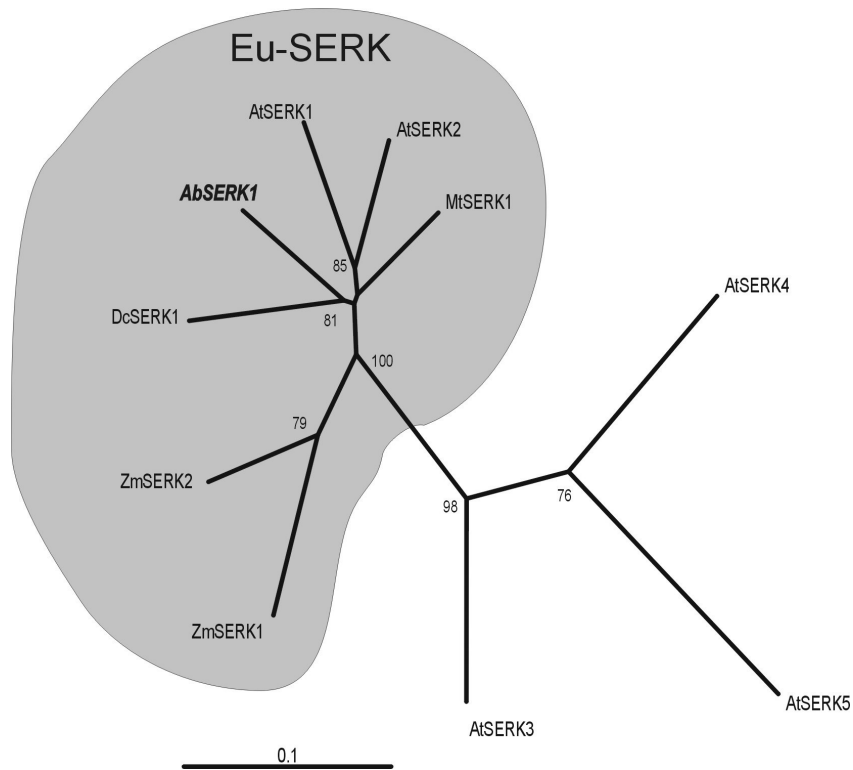


Figura 4. Relações filogenéticas entre homólogos de *SERK*. As seqüências protéicas correspondentes aos domínios kinase I-XI de diferentes homólogos de *SERK* foram alinhados e uma matriz de distância (Saitou& Nei, 1987) gerada. Esta matriz foi utilizada para a construção do cladograma por *neighbour-joining*. A barra indica 10% de substituições não-sinônimas. Os números indicam valores de bootstrap, em porcentagem (1000 repetições). Apenas os valores acima de 75% são mostrados.

Este grupo foi denominado de *EU-SERK* e as funções descritas na literatura para todas as proteínas do clado *EU-SERK* estão relacionadas com o controle do processo embriogênico (Schmidt *et al.*, 1997; Baudino *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001). Observou-se que a expressão de *AbSERK* foi ativada em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, segundo os dados de RT-PCR.

4.3.4. Caracterização do padrão de expressão dos possíveis homólogos de SERK por hibridização *in situ*

A análise da seqüência do fragmento clonado demonstrou tratar-se de um provável homólogo do gene *SERK*, inicialmente descrito em cenoura (Schmidt *et al.*, 1997). Desta forma este gene foi nomeado como *AaSERK* (*A. angustifolia SERK*). Uma comparação da seqüência protéica deduzida de *AaSERK* com as seqüências de outras RLKs descritas na literatura indicou que a proteína *AaSERK* pertence ao clado denominado de *EU-SERK*. As funções descritas na literatura para todas as proteínas do grupo *EU-SERK* estão relacionadas com o controle do processo embriogênico (Schmidt *et al.*, 1997; Baudino *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001). Uma vez que, segundo os dados de experimentos de RT-PCR observou-se que a expressão de *AaSERK* é ativada em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* foram realizados ensaios de hibridização *in situ* para determinar o padrão de expressão de *AaSERK* durante a proliferação e maturação do processo de embriogênese somática. Comparou-se os padrões de expressão de *AaSERK* em calos em fase de proliferação (cultivados em meio BM isento de fitorreguladores BM0) e em calos embriogênicos em fase de maturação (após 35 dias de cultura em meio BM com ABA, PEG e maltose (BM2 35d); Figura 5).

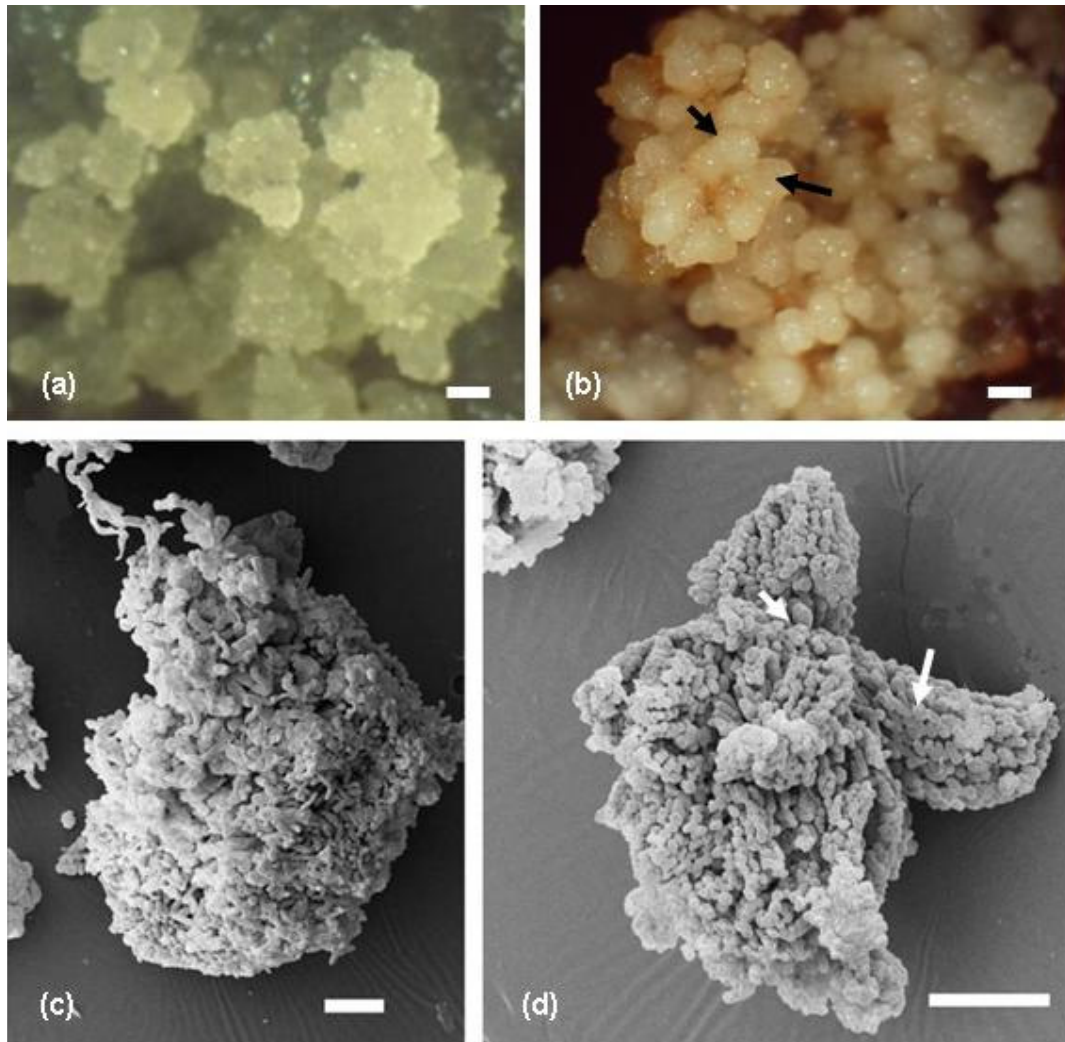


Figura 5. Estereomicroscopia e microscopia eletrônica de varredura de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* em fase de proliferação (cultivados em BM0) (a,c) e durante a embriogenese inicial na: fase de maturação (em meio BM2 35d (Meio de)) (b,d). Nas culturas em BM0 não há formação aparente de embriões somáticos iniciais, apenas pro-embriões. Em culturas cultivadas em meio BM2 35d, observa-se a formação de embriões somáticos em fases iniciais do desenvolvimento sobre a superfície da cultura. BM0 - Meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2 μ M) BAP e Kin (0,5 μ M) (fase proliferação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 μ M) (fase maturação). Barras: 500 μ m.

As culturas embriogênicas em BM0 não mostraram sinais de expressão de *AaSERK*, (Figura 5 A) em conformidade com o observado nos resultados de RT-PCR .

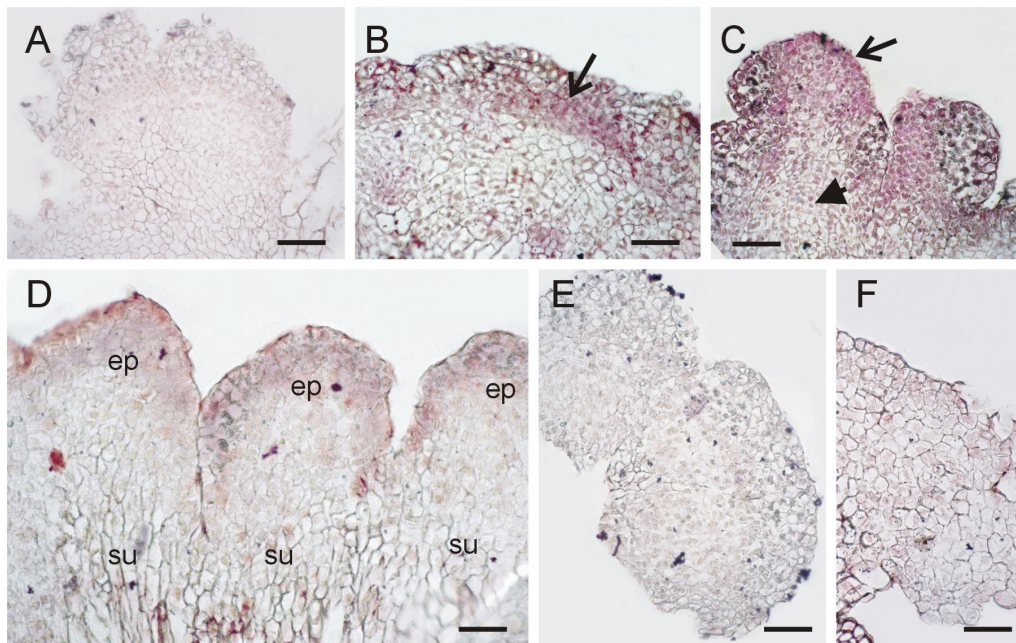


Figura 6. Hibridização *in situ* com a utilização de sondas sense (E-F) e antisense (B-D) de *AaSERK* em *A. angustifolia*. O sinal de hibridização é observado pela presença da coloração rosa-arroxeadado. A: Cultura em meio de proliferação (BM0); B: Cultura em meio BM2 35d. A seta indica um grupo de células em intensa divisão celular apresentando sinais de hibridização. C: cultura em meio de maturação (BM2 35d) apresentando estruturas semelhantes a embriões iniciais. A seta indica o ápice embrionário, com sinal intenso de hibridização e a ponta de seta indica a células do suspensor as quais estão em processo de degeneração, com sinal menos intenso de hibridização. D: Embriões somáticos apresentando sinal de hibridização apenas nas regiões periféricas do ápice embrionário (ep). Culturas em meio BM0 (E) e em meio BM2 35 dias (F) não apresentaram sinais de hibridização acima do ruído de fundo, quando hibridizados com a sonda sense. ep: ápice embrionário; su: suspensor. BM0 - Meio de cultura BM (Gupta & Pullman, 1991) sem adição de fitorreguladores (fase proliferação); BM20 = Meio de cultura BM com adição de 2,4-D (2 μ M) BAP e Kin (0,5 μ M) (fase proliferação); BM2 35d – culturas provenientes do meio BM20 após 35 dias de cultura em meio BM com adição de PEG (7%), Maltose (9%) e ABA (150 μ M) (fase maturação). Barras: 500 μ m. Barras: A, C e E: 250 μ m. B, D e F: 100 μ m.

As culturas cultivadas por 35 dias em meio de maturação (BM2 35d) mostraram a formação de embriões somáticos em estádios iniciais assim como de pro-embriões caracterizando o desenvolvimento dessincronizado. A observação em microscopia eletrônica de varredura das culturas embriogênicas revelou a presença de embriões em estádios iniciais do desenvolvimento na superfície da cultura (Figura 6B). A análise

citoquímica revelou que os pró-embriões somáticos de apresentam células do suspensor, as quais são alongadas em oposição às células do ápice embrionário as quais são isodiamétricas e compactas; (Figura 6 B). Os embriões somáticos em estádios iniciais do desenvolvimento são formados por um grupo de células embriogênicas com ausência de suspensor ou com este já em fase de degeneração conforme descrito no Capítulo I. Células embriogênicas coesas as quais são precursoras dos estádios tardios do desenvolvimento do embrião apresentaram forte sinal de hibridização com a sonda de *AaSERK* (Figura 7 B). À medida que os pró-embriões somáticos se desenvolvem, há a formação de dois domínios distintos: o ápice embrionário que contém células isodiamétricas e de citoplasma denso, apresentando forte sinal de hibridização com a sonda de *AaSERK*; e o grupo de células do suspensor que possuem um sinal fraco ou não hibridizam com a sonda de *AaSERK* (Figura 6 C). À medida que o embrião é individualizado das PEMs (massas celulares proembrionárias) por meio do alongamento das células de suspensor, este assume uma posição mais distal do agregado celular que lhe deu origem. Nesta fase, a expressão de *AaSERK* limita-se à região periférica do ápice embrionário e o sinal de hibridização não é mais detectado nas células do suspensor. Não se detectou sinal de hibridização das sondas sense controle (Figura 6 E e F).

Apesar de vários homólogos de *SERK* já terem sido descritos em espécies angiospermas, não há relatos na literatura do padrão de expressão de *SERK* em gimnospermas (Afzal *et al.*, 2008). O único relato da identificação de homólogos putativos de *SERK* em gimnospermas foi através da análise de ESTs (Carney *et al.*, 2006; Cairney & Pullman, 2007). Os padrões de expressão observados para *AaSERK* é semelhante ao observado para os homólogos de *SERK* de angiospermas (Schmidt *et al.*, 1997; Baudino *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001; Santa-Catarina *et al.*, 2004). Em todos os casos relatados na literatura, a expressão dos homólogos de *SERK* inicia-se em um grupo pequeno de células

pró-embriônicas, em meio a outras células que não expressam o gene, como observado em *A. angustifolia*. Desta forma, o gene *SERK* pode ser considerado um confiável marcador molecular para as células com potencial embriogênico (Santa-Catarina *et al.*, 2004). Na maioria das espécies angiospermas, a formação da estrutura do suspensor durante a embriogênese somática é um fato raro. Durante a embriogênese zigótica, no entanto, observou-se que a expressão dos homólogos de *SERK* limita-se as células embriônicas apenas nas fases iniciais (até fase globular), sendo que a expressão no suspensor pode (em *Arabidopsis thaliana*, Hecht *et al.*, 2001) ou não (em *Hieracium* subgênero *Pilosella*, Tucker *et al.*, 2003) ser detectada. Em *A. angustifolia* o padrão de expressão de *SERK* durante a embriogênese somática assemelha-se ao observado para *Hieracium* subgênero *Pilosella*, uma vez que o sinal de expressão de *AaSERK* foi drasticamente reduzido nas células do suspensor, à medida em que as mesmas se diferenciaram. Perspectivas futuras se relacionam com a investigação do padrão de expressão de *AaSERK* durante a embriogênese zigótica em *A. angustifolia*, uma vez que o resultado poderia indicar se a expressão de *SERK* nas células do suspensor em angiospermas é uma característica basal ou derivada.

6. REFERÊNCIAS

- AFZAL AJ, WOOD AJ, LIGHTFOOT DA (2008) Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Mol Plant Microbe Interact* 21:507-517.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P Ciclo celular e morte celular programada. In: *Biologia molecular da célula*, Artmed Editora, 4ª edição, 2006, p.981-1026.
- ALEMANNO L, DEVIC M, NIEMENAK N, SANIER C, GUILLEMINOT J, RIO M, VERDEIL JL, MONTORO P (2008) Characterization of *leafy cotyledon1-like* during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta*, 227:853–866
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25: 3389-3402.
- AMSTERDAM A, PITZER F, BAUMEISTER W, (1993) Changes in intracellular localization of proteasomes in immortalized ovarian granulosa cells during mitosis associated with a role in cell cycle control. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 1993, 90, 99–103.
- ANSELMINI JI & ZANETTE F (2008) Micrografting morphological characterization in *Araucaria angustifolia* *Ciência Rural*, 38:967-973.
- ARNOLD CD, MITRENGA D, MAYRESBACH H (1975) Gefriertro und einbstung in glycolmethacrylat (GMA) – Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. *Acta histochemistry* 14:271-277.
- ASTARITA LV & GUERRA MP (1998) Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 10: 113-118.
- ASTARITA LV & GUERRA MP (2000) Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae), *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 36, 194-200.
- ASTARITA LV, FLOH EIS, HANDRO W (2003a) Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidase associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). *Plant Growth Reg.* 39:113-118.
- ASTARITA LV, FLOH EIS, HANDRO W (2003b) Free amino acids, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biol. Plantarum* 47:53-59.
- ASTARITA LV, HANDRO W, FLOH EIS (2003c) Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Rev. Bras. Bot.* 26:163-168.
- ATTREE SM & FOWKE LC (1993) Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 35, 1-35.

- BABA AIA, NOGUEIRA FCS, PINHEIRO CB, BRASIL JB, JEREISSATI ES, JUCA TL, SOARES AA, SANTOS MF, DOMONT GB, CAMPOS FAP (2008) Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Science* 175: 717–723.
- BAGINSKY S (2009) Plant Proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectrometry Reviews*, 2009, 28, 93– 120.
- BALBUENA TS, SILVEIRA V, JUNQUEIRA M, DIAS LLC, SANTA-CATARINA C, SHEVCHENKO A, FLOH EIS (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) *Journal Proteomic* doi:10.1016/j.jprot.2009.01.011,
- BAUDINO S, HANSEN S, BRETTSCHEIDER R, HECHT VF, DRESSELHAUS T, LÖRZ H, DUMAS C, ROGOWSKY PM (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* 213:1-10.
- BECRAFT PW (1998) Receptor kinases in plant development. *Trends Plant Sci* 3: 384-388.
- BELL PR (1994) Commentary. Apomictic features revealed in a conifer. *Int. J. Plant Sci.*, 155:621-622.
- BEWLEY JD & BLACK M *Seeds: Physiology of development and germination*. 2. ed. New York: Plenum Publishing, 1994. 445p.
- BOUZON ZL Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (*Gigartinales* - *Rhodophyta*). *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná. 1993. 66p.
- BOVE J, JULLIEN M, GRAPPIN P (2001) Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol.* 3:1002.1–1002.5
- BOZHKOV PV, FILONOVA LH, SUAREZ MF, HELMERSSON A, SMERTENKO AP, ZHIVOTOVSKY B, VON ARNOLD S (2004) VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death Differ.* 11: 175–182.
- BOZHKOV PV, FILONOVA LH, VON ARNOLD S (2002) A key Developmental Switch During Norway Spruce Somatic Embryogenesis Is Induced by Withdrawal of Growth Regulators and Is Associated with Cell Death and Extracellular Acidification. *Biotechnology and Bioengineering*, 77:6:20.
- BOZHKOV PV, SUAREZ MF, FILONOVA LH, DANIEL G, ZAMYATNIN JR AA, RODRIGUEZ-NIETO S, ZHIVOTOVSKY B, SMERTENKO A (2005) Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis *PNAS* 102:14463–14468.

- BURG K, HELMERSSON A, BOZHKOV P, VON ARNOLD S (2007) Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine *Journal of Experimental Botany* 58: 687-698.
- BURLINGAME L (1915) The morphology of *Araucaria brasiliensis*. III. Fertilization, the embryo, and the seed. *Botanical Gazette*, 59:1-39.
- CAIRNEY J & PULLMAN G (2007) The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New Phytologist* 176:511-536.
- CAIRNEY J, ZHENG L, COWELS A, HSIAO J, ZISMANN V, LIN J, OUYANG S, THIBAUD-NISSEN F, HAMILTON J, CHILDS K, PULLMAN GS, ZHANG Y, OH T, BUELL CR (2006) Expressed Sequence Tags from loblolly pine embryos reveal similarities with angiosperm embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 62:485-501.
- CAMPALANS A, PAGÈS M, MESSEGUER R (2000) Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38:449-457.
- CANGAHUALA-INOCENTE GC, VILLARINO A, SEIXAS D, DUMAS-GAUDOT E, TEREZI H, GUERRA MP (2009) Differential proteomic analysis of developmental stages of *Acacia sellowiana* somatic embryos *Acta Physiologia Plant* DOI 10.1007/s11738-008-0259-.
- CÁNOVAS FM, DUMAS-GAUDOT E, RECORBET G, JORRIN J, MOCK HP, ROSSIGNOL M (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* 4:285-298.
- CARVALHO PER *Espécies arbóreas brasileiras*. Colombo: Embrapa Florestas, v1, 2003, 1039 p.
- CARVALHO PER *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. EMBRAPA-CNPQ. Colombo-PR, 1994. 70-78p.
- CHALUPA V (1985) Somatic embryogenesis in and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Commonwealth Forestry Institute* 14: 57-63.
- CHAPMAN A, BLERVACQ AS, VASSEUR J, HILBERT JL (2000) Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta* 211: 305-314.
- CHEN S & HARMON AC (2006) Advances in plant proteomics. *Proteomics* 6:5504-5516.
- CHIBANI K, ALI-RACHEDI S, JOB C, JOB D, JULLIEN M, GRAPPIN P (2006) Proteomic Analysis of Seed Dormancy in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142:1493-1510.
- CLARKE, P.G. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181: 195-213.

- CYR DR, KLIMASZEWSKA K (2002) Conifer somatic embryogenesis: II. Applications *Dendrobiology*, 48:41–49.
- DOGRA PD (1978) Morphology, development and nomenclature of conifer embryo. *Phytomorphology* 28:307–322.
- DONG JZ & DUNSTAN DI (1997) Endochitinase and β -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta* 201:189-194.
- DORNELAS MC, VAN LAMMEREN AAM, KREIS M (2000) *Arabidopsis thaliana* SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. *Plant Journal* 21 :419-429.
- DORNELAS MC, WITTICH P, VON RECKLINGHAUSEN I, VAN LAMMEREN, AAM, KREIS M (1999) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. *Plant Mol Biol* 39:137-147.
- DUNSTAN DI, DONG JZ, CARRIER D, ABRAMS S (1998) Ets following ABA treatment of spruce somatic embryos. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 34:159-168.
- DURZAN DJ (2008) Monozygotic Cleavage Polyembryogenesis and Conifer Tree Improvement. *Цитология и генетика*. 3.:29-46.
- DURZAN DJ Process control in somatic polyembryogenesis, In J.E. Hällgren. *Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology*, 8:147. Swedish University of Agricultural Sciences. 1988.
- EGERTSDOTTER U & VON ARNOLD S (1998) Development of somatic embryos in Norway spruce. *Journal Experimental of Botany* 49:155-162.
- EDWARDS C & MASON WL (2006) Stand structure and dynamics of four native Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) woodlands in northern Scotland *Forestry*, 79: 261-277.
- FEHÉR A, PASTERNAK TP, DUDITS DN (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:201-207.
- FEHÉR A. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? In: Mujib, A.; Šamaj, J. *Somatic Embryogenesis*. Plant Cell Monographs. vol. 2 (Eds.) 2006, 365 p.
- FERNANDEZ JH Identificação e caracterização de proteínas e genes expresso diferencialmente durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *Araucaria angustifolia*. *Tese de doutorado*. Campinas. Universidade Estadual de campinas. 2001, 126p.
- FILONOVA L, BOZKOV P, VON ARNOLD S (2000b) Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J Exp Bot* 51:343-349.

FILONOVA L, VON ARNOLD S, DANIEL G, BOZHKO V (2002) Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. *Cell Death and Differentiation* 9:1057-1062.

FILONOVA LH, BOZHKO V, BRUKHIN VB, DANIEL G, ZHIVOTOVSKY B, VON ARNOLD S (2000a) Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J. Cell Sci.* 113:4399–4411.

FIND J, GRACE L, KROGSTRUP P (2002) Effect of anti-auxins on maturation of embryogenic tissue cultures of Nordmanns fir (*Abies nordmanniana*) *Physiologia Plantarum* 116: 231 – 237.

FINNIE C, MELCHIOR S, ROEPSTORFF P, SVENSSON B (2002) Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiol.* 129:1308–1319.

FOOTITT S, INGOUFF M, CLAPHAM D, VON ARNOLD S (2003) Expression of the *viviparous 1* (*Pavp1*) and *p34cdc2* protein kinase (*cdc2Pa*) genes during somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst). *J. Exp. Bot.* 54:1711-1719.

GALLARDO K, FIRNHABER C, ZUBER H, HÉRICHER D, BELGHAZI M, HENRY C, KÜSTER H, THOMPSON R (2007) A Combined Proteome and Transcriptome Analysis of Developing *Medicago truncatula* Seeds: Evidence for Metabolic Specialization of Maternal and Filial Tissues. *Molecular & Cellular Proteomics*, doi:10.1074/mcp.M700171

GALLARDO K, JOB C, GROOT SPC, PUYPE M, DEMOL H, VANDEKERCKHOVE J, JOB D (2001) Proteomic Analysis of *Arabidopsis* Seed Germination and Priming. *Plant Physiology*, 126, 835-848.

GALLARDO K, SIGNOR C, VANDEKERCKHOVE JI, THOMPSON RD, BURSTIN J (2003) Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic process related to reserve accumulation. *Plant Physiol.* 133:664–682.

GARCÍA-MARTÍN G, MANZANERA JA, GONZA ME, GONZALEZ-BENITO MF (2005) Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 171–177.

GIFFORD EM & FOSTER AS *Morphology and evolution of vascular plants*, W. H. Freeman Co, New York, 1988 p. 401-453.

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

GUERRA MP, SILVEIRA V, SCHNAIDER L, SEDREZ M, NODARI RO. In SIMÕES, L.L. e LINO, C.F. (ed) *Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais*. São Paulo. SENAC. 2002.

GUERRA MP, STEINER N, MANTOVANI A, NODARI RO, REIS MS, SANTOS K Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. In: Barbieri RL, *Evolução de Plantas Cultivadas*, EMBRAPA, Brasília-DF. 2008, p.149-184.

GUERRA MP, TEIXEIRA JB, TORRES AC. Poliembriogênese Somática, in Torres, A.C. e Caldas, L. *Técnicas e Aplicações da Biologia Celular e Molecular em Plantas*, Embrapa. 1999.

GUNAWARDENA AH, GREENWOOD JS, DENGLER NG (2004) Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. *Plant Cell* 16:60–73.

GUPTA PK & DURZAN DJ (1986) Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Bio/Technology* 4: 643–645.

GUPTA PK & DURZAN DJ (1987) Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology* 5: 147–151.

GUPTA PK & PULLMAN GS (1991) Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation, *US patent* , 5: 36- 37.

HAECKER A, GROß-HARDT R, GEIGES B, SARKAR A, BREUNINGER H, HERRMANN M, LAUX T (2004) Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131:657–668

HAINES RJ & PRAKASH N (1980) Proembryo development and suspensor elongation in *Araucaria Juss.* Aust, *Journal of Botany*, 28: 511-523.

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

HAKMAN I (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 87:148-159.

HAKMAN I, HALLBERG H, PALOVAARA J (2009) The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator protein PIN during *Picea abies* somatic embryo development *Tree Physiology*, doi:10.1093/treephys/tpn048

HARRIS N & OPARKA KJ (1994) *Plant Cell Biology. A Practical Approach* IRL Press: Oxford.

HAVEL L & DURZAN DJ (1996a) Apoptosis in plant. *Bot. Acta.*, 109:1-10.

HAVEL L & DURZAN DJ (1996b) Apoptosis during diploid parthenogenesis and early somatic embryogenesis of Norway Spruce. *Int. J. Plant Sci.*, 157:8-16.

- HECHT V, VIELLE-CALZADA JP, HARTOG MV, SCHMIDT ED, BOUTILIER K, GROSSNIKLAUS U, DE VRIES SC (2001) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* 127:803-816.
- HELMERSSON A, VON ARNOLD S, BOZHKOVA PV (2008) The level of free intracellular zinc controls programmed cell death/cell survival decisions in plant embryos. *Plant Physiology.* 147:1158-1167.
- HIGGINS TJV (1984) Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annual Review of Plant Physiology* 35:191-221.
- HÖGBERG KA (2003) Possibilities and Limitations of Vegetative Propagation of Norway spruce. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. *Silvestria* 294.
- HUTSO NR, RHODES MR, KIRBY ML (1997) Differential expression of a proteasomal subunit during chick development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234: 216–223.
- IMIN N, GOFFARD N, NIZAMIDIN M, ROLFE BG (2008) Genome-wide transcriptional analysis of super-embryogenic *Medicago truncatula* explant cultures *BMC Plant Biology*, 8:110,1-14.
- IMIN N, JONG F, MATHESIUS U, VAN NOORDEN G, SAEED NA, WANG X, ROSE RJ, ROLFE BG (2004) Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics* 4:1883–1896.
- IMIN N, NIZAMIDIN M, DANIHER D, NOLAN KE, ROSE RJ, ROLFE BG (2005) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6- benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiology*, 137:1250–1260.
- JAIN SM, GUPTA PK, NEWTON RJ *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995. p. 388.
- JIMÉNEZ VM, GUEVARA E, HERRERA J, BANGERTH F (2005) Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 23:567–572.
- JOHANSEN DA *Plant embryology*. Chronica Botanica Company, New York. 1950
- KEINONEN-METTÄLÄ K, JALONEN P, EUROLA P, VON ARNOLD S & VON WEISSENBERG K (1996) Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 11: 242–250.
- KNOX JP, DAY S, ROBERTS K (1989) A set of surface glycoproteins forms an early marked of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L. *Development*, 106:47-56.

- KNOX JP, LINSTED PJ, PEART J, COOPER C, ROBERTS K. (1991) Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant Journal* 1:317-326.
- KORMUTÁK A & VOOKOVÁ B (1997) Biochemical variation between non-embryogenic and embryogenic calli of silver fir. *Biologia Plantarum*, 39:125-130.
- KORMUTÁK A, SALAJ T, VOOKOVÁ B (2006) Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. *Biologia Bratislava*, 61: 479-485.
- LAM E, KATO N, LAWTON M, (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848–853.
- LANGHANSOVÁ L, KONRÁDOVÁ H, VANEK T (2004) Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of Panax ginseng somatic embryos. *Plant Cell Rep* 22:725–730.
- LARSSON E, SITBON F, LJUNG K, VON ARNOLD S (2007) Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce *New Phytologist* 177: 356–366.
- LARSSON E, SITBON F, VON ARNOLD S (2008) Polar auxin transport controls suspensor fate *Plant Signal Behav* 7: 469–470.
- LAUX T, JURGENS G Embryogenesis: A New Start in Life. *Plant Cell* 9:989-1000.
Merkle, S. A.; Parrott W. A.; Flinn, B. S. 1995. *Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, cap. 5. 1997. p. 155 – 203.
- LELU MA, BASTIEN C, DRUGEAULT A, GOUEZ ML, KLIMASZEWSKA K (1999) Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without plant growth regulators. *Physiologia Plantarum* 105, 719–728.
- LI XY, HUANG FH, MURPHY JB, GBUR EE (1998) Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant*, 34:22-26.
- LIPPERT D, ZHUANG J, RALPH S, ELLIS DE, GILBERT M, OLAFSON R, RITLAND K, ELLIS B, DOUGLAS CJ, BOHLMANN J (2005) Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics* 5: 461–473.
- MANTOVANI A, MORELLATO LPC, REIS MS (2004) Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Revista Brasileira de Botânica* 27:787-796.
- MARSONI M, BRACALE M, ESPEN L, PRINSI B, NEGRI AS, VANNINI C (2008) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera* *Plant cell reports*, 27:347-356.

- MASTROBERTI AA & MARIATH JEA (2003) Compartmented cells in the mesophyll of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Australian Journal of Botany*, 51:267– 274.
- MATTOS JR de O Pinheiro Brasileiro. 1. 2^a ed. Artes gráficas Princesa Ltda. Lages-SC. 1994.
- MISRA S In: SM JAIN, PK GUPTA & RJ NEWTON, (eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*, v. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, p. 119-142.
- MO LH, EGERTSDOTTER U, VON ARNOLD S (1996) Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. *Annals of Botany* 77:143-152.
- MORAES FMS Análise Proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* Mez(Lauracea). *Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Molecular)* - Universidade de Brasília. 2006, 95 p.
- MORDHORTS AP, TOONEN MAJ, DE VRIES S (1997) Plant Embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16:535-576.
- NATARAJAN S, XU C, CARPENA TJ, GARRETT WM (2005) Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal. Biochem* 342:214–220.
- NEWTON RP, BRENTON AG, SMITH CJ, DUDLEY E (2004) Plant Proteome Analysis by Mass Spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry*, 65:1449-1485.
- NOGUEIRA FCS Análise Proteômica da Deposição de Proteínas em Sementes em Desenvolvimento e Suspensões Celulares Embriogênicas de Feijão-de-Corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007, 115p.
- NOLAN KE, IRWANTO RR, ROSE RJ (2003) Auxin up regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root forming and embryogenic cultures *Plant Physiol.* 133: 218-230.
- OLIVEIRA SANTOS M, ROMANO E, YOTOKO KSC, TINOCO LMP, DIAS BBA, ARAGAO FJM (2005) Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-likekinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis, *Plant Sci.* 168:723-729.
- PANZA V, LÁINEZ V, MARODER H, PREGO I, MALDONADO S (2002) Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140:273-281.
- PARK OK (2004) Proteomics studies in plants. *J. Bioch. Mol. Biol.* 37:133-138.
- PARK YS, LELU-WALTER MA, HARVENGT L, TRONTIN JF, MAC EACHERON I, KLIMASZEWSKA K, BONGA JM (2006) Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus*

banksiana, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant cell organ tissue culture* 86: 87-101.

PESCADOR R, KERBAUY GB, VIVIANI D, KRAUS JE (2008) Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae) *Revista Brasil Bot*, 31:155-164.

REITZ PR & KLEIN RM (1966) Araucariáceas. In: Reitz, PR *Flora Ilustrada Catarinense*, 1:1-55.

REITZ R, KLEIN RM, REIS A. *Projeto Madeira de Santa Catarina*. Separata 28 de sellowia–Herbário Barbosa Rodrigues, Itajai. 1978.

ROJAS-HERRERA R, QUEIROZ-FIGUEROA FR, MONFORTE-GONZÁLEZ M, SÁNCHEZ-TEYER F, LOYOLA-VARGAS VM (2002) Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* revealed by RT-PCR differential display. *Mol. Biotechnol.* 21: 43-50.

ROSSIGNOL M, PELTIER JB, MOCK HP, MATROS A, MALDONADO AM, JORRÍN JV (2006) Plant proteom analysis: a 2004 – 2006 update. *Proteomics* 6:5529–5548.

SAITOU N & NEI M (1987) The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec Biol Evol* 4:406-425.

SALAJ J, VON RECKLINGHAUSEN IR, HECHT V, VRIES SC, SCHEL JHN, VAN LAMMEREN AAM (2008) AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 709-714.

SALLANDROUZE A, FAUROBERT M, MAÂTAOUI ME (2002) Characterization of the development stages of cypress zygotic embryos by two-dimensional electrophoresis and by cytochemistry. *Physiology Plant*, 114:608 – 618.

SANTA-CATARINA C, HANAI LR, DORNELAS MC, VIANA AM, FLOH EIS (2004) SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 79:53-61.

SANTA-CATARINA C, SILVEIRA V, BALBUENA TS, VIANA AM, ESTELITA MEM, HANDRO W, FLOH EIS (2006) IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant Growth Regul* 49:237–247.

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

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

SANTOS ALW, WIETHÖLTER N, GUEDDARI NE, MOERSCHBACHER BM (2006) Protein expression during seed development in *Araucaria angustifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. *Physiologia Plantarum* 127:138–148.

SCHELLENBAUM P, JACQUES A, MAILLOT P, BERTSCH C, MAZET F, FARINE S, WALTER B (2008) Characterization of VvSERK1, VvSERK2, VvSERK3 and VvL1L genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *Plant Cell Rep* 27:1799–1809

SCHMIDT ED, GUZZO F, TOONEN MA, DE VRIES SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124:2049-2062.

SEIFERT GJ & ROBERTS K (2007) The Biology of Arabinogalactan Proteins *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:137–61

SETOGUCHI H, OSAWA TA, PINTAUD J, JAFFRÉ T & VEILLON J (1998) Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. *Am. J. of Botany*, 85:1507.

SHEWRY PR, NAPIER JA, TATHAM AS (1995) Seed storage proteins. Structures and Biosynthesis. *The Pant Cell*, 7: 945.

SHIMIZU JY & OLIVEIRA YMM *Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da Araucaria no sul do Brasil*. EMBRAPA-URPFCS. Documentos, 04. Curitiba-PR. 1981, 9p.

SHOWALTER AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:1361-1362.

SILVEIRA V, Aspectos fisiológicos e bioquímicos da embriogênese em *Araucaria angustifolia* e *Pinus taeda*. *Tese de doutorado*. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2004.

SILVEIRA V, BALBUENA TS, SANTA-CATARINA C, FLOH EIS, GUERRA MP, HANDRO W (2004a) Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regulation*, 44:147-156.

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

SILVEIRA V, SANTA-CATARINA C, BALBUENA TS, MORAES FMS, RICART CAO, SOUSA MV, GUERRA MP, HANDRO W, FLOH EIS (2008) Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biol. Plant.* 52: 101-104.

SILVEIRA V, SANTA-CATARINA C, TUN NN, SCHERER GFE, HANDRO W, GUERRA MP, FLOH EIS (2006) 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.

SILVEIRA V, STEINER N, SANTOS ALW, NODARI RO, GUERRA MP (2002) Biotechnology tools in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. *Crop Breeding And Applied Biotechnology*. Brasil: 2:463 – 470.

SINGH H *Embryology of Gymnosperms*. Handbuch der Pflanzenanatomie, v.10. (Berlin: Gebruder Borntraeger), 1978.

SINGLA B, KHURANA JP, KHURANA P (2008) Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum* *Plant Cell Rep*, 27:833–843

SKYLAS DJ, MACKINTOSH JA, CORDWELL SJ, BASSEAL DJ, WALSH BJ, HARRY J, BLUMENTHAL C, COPELAND L, WRIGLEY CW, RATHMELL W (2000) Proteome approach to the characterization of protein composition in the developing and mature wheat-grain endosperm. *J. Cereal Sci.* 32:169–188.

SMERTENKO AP, BOZHKO V, FILONOVA LF, VON ARNOLD S, HUSSEY PJ (2003) Re-organization of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. *The Plant Journal*, 33:813-824.

SOMLEVA MN, SCHMIDT EDL, DE VRIES SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep* 19:718-726.

SONG D, LI G, SONG F, ZHENG Z (2007) Molecular characterization and expression analysis of OsBISERK1, a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase, during disease resistance responses in rice. *Mol Biol Rep* 35:275–283.

SOUTER M & LINDSEY K (2000) Polarity and signalling in plant embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 51: 971-983.

STACEY NJ, ROBERTS K, KNOX JP (1990) Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. *Planta* 180:285-292.

STASOLA C, VAN ZYL L, EGERSTDOTTER U, CRAIG D, LIU W, SEDEROFF RR (2003) The effects of Polyethylene Glycol on Gene Expression of Developing White Spruce Somatic Embryos. *Plant Physiology*, 131:49 – 60.

STASOLLA C & YEUNG E (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryos quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 15-35.

STEEL RGD & TORRIE JH (1988) *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. México: Mc Graw – Hill. 633p.

STEINER N Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante e embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* Bert O. Kuntze. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2005, 123p.

STEINER N, SANTA-CATARINA C, ANDRADE JBR, BALBUENA TS, GUERRA MP, HANDRO W, FLOH EIS, SILVEIRA V (2008) *Araucaria angustifolia* Biotechnology. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 2: 20-28.

STEINER N, SANTA-CATARINA C, SILVEIRA V, FLOH EIS, GUERRA MP (2007) Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* Embryogenic cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 89: 55-62.

STEINER N, VIEIRA F DON, MALDONADO S, GUERRA MP (2005) Carbon Source Affects Morphogenesis and Histodifferentiation of *A. angustifolia* Embryogenic Cultures. *Brazilian archives of Biology and Technology* 48:896-903.

SUÁREZ MF, BOZHKO V (ed.): *Plant Embryogenesis* - Humana Press, Totowa 2008. 184 pp.

SUPRASANNA P & BAPAT VA. Differential Gene Expression During Somatic Embryogenesis. *Plant Cell Monographs* In: A. Mujib · J. Samaj: Somatic Embryogenesis Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.

TAUTORUS TE, FOWKE LC, DUNSTAN DI (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany*, 69:1873-1899.

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.

TIAN L, ZHANG L, ZHANG J, SONG Y, GUO Y (2009) Differential proteomic analysis of soluble extracellular proteins reveals the cysteine protease and cystatin involved in suspension-cultured cell proliferation in rice. *Biochimica et Biophysica Acta* 17:459-467.

TOONEN MAJ, SCHMIDT EDL, HENDRIKS T, VERHOEVER HA, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC (1996) Expression of the JIM8 cell wall epitope in carrot somatic embryogenesis. *Planta* 200:167-173.

TUCKER MR, ARAUJO ACG, PAECH NA, HECHT V, SCHMIDT EDL, ROSSELL JB, DE VRIES SC, KOLTUNOW AMG (2003) Sexual and Apomictic Reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* Are Closely Interrelated Developmental Pathways *The Plant Cell*, 15:1524-1537.

TUN NN, SANTA-CATARINA C, BEGUM T, SILVEIRA V, HANDRO W, SEGAL FLOH EI, SCHERER GFE (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology* 47:346-354.

VAN HENGEL AJ, TADESSE Z, IMMERZEEL P, SCHOLS H, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC (2001) N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis *Plant Physiology* 125:1880-1890.

- VAN HENGEL AJ, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC (2002) A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPS) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 114:637-644.
- VENSEL WH, TANAKA CK, CAI N, WONG JH, BUCHANAN BB, HURKMAN WJ (2005) Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* 5:1594–1611.
- VERDEIL JL, ALEMANN L, NIEMENAK N, TRANBARGER TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* 12:243–252
- VOGEL G (2005) How Does a Single Somatic Cell Become a Whole Plant? *Science*, 309(5731):86.
- VON ARNOLD S, EGERTSDOTTER U, EKBERG I, GUPTA P, MO H, NÖRGAARD J Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*), In: Jain S; Gupta P; Newton R *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 3, Kluwer Publishers, Netherlands. 1995.
- VON ARNOLD S, SABALA I, BOZKOV P, DYACHOK J, FILANOVA L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 233–249.
- WESTERMEIER R & NAVEN T *Proteomics in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- WILKINS MR, WILLIAMS KL, APPEL RD, HOCHSTRASSER D. (Eds.) *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer-Verlag, Berlin, 1997p. 493.
- WILLIAMS EG & MAHESWARAN G (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57:443-462.
- WINKELMANN T, VAN DORSSELAER DHA, HANS-PETER BRAUN MS (2006) Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination. *Physiologia Plantarum*, 224:508 – 519.
- ZOGLAUER K, BEHRENDT U, RAHMAT A, ROSS H *Somatic embryogenesis – the gate of biotechnology in conifers* In: Rücker, W.; Laimer, H.: *Plant tissue culture one hundred years after Gottlieb Haberlandt*. Springer-Verlag, im Druck. 2002.
- ZHANG M, XU C, YAN H, ZHAO N, VON WETTSTEIN D, LIU B (2009) Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F1 hybrids of sorghum pure lines are accompanied by increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases. *The Plant Journal* 57: 666–679.