

Francis Pereira Dias

**CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA, FISIOLÓGICA E
HISTOQUÍMICA DE CULTURA EMBRIOGÊNICAS DE
Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze, ARAUCARIACEAE
MANTIDAS EM SUSPENSÃO CELULAR**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro
Guerra

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Neusa
Steiner

Florianópolis
2016

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

Pereira-Dias, Francis
Caracterização proteômica, fisiológica e histoquímica de
culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*
(Bertol.) Kuntze, Araucariaceae mantidas em suspensão
celular / Francis Pereira-Dias ; orientador, Miguel Pedro
Guerra ; coorientadora, Neusa Steiner. - Florianópolis, SC,
2016.
109 p.

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

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. embriogênese
somática. 3. proteômica;. 4. suspensão celular. 5. massas
pró-embriônicas. I. Guerra, Miguel Pedro. II. Steiner,
Neusa. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.
IV. Título.

Francis Pereira Dias

**CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA, FISIOLÓGICA E
HISTOQUÍMICA DE CULTURA EMBRIOGÊNICAS DE
Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze, ARAUCARIACEAE
MANTIDAS EM SUSPENSÃO CELULAR**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis, 26 de abril de 2016.

Prof. Paulo Emílio Lovato, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Miguel Pedro Guerra, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Neusa Steiner, Dr.^a
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Marisa Santos, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Martina Blank, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Vanildo Silveira, Dr.
Universidade Estadual Norte Fluminense, Darcy Ribeiro

*Dedicavit ad Immaculatae Virginis
Marie, Mater boni rebus.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

- a Deus;
- ao Governo Brasileiro pela formação pública, gratuita e de qualidade, bem como, o financiamento do curso internacional na Universidade de Montevidéu/Instituto Pasteur que complementaram minha formação profissional;
- às fontes de financiamento deste trabalho CNPq, CAPES e FAPESC pelos recursos em prol da execução das pesquisas laboratoriais;
- à Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura oferecida;
- ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais na pessoa dos docentes, membros da banca e servidores, Sra. Bernadete Ribas, André Knopp pela formação, auxílio e apoio;
- aos Professores Miguel Pedro Guerra e Neusa Steiner pela orientação, estímulo e *insights*;
- aos laboratórios LFDGV, LAVEG, LABFISIO na pessoa dos seus membros, técnicos e colegas pelo apoio e amizade;
- ao CEBIME, nas pessoas da Dra. Martina Blank e MEng. Vanessa Almeida de Oliveira pelo apoio técnico na identificação das proteínas;
- a minha família e amigos pela estima, apoio e torcida durante essa etapa de minha formação profissional. Meu muito obrigado.

Para ser grande...
Sê inteiro; nada teu exagera ou exclui;
Sê todo em cada coisa!
Põe quanto és no mínimo que fazes; assim em
cada lago, a lua toda brilha porque alta vive.

Fernando Pessoa

RESUMO

A araucária, ou pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, Araucariaceae) é uma conífera nativa de grande valor econômico e ecológico. Ferramentas biotecnológicas baseadas na embriogênese somática vêm sendo empregadas visando à conservação e o melhoramento da araucária. Culturas embriogênicas desta espécie são normalmente mantidas em suspensões celulares e o tempo ótimo de subcultivo celular necessita ser precisamente determinado. No presente trabalho estudaram-se aspectos do crescimento, da bioquímica, da histoquímica e da proteômica das células de *A. angustifolia* em sistema de suspensão celular. Culturas embriogênicas foram cultivadas em meio líquido BM modificado, em agitação orbital (aparato Steward). A dinâmica de crescimento celular foi avaliada por meio do volume celular sedimentado, massa fresco, índice mitótico, condutividade e pH do meio. Ainda foram avaliadas o número de PEMs, a histoquímica, viabilidade e morte celular e o proteoma. O maior valor de incremento celular em massa fresca ocorreu na fase exponencial aos 14 dias de cultivo. Ao longo do tempo há redução da viabilidade celular e do pH do meio de cultura. A condutividade e o pH apresentam os menores valores na fase linear de crescimento celular. Sinais de morte celular iniciam após 15 dias de cultivo. Nas culturas embriogênicas foi predominante a presença de PEM III e diferenças histoquímicas foram observadas entre as células embriogênicas e não-embriogênicas. Foram detectadas a expressão de proteínas relacionadas às auxinas, ao citoesqueleto, ao metabolismo geral e às reservas. Finalmente, por apresentar menor estresse associado ao maior incremento de massa fresca, este período foi considerado o mais apropriado para o intervalo de subcultivo das suspensões celulares.

Palavras-chave: aparato Steward; conífera; cultura de tecidos; embriogênese somática; massas pró-embriônicas; proteômica; suspensão celular.

ABSTRACT

Araucaria or Brazilian-pine tree (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, Araucariaceae) is a native conifer with great economic and ecological value. Aiming conservation through use, massive propagation protocols based on cell suspension system under somatic embryogenesis route were developed. Nevertheless, the optimal time for subculturing is not yet determined, and cell biology knowledge of *A. angustifolia* under the cell suspension system is scanty. The present work is a characterization of growth, biochemistry, histochemistry and proteomics of the *A. angustifolia* cells under cell suspension system. Cell cultures were cultivated in liquid BM modified medium, in orbital agitator (Steward's apparatus). Cell growth dynamics was evaluated with: cell volume after sedimentation, fresh weight, mitotic index, conductivity, pH, number of PEMs, histochemical tests, viability and cell death, as well as proteomics. Among expressed proteins were auxin related proteins, cytoskeleton, metabolism and storage. Cell viability is lost and the pH becomes acidic with the passage of time. Conductivity and pH have the lowest values at linear phase. Signs of cell death are observed after the 15th day of culturing. Among the cell types the PEMIII is predominant and embryogenic and non-embryogenic cells types differ histochemically. Finally, the highest value of fresh weight increment (139%) was observed at the exponential phase (14 days), thus optimal time for subculturing.

Keywords: Cell suspension. Conifer. Proembrionary masses. Proteomic. Tissue Culture. Steward's Apparatus. Somatic embryogenesis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO: A ESPÉCIE <i>Araucaria angustifolia</i>	17
1.1 A FAMÍLIA ARARUCARIACEAE E A OCORRÊNCIA DE <i>Araucaria angustifolia</i>	17
1.2 A DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA	17
1.3 USO, A EXPLORAÇÃO COMERCIAL E CONSEQUÊNCIAS	18
1.4 RECURSOS GENÉTICOS E A CONSERVAÇÃO DA ARAUCÁRIA	19
2 ESTADO DA ARTE	23
2.1 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CONÍFERAS	23
2.1.1 Embriogênese somática em <i>Araucaria angustifolia</i>	27
2.2 SUSPENSÕES CELULARES	31
2.3 ANÁLISE PROTEÔMICA	32
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 ARTIGO	37
4.1 ABSTRACT	37
4.2 INTRODUCTION	37
4.3 MATERIAL AND METHODS	39
4.3.1 Cell culture media and multiplication	39
4.3.2 Cell culture growth dynamics	39
4.3.3 PH and conductivity	40
4.3.4 Mitotic index	40
4.3.5 Number of PEMs	41
4.3.6 Viability and cell death	41
4.3.7 Histochemistry	41
4.3.8 Proteomic analysis: sample collection and protein extraction	41

4.3.10 Protein quantification	42
4.3.11 2-DE gel electrophoresis	42
4.3.12 Software analysis	42
4.3.13 Protein digestion and MALDI-TOF-MS analysis	43
4.4 RESULTS	43
4.4.1 Suspension cultures growth dynamics	43
4.4.2 Mitotic index	44
4.4.3 Number of PEMs	44
4.4.5 Viability and cell death	44
4.4.6 PH and conductivity	45
4.4.7 Histochemical characteristics	45
4.4.8 Proteomic analysis	46
4.5 DISCUSSION	47
4.5.1 Proteins involved in cell growth	47
4.5.2 Proteins involved in cell structure	50
4.5.3 Proteins involved in metabolism and other relevant processes	51
4.5.4 Growth analysis	54
4.6 CONCLUSIONS	56
4.7 ACKNOWLEDGEMENTS	56
4.8 REFERENCES	56
5 CONCLUSÃO	91
6 REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO: A ESPÉCIE *Araucaria angustifolia*

1.1 A FAMÍLIA ARARUCARIACEAE E A OCORRÊNCIA DE *Araucaria angustifolia*

A família Araucariaceae Henkel & W. Hochst. tem atualmente distribuição austral Reitz e Klein (1966); (GIFFORD; FOSTER, 1996; SETOGUCHI *ET AL.*, 1998), embora, os registros fósseis demonstram também a ocorrência no hemisfério Norte (SETOGUCHI *ET AL.*, 1998). Três gêneros compõem a família: *Araucaria* Juss., *Agathis* Salisb. e *Wollemia* W. G. Jones, K. D. Hill & J. M. Allen. Filogeneticamente, esses gêneros são grupos irmãos (CODRINGTON *ET AL.*, 2005). Para o Brasil, o único representante da família Araucariaceae é *Araucaria angustifolia* (Bertol.)Kuntze (MARCHIORI, 1996). Além do Brasil, a araucária encontra-se na Argentina e no Paraguai (GUERRA *ET AL.*, 2008).

No Brasil, a araucária se distribui geograficamente, nas latitudes de 19°15'S e 31°30'S e longitudes 41°30'O e 54°30'O (Seitz, 1986 apud GUERRA *ET AL.*, 2008); compreendendo os Estados do sul (GUERRA *ET AL.*, 2008), além de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (CARVALHO, 1994).

Nestes locais, a araucária é encontrada em regiões de altitude de 500 m até 1500 m no bioma Mata Atlântica; em distintas formações edáficas e em clima subtropical, com temperaturas variando de 10° C a 21° C (REITZ; KLEIN, 1966).

1.2 A DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA

A araucária é uma espécie arbórea com copa caliciforme, dioica com flores unissexuadas, com copada umbeliforme e longeva (MARCHIORI, 1996; PIVETTA, 2003).

As araucárias demoram 15 anos para adentrarem a idade reprodutiva (CARVALHO, 1994). Reitz e Klein (1966) estimam para um indivíduo adulto de araucária um porte de 50 m e diâmetro do tronco de 1-2 m.

As folhas coriáceas e lanceoladas (MARCHIORI, 1996), de margem aciculiforme caracterizam-se no epíteto específico da espécie. Já a coloração verde escura das folhas dá origem ao termo “mata-preta” para designar os pinheiros nativos brasileiros (REITZ; KLEIN, 1966; MARCHIORI, 1996).

Reprodutivamente, os estróbilos masculinos são cilíndricos, de 10 a 17 cm, e os femininos (pinha) são cônicos subarredondados 10 a 20 cm. O ciclo reprodutivo da araucária é de 20 a 24 meses, sendo a polinização nos meses de setembro e outubro (MANTOVANI *ET AL.*, 2004; ROGGE-RENNER, 2014).

Após a fecundação, as pinhas passam por uma longa maturação, aproximadamente 20 meses (MARCHIORI, 1996). Nesse processo, maturam até 150 sementes (KLEIN, 1960). A queda das sementes ocorre de março a junho (MANTOVANI *ET AL.*, 2004), sendo a dispersão das sementes é feita por aves e roedores (GUERRA *ET AL.*, 2008).

Ecologicamente, a araucária é uma planta pioneira e heliófita (GUERRA, SILVEIRA, *ET AL.*, 2000b). No ecossistema da Floresta Ombrófila Mista, o papel da espécie pioneira é ecologicamente relevante (VIEIRA DA SILVA *ET AL.*, 2011a), devido à ampla interação da araucária com espécimes da fauna, como por exemplo, a gralha, cutia, serelepe dentre outros (VIEIRA DA SILVA *ET AL.*, 2011a). Por esse motivo, a conservação da araucária implica também na manutenção das cadeias tróficas associadas à araucária.

O estabelecimento e desenvolvimento de araucária requerem tanto solos férteis (Handro, 1986 apud GUERRA, SILVEIRA, *ET AL.*, 2000b), quanto um longo período entre a polinização e a formação de sementes. Em razão disso, há uma dificuldade no estabelecimento e na produção de programas de reflorestamento (GUERRA, SILVEIRA, *ET AL.*, 2000b). Abrindo espaço para outras biotecnologias como a cultura de tecidos.

1.3 USO, A EXPLORAÇÃO COMERCIAL E CONSEQUÊNCIAS

O uso das araucárias historicamente encontrava-se atrelado ao consumo de sementes por povos indígenas do planalto e do litoral catarinense (SANTOS, 1973; DA SILVA; DOS REIS, 2009; DOS REIS *ET AL.*, 2014). Atualmente, o consumo de pinhão ainda permanece. A exploração é feita durante os meses de junho e julho, isto é, o período de maturação das pinhas por produtores donos dos remanescentes da mata nativa (GUERRA *ET AL.*, 2002a). Para Guerra *et al.* (2002a) a rentabilidade obtida pela venda de pinhões é 22% maior que aquela obtida com a exploração da madeira. Todavia, o comércio de pinhões durante muitos anos era tido como secundário, pois a prioridade era a exploração para fins madeireiros.

Segundo Reitz e Klein (1966), dos diferentes usos comerciais da araucária (ornamental, como “árvore de natal”; para resinas, como base para indústria de verniz; e moveleira), destes o uso moveleiro da araucária foi o mais expressivo. A madeira de araucária também é útil para a confecção de papel de alta qualidade pela proporção das percentagens de celulose (58.3%) e de lignina (28.5%) (GUERRA, SILVEIRA, *ET AL.*, 2000b). Para Klein (1960), a araucária foi uma das maiores riquezas madeireira do Brasil. Mais ainda, durante a década de 60, a araucária era o quarto produto de maior exportação nacional (REITZ; KLEIN, 1966).

A intensa exploração madeireira e a ocupação agrícola nos locais de ocorrência causaram uma modificação na paisagem florestal, fragmentando e comprometendo as populações de araucária. Essa fragmentação gerou endogamia, redução da diversidade genética e, por conseguinte, também a perda da capacidade adaptativa às mudanças ambientais (GUERRA *ET AL.*, 2008) e consequente ameaça à espécie.

No Brasil, a araucária é tida como espécie ameaçada de extinção (MMA, 2008), já a *IUCN Red list of Threatened Species* a classifica como criticamente ameaçada (DSMA, 2011a; IUCN, 2014). Também para o Estado de Santa Catarina, a espécie é classificada como criticamente ameaçada, conforme o II Workshop sobre a lista das espécies da flora catarinense ameaçada de extinção (DSMA, 2011a).

Mesmo ameaçada de extinção, a comercialização da araucária carece regulamentação pelo CITES (Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção) (CITES, 2014). Por conseguinte, a comercialização ilegal ainda ocorre (BRASIL, 2009; ASCOM, 2011). Essa falta de medidas legais de proteção e do estímulo ao reflorestamento, como por exemplo, pela criação de incentivos fiscais (GUERRA *ET AL.*, 2002a), resultam na perda persistente de habitat. Numericamente, a espécie que outrora ocupava cerca de 200 mil Km², hoje tem sua área reduzida a apenas 2% (GUERRA *ET AL.*, 2008). A presença de araucária hoje está restrita aos relictos nas unidades de conservação das regiões sul.

1.4 RECURSOS GENÉTICOS E A CONSERVAÇÃO DA ARAUCÁRIA

Se por um lado a araucária é um importante recurso econômico e ecológico, por outro, seu estado de conservação é alarmante. A fim de salvaguardar este importante recurso genético, a conservação pelo uso

vem sendo citada como uma alternativa para manter a conservação da araucária (VIEIRA DA SILVA *ET AL.*, 2011b). Como propõe a CDB (Convenção sobre a Diversidade Biológica), artigo 6 (MMA, 2000a), a conservação pelo uso é uma alternativa eficaz

“importância absoluta para atender as necessidades de alimentação, de saúde e de outra natureza da crescente população mundial, que são essenciais ao acesso e a repartição dos recursos genéticos e tecnologia”.

A CDB foi adotada pelo Ministério do Meio Ambiente e, portanto, a conservação pelo uso, também se encontra legalmente amparada pelas leis nacionais por meio de portarias interministeriais como a MDS, MDA e MMA n. 239 de 21/07/2009.

Para a araucária programas de conservação pelo uso são especialmente importantes, pois a semente da araucária é uma das formas de subsistência familiar. Durante a época de maturação das sementes, famílias agricultoras de baixa renda fazem a extração e comercialização das sementes legalmente ou de forma clandestina em áreas de conservação (DA SILVA; DOS REIS, 2009; DANNER *ET AL.*, 2012).

Apesar da existência de um nicho mercado, a cadeia a cadeia produtiva do pinhão ainda encontra-se defasada (VIEIRA DA SILVA *ET AL.*, 2011a), ocasionando variações da oferta e procura do produto no mercado nacional. Dos inúmeros motivos, ressalta-se a necessidade da produção de novas mudas. Com mais mudas poder-se-iam atender às famílias que desejam comercializar o pinhão reduzindo a extração clandestina e favorecendo a inserção de novos indivíduos de araucária na população.

A propagação de novas mudas pode ser feita com o uso de variadas técnicas, entre as quais a cultura de tecidos. A cultura de tecidos é o cultivo *in vitro* de células, tecidos, órgãos ou de planta inteira em controladas condições físico-químicas (THORPE, 2007; AKIN-IDOWU *ET AL.*, 2009). Um único explante multiplicado *in vitro* pode gerar milhares de plantas em curto período de tempo (AKIN-IDOWU *ET AL.*, 2009), independentemente de época do ano e local (HUSSAIN *ET AL.*, 2012).

Além disso, para espécies ameaçadas e com sementes recalcitrantes, como a araucária (FARRANT *ET AL.*, 1989; FARIAS-

SOARES *ET AL.*, 2013), que não podem ser armazenadas em banco de sementes, encontram na cultura de tecidos uma forma de conservação *ex situ*, através dos bancos de germoplasma e da criopreservação.

Assim a cultura de tecidos responde igualmente a duas demandas presentes para araucária: 1) micropropagação clonal em larga escala de genótipos de plantas de interesse; 2) conservação *ex situ* do recurso genético da araucária, através de criopreservação e dos bancos de germoplasma.

Impulsionado por isso, o grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal (LFDGV/CCA/UFSC), em parceria com o Núcleo de Pesquisas em Florestas Tropicais (NPFT/CCA/UFSC) vem desenvolvendo ao longo de 24 anos protocolos e estudos com a embriogênese somática e zigótica de araucária. Por meio destes estudos deu-se contribuições significativas à biologia do desenvolvimento da araucária, bem como ao estabelecimento de protocolos para o cultivo *in vitro*. O maior avanço no protocolo de propagação *in vitro* até então, foi obtido por Steiner (2009) onde foi obtido um embrião somático cotiledonar maduro. Apesar disso, a reprodução desse evento ainda não foi possível e o protocolo de embriogênese somática em araucária apresenta gargalos que necessitam maiores estudos.

Para Steiner (2009), existem dois gargalos no protocolo da embriogênese somática em araucária, um deles está na passagem da fase pró-embriônica para a embriogênese inicial. Nesse sentido, calcar sólidas informações sobre a fase pró-embriônica favorecerá uma maior compreensão da biologia da araucária e, possivelmente, fornecerá dados para futuros estudos em embriogênese somática em araucária.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CONÍFERAS

A diferenciação de células somáticas em embriões bipolares morfológicamente análogos aos embriões zigóticos é conhecida como embriogênese somática (VON ARNOLD *ET AL.*, 2002; VON ARNOLD, 2008). Na embriogênese somática uma única célula pode dar origem a uma nova planta. Nesse processo ocorrem complexas reconfigurações em nível: genético, epigenético, bioquímico e hormonal (FEHÉR *ET AL.*, 2003; GEORGE *ET AL.*, 2008). Essas reconfigurações promoverão tanto uma polarização quanto divisões assimétricas (DODEMAN *ET AL.*, 1997), alterando o destino celular (LAUX; JÜRGENS, 1997; VON ARNOLD, 2008) e promovendo a formação de um novo embrião.

A compreensão do processo e de como ocorre a formação de uma planta a partir de uma única célula é ainda uma das 125 questões mais relevantes da ciência moderna (VOGEL, 2005). Motivado por essa pergunta, a embriogênese somática tem sido usada como um modelo de estudo sobre a totipotencialidade, destino celular, a flexibilidade e responsividade das células vegetais além dos processos envolvidos na rota morfogenética da embriogênese (VOGEL, 2005; VON ARNOLD, 2008; STEINER *ET AL.*, 2015).

Para coníferas outras vantagens e aplicabilidades são ressaltadas na literatura. Para Von Arnold (2008), uma primeira vantagem da embriogênese é sua aplicabilidade em propagação em larga escala com uso de suspensões celulares e biorreatores. Somado a isso, há uma segunda possibilidade de criopreservar as culturas embriogênicas ou os embriões somáticos. A criopreservação é abordada em projetos de conservação com bancos de germoplasma (VON ARNOLD, 2008), sobretudo, para espécies recalcitrantes, como a araucária (STEFENON *ET AL.*, 2009; DEMARCHI *ET AL.*, 2014; FRAGA *ET AL.*, 2015).

Uma terceira vantagem da embriogênese somática em coníferas está em produzir culturas para a transformação genética (VON ARNOLD, 2008). A transformação genética aliada a programas de melhoramento são alternativas relevantes usadas para driblar lento ciclo de vida das coníferas e obter linhagens comerciais (KLIMASZEWSKA; CYR, 2002; TEIXEIRA DA SILVA; MALABADI, 2015).

Adicionalmente, um quarto benefício para a indústria florestal é o baixo custo vinculado à produção de mudas uniformes (STASOLLA; YEUNG, 2003). Tais vantagens fazem com que embriogênese somática

ao longo dos últimos 20 anos seja uma das principais rotas morfogênicas em coníferas (STASOLLA; YEUNG, 2003).

O primeiro trabalho com coníferas a obter embriões somáticos foi feito por Durzan e Chalupa (1976) com *Pinus banksiana* (Lamb.) (Pinaceae) utilizando o sistema de suspensão celular. Desde então, observou-se que tanto tecidos gaméticos como somáticos originam culturas embriogênicas (GUERRA, SILVEIRA, SANTOS, *ET AL.*, 2000).

A embriogênese somática pode ocorrer de duas formas, diretamente ou indiretamente (EVANS *ET AL.*, 1983; GEORGE *ET AL.*, 2008). A embriogênese somática direta é um processo contínuo, da célula somática ao embrião. Distintamente, a embriogênese somática indireta apresenta uma etapa com calos, ou seja, um aglomerado de células totipotentes, amorfas, desorganizadas e sem polaridade (GEORGE *ET AL.*, 2008).

Dois grandes fases são descritas em rotas para a embriogênese somática de coníferas: 1) a iniciação/multiplicação; e 2) a fase de maturação (STEINER *ET AL.*, 2008) (Figura 1). No processo de diferenciação de uma célula a um embrião, Von Arnold *et al.* (2002) propõem uma subdivisão dessas duas fases em cinco etapas: 1) iniciação das culturas embriogênicas; 2) proliferação; 3) pré-maturação; 4) maturação e 5) desenvolvimento de plântulas. As fases descritas por Von Arnold *et al.* (2002) foram sumarizadas na Figura 1, tendo como planta modelo araucária.

Durante as fases de iniciação e a proliferação verifica-se um padrão cíclico entre massas pró-embriônicas (proembryonary masses – PEM) I, II e III, Figura 1 (*vide ciclo menor interior bloco 2*). As PEM são estruturas celulares caracterizadas presença de: células embriônicas, embriônicas do tubo e suspensoras. As células embriônicas (EC) são isodiamétricas, com núcleos grandes, com citoplasma denso e pequenos pró-vacúolos; as embriônicas do tubo (TC) apresentam um alongamento celular com vacúolos maiores; já as células do suspensor (SC) são alongadas com um grande vacúolo (STEINER *ET AL.*, 2015). Conforme Steiner *et al.* (2015), as PEM I são agregados pequenos de EC com um ou duas células SC. Já as PEM II são agregados intermediários, com um número maior de EC e SC que as PEM I. As PEM III são grandes agregados celulares desprovidos de polaridade e formados por um número maior de EC conectadas as SC.

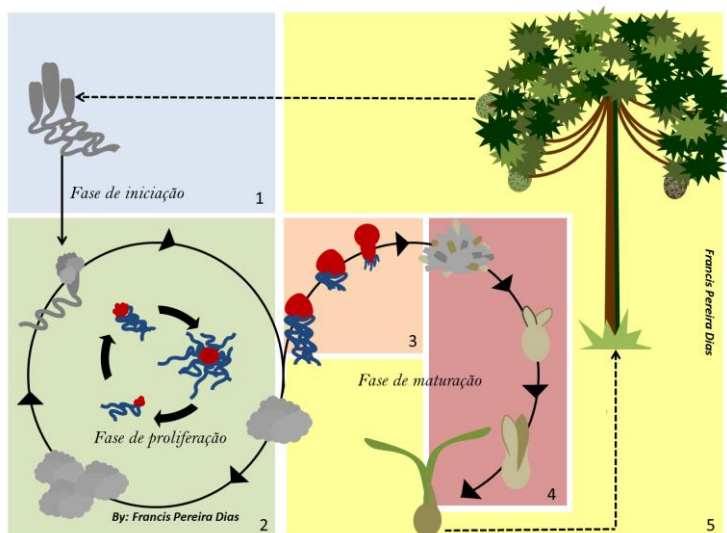


Figura 1: Fases da embriogênese somática em *A. angustifolia*. Fase de iniciação (1): um embrião zigótico dará origem a culturas embriogênicas. Na poliembriogênese, um dos embriões é dominante e os demais acessórios. Durante a fase de proliferação (2), são induzidas multiplicações celulares. As culturas caracterizam-se pela cor branca-translúcidas. Celularmente, são cíclicas entre as PEM I, II e III. Segue um período de pré-maturação com a polarização das PEMs (3). Fase de maturação com a formação de embriões cotiledonares e a plântula (4).

Já durante fases de pré-maturação verifica-se a presença de uma transição de PEM III para embrião somático inicial (early somatic embryo) (FARIAS-SOARES *ET AL.*, 2014; STEINER *ET AL.*, 2015). Nessa fase, verifica-se a presença de estruturas polarizadas, compactas em forma de *cluster* que emergem das PEMs III Figura 1 (*vide bloco 3*).

Na fase de maturação o processo de polarização se intensifica e as estruturas celulares encontram-se isoladas já independentes das PEM III Figura 1 (*vide bloco 3*). Neste período inicia-se a redução do número de SC por meio de morte celular programada (FILANOVA *ET AL.*, 2000; VON ARNOLD *ET AL.*, 2002). Segundo Von Arnold *et al.* (2002), forma-se uma opaca massa embrionária de células de denso citoplasma. O alongamento do embrião e a diferenciação dos cotilédones se dão à medida que se chega ao final da maturação (VON ARNOLD *ET AL.*, 2002; STEINER *ET AL.*, 2008). Nesta fase, o embrião somático se assemelha ao embrião zigótico, e pode ser germinado em meio de cultura isento de

fitorreguladores até que o desenvolvimento das raízes esteja formado para aclimatização *ex vitro* (HÖGBERG, 2003; STEINER, 2009).

Para que a transição entre essas fases aconteça são empregadas variações nas concentrações de fitorreguladores e também se oscila a presença e ausência dos fitorreguladores no meio de cultura. Para a etapa de iniciação e proliferação predominam as auxinas e também citocininas; já na maturação o meio é suplementado com ácido abscísico e/ou o potencial osmótico é reduzido (VON ARNOLD *ET AL.*, 2002). Distintamente, a fase de pré-maturação como a de desenvolvimento de plântulas se caracterizariam pela ausência de fitorreguladores (VON ARNOLD *ET AL.*, 2002). Variações dessas etapas são feitas para atender as particularidades de cada conífera, mas não tem sido obtido o protocolo completo para todas as espécies. Para Tautorus *et al.* (1991), a escolha equivocada do tecido do explante leva a formação de calos não-embriogênicos e, por conseguinte uma linhagem de culturas não responsivas ao protocolo.

Além desses fitorreguladores, sabe-se hoje que no processo de formação do embrião somático atuam: estresse; proteínas extracelulares; além das auxinas, novos hormônios (SA e BR); cálcio, aminoácidos e alguns genes (SERK e WUS) (TEIXEIRA DA SILVA; MALABADI, 2015). Duas principais abordagens buscam explicar como se dá a conversão de células somáticas em embriões (TEIXEIRA DA SILVA; MALABADI, 2015). A primeira delas alega que o estresse (TEIXEIRA DA SILVA; MALABADI, 2015), sobretudo causado presença de hormônios; levaria a desdiferenciação celular e rediferenciação em embriões somáticos. Essa abordagem é semelhante àquela descrita por Von Arnold *et al.* (2002), onde a mudança de fitorreguladores permite o avanço na obtenção de embriões. Uma segunda abordagem, mais genética, afirma ser a fina regulação meristemática e expressão do gene WUS (TEIXEIRA DA SILVA; MALABADI, 2015) os responsáveis para a obtenção de embriões somáticos em coníferas. Essas abordagens embora tenham um viés distinto, não são excludentes, complementam-se na perspectiva da biologia de sistemas. Uma análise que associe a fisiologia com a genética, buscando as relações entre ambas, possivelmente seja o caminho para responder a indagação de Vogel (2005): como uma única célula somática vira uma planta?

2.1.1 Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia*

Os estudos sobre embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* iniciaram-se com Handro e Ferreira (1980), porém poucos calos conseguiram sobreviver após seis meses de subcultivo. Na década de 90, os trabalhos de Guerra e Kemper (1992) e Guerra *et al.* (1993), avançaram no protocolo e foram obtidos calos friáveis, brancos e translúcidos passíveis de longa propagação *in vitro*.

Dentre as motivações que levaram a escolha da embriogênese somática como rota morfogenética para o estudo de araucária estava a ocorrência natural de poliembrionia nas sementes imaturas de araucária (ASTARITA; GUERRA, 1998) e o sucesso na obtenção de embriões somáticos em outras coníferas com a mesma procedência, ou seja, a partir de embriões imaturos (Durzan, 1988b; a; Durzan; Gupta, 1988).

A partir dos trabalhos de Guerra, Silveira, *et al.* (2000a) e de Silveira *et al.* (2002) se estabelece que a maior frequência de explantes é obtida quando este advém de embriões imaturos na fase pré-cotiledonar. Esta fase corresponde aos meses de dezembro à fevereiro na coleta das pinhas (ASTARITA; GUERRA, 1998).

No modelo de embriogênese somática de araucária, Figura 1, observam-se tanto mudanças morfológicas do embrião zigótico à plântula, como também nas diferentes fases da embriogênese classificadas por Von Arnold *et al.* (2002). A progressão dessas fases acontece mediante alterações nos componentes do meio de cultura, suas concentrações e estímulos ambientais externos (luz e temperatura). A obtenção de embriões somáticos maduros foi registrado apenas uma vez (STEINER *ET AL.*, 2008), indicando ser possível a obtenção uma plântula. Todavia, desde o evento de Steiner *et al.* (2008), tem-se buscado variadas metodologias para a reprodução e obtenção de um protocolo final para a embriogênese somática em araucária. Os trabalhos de Jo *et al.* (2014) estão dentre os mais recentes a retomarem os esforços e apontarem novos avanços no protocolo.

Nesse sentido, várias formulações de meio de cultura foram testadas: resumidas na Tabela 1. O meio de cultura com maior frequência de uso foi o BM. O uso da formulação BM (GUPTA; PULLMAN, 1991), segundo Steiner *et al.* (2008) deve-se à reponsividade para iniciação e proliferação das culturas.

Dentre as fontes de carbono disponíveis sacarose, frutose e maltose nas formulações de meio de cultura, predomina a sacarose. Isso porque a sacarose é rapidamente hidrolisada em frutose e glicose (ASTARITA; GUERRA, 2000). Por consequência, não apenas favorece a

proliferação das PEMs (ASTARITA; GUERRA, 2000), como também, as maiores taxas de embriões (DOS SANTOS *ET AL.*, 2008). Apesar disso, combinações entre sacarose e maltose parecem favorecer o desenvolvimento e a maturação a embriões (DOS SANTOS *ET AL.*, 2008).

Durante a fase de proliferação, muitos trabalhos acrescentam fitorreguladores auxínicos e citocinínicos (STEINER *ET AL.*, 2005; STEINER, 2009). Além dos fitorreguladores, nessa fase também observou-se que o acréscimo de putrescinas e a alta concentração de óxido nítrico favorecem à multiplicação das culturas (SILVEIRA *ET AL.*, 2006; STEINER *ET AL.*, 2007; STEINER *ET AL.*, 2008).

A adição de fitorreguladores como auxinas é associada à promoção e acúmulo de auxinas endógenas (IAA) que, por conseguinte, induzem uma maior competência embriogênicas (STEINER *ET AL.*, 2007). Todavia, também é associada aos fitorreguladores, principalmente auxínicos, à redução na habilidade das PEMs se converterem em embriões somáticos. Korklach e Zoglauer (1995), explicam que em presença de fitorreguladores auxínicos são formados pró-embriões não polares, e incapazes de avançar para fases de maturação.

Em decorrência do exposto, foram testadas a indução e proliferação das culturas em ausência ou com substitutivos de fitorreguladores. O trabalho de Silveira *et al.* (2002) foi pioneiro e demonstrou a indução e maturação em meio livre de fitorreguladores. Steiner *et al.* (2005) corroborou ao confirmar redução no crescimento na fase de proliferação celular quando empregado auxinas fortes (2-4D 5 μ M) associado à maltose e outros componentes (BAP e KIN). Adicionalmente, o único protocolo a obter embrião somático de araucária, tendo a fase de maturação livre de auxinas foi Steiner *et al.* (2008). Nesse sentido o emprego de fitorreguladores foi demonstrado como não essencial para a indução e proliferação da araucária; e, se empregados fitorreguladores auxínicos, sua retirada deve se dar antes da etapa da maturação (STEFENON *ET AL.*, 2009), a fim de que a polarização das PEMs possa ocorrer e o embrião somático forme-se.

Se a maturação sem fitorreguladores é vantajosa, outros componentes do meio de cultura devem atuar para estimular a polarização sem perder a competência embriogênicas. O principal candidato testado são as poliaminas, espermidina e esperminas. Estas quando associadas à baixa concentração de óxido nítrico promoveram a diferenciação celular e, conseqüente maturação (STEINER *ET AL.*, 2008).

As poliaminas poderiam estar induzindo a produção de óxido nítrico e influenciando a embriogênese somática da araucária (DUTRA *ET AL.*, 2013). O mecanismo de ação proposto seria que as poliaminas do

meio de cultura estimulariam a produção endógena de poliaminas e auxinas. Como consequência, as próprias auxinas endógenas haveriam de promover a polarização sem a perda da capacidade de maturação (STEINER *ET AL.*, 2008). Por isso, o emprego de poliaminas seria um candidato para a substituição de fitorreguladores como o 2-4D.

Além das poliaminas, os trabalhos de Silveira *et al.* (2002); Steiner *et al.* (2008), observaram que a maturação das culturas de araucária também pode ser feita no meio de cultura BM, desde que seja suplementada com polietilenoglicol, maltose e ABA. O uso do ABA foi amplamente testado por Dos Santos, *et al.* (2002), concentrações de 5 à 240 μ M foram incapazes de levar a maturação de embriões somáticos. Corroborando com Dos Santos, *et al.* (2002), Farias-Soares *et al.* (2014) testou o mecanismo oposto, isto é, a inibição do ABA. O trabalho de Farias-Soares *et al.* (2014) mostrou que o uso de inibidores de ABA era eficiente no processo de pré-maturação dos embriões de *A. angustifolia*.

Apesar dos vastos avanços no conhecimento da biologia da *A. angustifolia* ainda não foi obtido a completa regeneração de plantas usando a embriogênese somática como rota.

Tabela 1: Sumarização das formulações de meio de cultura, suplementações e fitorreguladores empregados nos diferentes estudos com embriogênese somática de *Araucaria angustifolia*.

MS	BM	LP	MSG	LM	BLG	KNOP	DMH
Handro e Ferreira (1980), Maene e Deberch (1987), Guerra e Kemper (1992), Astarita e Guerra (1998), Silveira, Dos Santos, <i>et al.</i> (1999)	Silveira, Steiner, <i>et al.</i> (1999), Steiner <i>et al.</i> (2005); (STEINER <i>ET AL.</i> , 2007; DOS SANTOS <i>ET AL.</i> , 2008; STEINER <i>ET AL.</i> , 2008; VALENTE <i>ET AL.</i> , 2012; DUTRA <i>ET AL.</i> , 2013; FARIAS-SOARES <i>ET AL.</i> , 2013; FARIAS-SOARES <i>ET AL.</i> , 2014; FRAGA <i>ET AL.</i> , 2015; STEINER <i>ET AL.</i> , 2015; FRAGA <i>ET AL.</i> , 2016) Steiner <i>et al.</i> (2005), Steiner <i>et al.</i> (2007), Steiner <i>et al.</i> (2008), Dos Santos <i>et al.</i> (2008), Maurer <i>et al.</i> (2010), Valente <i>et al.</i> (2012), Dutra <i>et al.</i> (2013), Farias-Soares <i>et al.</i> (2014), Fraga <i>et al.</i> (2015), Fraga <i>et al.</i> (2016)	Guerra e Kemper (1992), Astarita e Guerra (1998), Silveira, Dos Santos, <i>et al.</i> (1999), Astarita e Guerra (2000), Silveira <i>et al.</i> (2002)	Dos Santos <i>et al.</i> (2008), Vieira <i>et al.</i> (2012), Jo <i>et al.</i> (2014)	Dos Santos <i>et al.</i> (2008)	Dos Santos <i>et al.</i> (2008)	Handro e Ferreira (1980), Maene e Deberch (1987)	Guerra e Kemper (1992)

2.2 SUSPENSÕES CELULARES

Dentre as técnicas de cultivo, as suspensões celulares permitem o crescimento e divisão celular por meio de uma produção massal.

Esta técnica foi utilizada desde os primórdios da cultura de tecidos quando Steward *et al.* (1958) obtiveram os primeiros embriões via embriogênese somática em cenoura. Assim, compreendeu-se que as células quando em suspensão celular não apenas se multiplicam como também se histodiferenciam.

Adicionalmente, o sistema de suspensão celular proporcionou uma multiplicação rápida de massa fresca quando comparado à outras formas de cultivo. Silveira *et al.* (2002), com formulação de meio LP, obtiveram um incremento de 5,6 x após um mês em sistema de suspensão celular. Os mesmos autores quando testaram a presença de fitorreguladores auxínicos e citocinínicos observaram um incremento 7,8 x ao cultivo com meio gelificado após 54 dias de cultivo (SILVEIRA *ET AL.*, 2002).

Atrelado a isso, Steiner *et al.* (2008) cita como outra vantagem a reduzida manipulação e risco de contaminação das suspensões celulares em relação a outras metodologias de cultivo. Conjuntamente, a rapidez, alto incremento e baixa contaminação são economicamente importantes para a produção industrial em sistemas de biofábricas.

Não resumido à produção, o sistema de suspensão celular é também um sistema de estudo sobre o crescimento e dos processos de rediferenciação e dediferenciação celular. Segundo Guerra, Silveira, *et al.* (2000a), a suspensão celular permite estudar crescimento por meio do volume celular sedimentado, índice mitótico, massa fresca e do massa seca; como também, parâmetros bioquímicos e fisiológicos (SILVEIRA *ET AL.*, 2006; STEINER *ET AL.*, 2008). Para Steiner *et al.* (2008), o estudo da biologia do desenvolvimento é essencial para a elucidação dos mecanismos atrelados à embriogênese somática. Portanto, dos mecanismos envolvidos na plasticidade celular vegetal.

Somadas, as vantagens e estratégia metodológica de estudo fizeram da suspensão celular uma forma de cultivo amplamente usada em coníferas. Variadas espécies foram estudadas: *Pinus taeda* L. (SILVEIRA *ET AL.*, 2004); *Picea glauca-engelmannii* e *P. mariana* (LULSDORF *ET AL.*, 1992); *P. abies* (VON ARNOLD *ET AL.*, 1995); dentre estas, também a *A. angustifolia* (SILVEIRA *ET AL.*, 2002; STEINER, 2009; MAURER *ET AL.*, 2010; VIEIRA, 2011; FARIAS-SOARES *ET AL.*, 2014).

Em *A. angustifolia*, o sistema de suspensão celular elucidou a presença de poliaminas durante o crescimento de culturas (SILVEIRA *ET AL.*, 2002; 2006). Esses estudos corroboraram para a maior compreensão da embriogênese somática em araucária.

Os mesmos autores verificaram um crescimento mais acelerado quando as células estavam em meio isento de fitorreguladores, demonstrando que fitorreguladores não são essenciais para a indução e multiplicação de *A. angustifolia* (SILVEIRA *ET AL.*, 2002; STEINER *ET AL.*, 2008).

A curva de crescimento de culturas embriogênicas em suspensão celular é sigmoidal (SZABADOS *ET AL.*, 1993). É composta das fases inicial, exponencial, linear, estacionária e declínio. O crescimento das culturas se dá pela alta taxa mitótica durante as fases exponencial e linear (STEINER *ET AL.*, 2008). Não obstante, há casos em que o índice de mitótico é maior, inicialmente, até o terceiro dia de cultivo em suspensão celular (SZABADOS *ET AL.*, 1993).

Atualmente, suspensão celular vem sendo empregada para o estudo de biologia celular e para o *scale-up* de culturas embrionárias desta espécie. Substâncias secretadas ao meio de cultura também são alvos de estudos em suspensão celular. Maurer *et al.* (2010) encontrou a produção de arabinogalactanas. Fraga *et al.* (2016) encontrou terpenóides em meio gelificado. A produção de terpenóides se aprimorada poderá ter grande interesse farmacêutico e, para tanto, suspensões celulares é uma das alternativas de cultivo mais adequadas para a obtenção desse composto. Para tanto, a compreensão do crescimento celular é chave para avanços em protocolos com embriogênese somática.

2.3 ANÁLISE PROTEÔMICA

O termo “proteoma” advém da definição dada por Mark Wilkins, segundo a qual se refere ao “complemento total de proteína de um genoma” (BALBUENA, DIAS, *ET AL.*, 2011). Noutras palavras, corresponde ao conteúdo proteico expresso pelo genoma (JACOBS *ET AL.*, 2000), em face de certas condições fisiológicas (BALBUENA, DIAS, *ET AL.*, 2011).

O estudo da proteômica é uma alternativa mais holística de estudar a expressão gênica (CULLIS, 2004). As análises proteômicas

informam um perfil proteico de uma célula ou tecido num dado tempo. Assim, é possível entender não apenas os genes com seus produtos proteicos individuais, mas também, a operação concomitante de muitos genes (CULLIS, 2004).

A proteômica esclarece ainda como se dá as interações entre proteínas. Isso é importante, pois as proteínas são moléculas envolvidas em quase todos os processos celulares, nas mais diversas funções, como enzimas de catálise, transporte, suporte mecânico, constituintes de organelas, controle metabólico, mecanismos de proteção, toxinas e controle da pressão osmótica (HELDT *ET AL.*, 2011). Atualmente ferramentas como mapas conceituais vêm permitindo criar conexões entre essas proteínas identificadas, alocando-as de modo visual em suas rotas metabólicas.

Segundo Cullis (2004), são três as etapas de preparação de proteínas: separação, identificação, análise. Dentre as metodologias para caracterizar as proteínas encontram-se: gel bidimensional (2-DE), análise de imagens, microsequenciamento proteico e espectrometria de massa.

Na abordagem da proteômica com o gel de eletroforese de poliacrilamida bidimensional (2-DE), a separação é feita em duas etapas. Conforme Cangahuala-Inocente (2007), na primeira etapa, utiliza-se um potencial isoelétrico (IEF), segregando as proteínas com base a seu ponto isoelétrico. A segunda separação é feita pelo peso molecular das proteínas, num do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (CANGAHUALA-INOCENTE, 2007).

Em suma, por detrás das metodologias da proteômica estão as características físico-químicas (solubilidade ou massa molecular) ou propriedades biológicas (ligação com seus anticorpos ou distribuição subcelular) das proteínas (THIELLEMENT *ET AL.*, 2007).

Em araucária, a análise proteômica foi realizada ao longo de todo o desenvolvimento do embrião somático, isto é, uma comparação entre as fases pró-embriônica, com a embriogênese inicial e final (STEINER, 2009). O trabalho de Steiner (2009) apontara para o estágio mais tardio da embriogênese com maior acúmulo de proteínas totais e a presença de proteínas de reserva. Além destas proteínas, Jo *et al.* (2014) comparando culturas embriogênicas de não embriogênicas, observou que as embriogênicas possuíam a expressão de S-adenosilmetionil sintetase e as não embriogênicas a presença de NADH desidrogenase subunidade F. A presença destas proteínas seria ainda um ou não

indicativo da responsividade das culturas a maturação (JO *ET AL.*, 2014) por apontarem se as amostras estão ou não sofrendo estresse oxidativo.

Fraga *et al.* (2016) estudando a proteômica de culturas em presença e ausência de fitorreguladores indentificaram identificou a expressão de proteínas PIN-like, proteínas associadas ao estresse e terpenóides em culturas subcultivadas por até um ano em meio semissólido.

Apesar das grandes contribuições que foram feitas ao conhecimento de proteômica de araucária, resta ainda entender quais são as proteínas envolvidas nos pontos críticos de desenvolvimento e melhor caracterizar a biologia das massas proembrionárias.

Assim, o presente trabalho poderá gerar informações relevantes associadas ao ciclo das massas proembrionárias em suspensão celular e alçar bases para futuros estudos e desenvolvimento de protocolos regenerativos baseados na embriogênese somática.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em sistema de suspensão celular em seus aspectos estruturais, fisiológicos e bioquímicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Durante as fases da curva de crescimento: zero, inicial, exponencial, linear e estacionária, buscou-se:

- i. Avaliar o crescimento das culturas embriogênicas em suspensões celulares;
- ii. Caracterizar as proteínas atuantes e sua expressão nestas culturas;
- iii. Avaliar histoquimicamente as células embriogênicas e não-embriogênicas;
- iv. Avaliar bioquimicamente o meio de cultura das culturas pró-embriônicas;

4 ARTIGO

The suspension cell system of *Araucaria angustifolia*: biochemical, and histochemical approaches

4.1 ABSTRACT

Brazilian-pine (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, Araucariaceae) is a native Southern American conifer with great economic and ecological value. Aiming conservation through use, various protocols of mass propagation based on somatic embryogenesis using cell suspension, were developed. The precise time for subculturing has not been established yet the knowledge of cell growth dynamics of the embryogenic cultures is still scanty. The present work used proteomic, biochemical, and histochemical approaches in order to characterize the dynamic growth of cell suspensions of *A. angustifolia*. Embryogenic cultures were cultivated in liquid BM modified medium, in Steward's apparatus. The growth dynamics was evaluated based on cell volume after sedimentation, fresh weight, mitotic index, conductivity, pH, number of PEMs, histochemical tests, viability, and cell death. Among expressed proteins auxin, cytoskeleton, metabolism and storage related proteins were the most relevant. Through time cell viability is lost and the pH decreases, and conductivity is highest at exponential phase. Cell death increases after 14 days, and stress related proteins are expressed. Among the cell types the PEMIII is the most frequent type and embryogenic and non-embryogenic cells types are histochemically different. The highest value of fresh weight increment (139%) occurs at the exponential phase (14 days), being thus the best time for subculturing.

Key words: Brazilian-pine; cell suspension; proteomic; proembryonic masses; somatic embryogenesis.

4.2 INTRODUCTION

Traditionally, forest resources have been associated as an important complex community with high ecologic and economical importance. On the last few decades, Forest Science has gain new matters of interest, especially with the growing deforestation and the forest ecosystem services. Although, Brazilian Forests present display an important role and impact in global climate historically the its forests were overexploited.

In Brazil, timber exportation and its derivatives were one of the country's main economical products both in XV century (*Caesalpinia echinata* Lam.) and in the XX century (*Hevea brasiliensis* L. and *Araucaria angustifolia* Bertol. Kuntze). In 1912, an important timber product exploited in Brazil was the Brazilian-pine tree (*A. angustifolia*).

Araucaria angustifolia is a native conifer with high quality wood and various derivatives products (GUERRA, SILVEIRA, ET AL., 2000a). The wood of the Brazilian-pine tree was mainly exported to Europe by the Southern Brazil Lumber and Colonization Company (CARVALHO, 2006). Just during the year 1912, the company obtained a profit of 1.611:537\$ Réis (CARVALHO, 2006). In 1960's the wood from Brazilian-pine trees was Brazil's fourth highest exportation product (REITZ; KLEIN, 1966), which represented an average number of 1094531m³ of shipped wood (CARVALHO, 2010).

The excessive exploitation threatened this species and its forest ecosystem. *Araucaria angustifolia* is cataloged as vulnerable by the IUCN (DSMA, 2011b; IUCN, 2014), together with it, are other species considered also threatened: *Ocotea odorifera* (Rowher), *O. catharinenses* (Mez), *O. porosa* (Nees & Mart.) Barroso, *Dicksonia sellowiana* (Hook.), *Chrysocyon brachyurus* (Illiger), *Cyanocorax caeruleus* (Vieillot), *Tapirus terrestris* (Linnaeus), *Amazona vinaceae* (Kuhl), *Panthera onca* (Linnaeus), (MMA, 2002; MARTINS-RAMOS ET AL., 2011).

Still today *A. angustifolia* has cultural value and market interest due to consume of the pine nut (seed). The seed market for consume is considered to earn 22% higher profit than regular wood exploitation (GUERRA ET AL., 2002b). Besides of the higher profits, seed consumption also stimulates planting and growth of new trees. This leads to increase conservation through use, a highly stimulated conservation action by the international comities and the Convention for Biodiversity (MMA, 2000b). *Ex situ* conservation of the Brazilian-pine tree, has required the use of tissue culture, as an alternative to store

despite the recalcitrant condition of the seeds that do not tolerate dissection (FARRANT *ET AL.*, 1989; PIERUZZI *ET AL.*, 2011).

In addition, it is aimed by the suspension cell system to maximize production in a short time, but the optimum time to subcultivate *A. angustifolia* is not yet fully determined. The literature shows a variation: Farias-Soares *et al.* (2014) subcultivated every two weeks, yet Vieira (2011) and Fraga *et al.* (2015) each 20-21 days. Because the cell growth dynamics is based on time, it can also provide the answer to when there is maximum production of cells without losing quality and cell viability.

The present work aims to characterize the proteomic expression and describe biochemically and histochemical *A. angustifolia* cell growth dynamics under the cell suspension system. By doing that, also point out the best giving for subculturing *A. angustifolia* in the massive propagation.

4.3 MATERIAL AND METHODS

Cell culture media and multiplication

Female cones with immature embryos were collected in Lages (Santa Catarina, Brazil) (Figures 1A-C). The immature zygotic embryos (STEINER *ET AL.*, 2005) were used as primary explant (Figures 1D-E).

Embryogenic cultures were obtained following the methodology and medium formulation proposed by Dos Santos, *et al.* (2002) (BM0 growth regulators free medium (GUPTA; PULLMAN, 1991)). The cultures were maintained in Petri dishes (100 x 15 mm) containing 25 mL of semi-solid culture media in dark (25 ± 2 °C). Subculturing was done each 15 days.

After established cultures in petri dishes, cell cultures (2 g) were inoculated in 100 mL liquid the same BM0 modified medium, in nipple flasks on a Steward's apparatus (slow orbital agitator, 1 rpm) (SILVEIRA *ET AL.*, 2002; DOS SANTOS *ET AL.*, 2010; FARIAS-SOARES *ET AL.*, 2014) (Figure 1F-G).

Cell culture growth dynamics

The growth dynamics of the cell cultures was evaluated by two complementary methodologies: an invasive (fresh weight - FW) and a non-invasive (cell volume after sedimentation - CVS) (MUSTAFA *ET AL.*, 2011).

The cell volume after sedimentation was measured, after 40 min of sedimentation on vertical position, using at least four modified nipple flask (SILVEIRA *ET AL.*, 2002; DOS SANTOS *ET AL.*, 2010) (Figure 1G, right flask). Daily measures were done until 50 days of cell growth.

All of the invasive analyses were done on each phase of the growth curve: zero (0 days), initial (6 days), exponential (14 days), linear (21 days) and stationary (30 days) (Figure 1H). Phase zero (0) corresponds to the samples semisolid used to begin the cell suspension system. Six biological replicates were used per growth phase. The cell cultures and the liquid medium were separated using an 80 micra granulometric steel grid. Separated liquid medium was destined for measuring of pH and conductivity analysis.

The cell cultures were placed on absorbent paper, for 4 min (laminar hood) to assure a total liquid medium removal. Fresh weigh measuring analysis was done using a scale (MUSTAFA *ET AL.*, 2011). Besides from fresh weight analysis, the samples collected with the same methodology were also used in the biochemical, histochemical and proteomic studies as described below. All of the methodologies used are summarized in a schematic diagram (Figure 2A).

pH and conductivity

The liquid medium separated from the cultures (50 mL) was used to measure pH and medium conductivity along the phases of the cell growing curve. Both the medium pH and conductivity were tested in two conditions: in the presence of cells and in a medium free of cells. At least six biological replicates were used.

The conductivity was done using conductivimeter MCA 150P. The pH was measured with pHmeter BEL W3B, as described by Dos Santos *et al.* (2010).

Mitotic index

Temporary slides were made according to Steiner (2005) methodology, using 50 mg of cell culture in three biological replicates. Observation was done under the light microscope (BX 40, Olympus, Tokyo) attached to the Cellsens Dimension Software (Olympus) photographing system. The final index was derived from the counting of 100 cells in nine repetitions per phase of the cell growing curve (SZABADOS *ET AL.*, 1993).

Number of PEMs

To understand the dynamics of different types of PEMs (proembryogenic masses) in the cell suspension of *Araucaria angustifolia*, the percentage of PEM I, II and III was evaluated according to Farias-Soares *et al.* (2014). Three biological replicates of 200 mg (FW cells) per phase of the cell growing curve were used. The observations were made using inverted microscope (Olympus IX80, Tokyo, Japan). With the help of a counting petri dish, nine counting of 100 cells per PEM type per phase was done.

Viability and cell death

Cellular viability and the cell death was measured using Evans Blue methodology proposed by Bozhkov *et al.* (2001). The UV-HALO DB20 (DYNAMICA) spectrophotometer was used to measure the absorbance. The absorbance value per phase was taken from an average of six biological replicates, having each three technical replicates.

Histochemistry

Additionally, for the each of the histochemical tests, temporary slides with 50 mg of fresh cells were prepared. At least three biological replicates were used.

The used histochemical tests were: double staining of Evans Blue and acetic carmin (0.1% p/v), for differencing embryogenic and non-embriogenic cells, of thionin (KRAUS; ARDUIN, 1997) for mucilage, lugol (Jensen, 1962) for starch, Sudan III (Sass, 1951) for total lipids and cutin e ruthenium red (Johansen, 1940) for pectin.

Visualization was done with Cellsens Dimension Software (Olympus) photographing system attached to the light microscope (BX 40, Olympus, Tokyo).

Proteomic analysis: sample collection and protein extraction

Samples derived from six biological repetitions in each phase of the growing curve were collected as described previously (Figure 1H). All of the samples were stored at -20°C until analyzed.

The extraction was done according to Rockenbach *et al.* (2015). Under liquid nitrogen samples (1.5 g) were grounded to powder. Following by a homogenization using 10 mL extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 100 mM KCl, 1% w/v DTT, 30% w/v sucrose, and 1 mM PMSF) and 10 mL of buffer-saturated phenol (pH 7.8). The macerated was then vortexed for 30 min (4°C). The

homogenates were then centrifuged (30 min; 15000 g; 4°C), the phenolic phase recovered, homogenized with 5 mL of extraction buffer and recentrifuged (30 min; 15000 g; 4°C). The phenol phase was collected and the protein precipitation was done using 100mM of ammonium acetate in methanol (1:5 v/v) (12h, 4°C). Afterward the samples were centrifuged (30 min; 15000 g; 4°C) and washed with methanol (1 mL) and acetone (1 mL). The solubilization of the proteins was done using the solubilization buffer (0.3 mL) (7M urea, 2 M thiourea, 2 mM PMSF, 0.5% Pharmalyte® pH 3e10, and 2% Triton X-100), followed by vortexing. Storage was done at -20°C until 2-DE analysis.

Protein quantification

Quantification was done according to Ramagli e Rodriguez (1985) protocol. The protein quantification was measured using UV-HALO DB20 (DYNAMICA) spectrophotometer.

2-DE gel electrophoresis

Six 2-DE gels were performed to each of the five analyzed phases (Figure 1H): zero, initial, exponential, linear and stationary.

Isoelectric focusing was carried out at linear scale (GE Healthcare) using strips (13cm, pH 3-10). The strips containing 350 µg of proteins were rehydrated with 0.25 mL of buffer (7MUrea, 2MThiourea, 2% Triton X-100, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer pH 3-10, 0.002% Bromophenol blue, and 1% DTT), for 12h. Focusing was done with Ettan-IPGphor 3 isoelectric focusing unit (GE Healthcare). Afterwards, strips were equilibrated for 20 min in an equilibrium solution (ROCKENBACH *ET AL.*, 2015) containing 1% (w/v) DTT, and further 20 min in the equilibrium buffer containing 2.5% (w/v) iodoacetamide.

Polyacrylamide gels were used for electrophoresis. The preparation of the gels was done according to Rockenbach *et al.* (2015). The gels were stained with Coomassie blue according to Mathesius *et al.* (2001) methodology. The gels were stored in 1% acetic acid (4°C).

Software analysis

The gels were scanned with the ImageScanner® (GE Healthcare) and analyzed using ImageMaster 2D Platinum® software (v. 7.0). The spots were identified and chosen based on a gel comparison analysis, with the selected parameters of: smooth (5); minimum area (70) and saliency (15). For the comparison analysis a total of six gels per

phase were used. Both the differential expression bands and the unique bands were selected for the extraction. These bands were present in at least four or more gels, had a % vol > 0.2 and had after the ANOVA test were statistical significance ($p < 0.05$).

Protein digestion and MALDI-TOF-MS analysis

The digestion of the proteins was done according to Rockenbach *et al.* (2015). The selected bands were manually cut, destained (1.5 mL with 50% Acetonitrile, 25 mM Ammonium Bicarbonate) and dried (0.1 mL of 100% Acetonitrile).

The proteins inside the bands were digested with porcine trypsin (20 ng/mL, 12h, 37°C), and the peptides were recovered by vortexing the gels (30 min) with extraction solution (0.1 mL 50% Acetonitrile, 5% TFA). To finally dry and concentrate the peptides a SpeedVac was used. For the mass spectrometer analysis, the peptides were solubilized in 0.1% trifluoroacetic acid. Sample (mixed in a 1:1 recrystallized HCCA matrix (Bruker Daltonics)) was spotted on a 384-MPT AnchorChip plate. Identification of the spots was performed by using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF-MS), as previously described by Rockenbach *et al.* (2015). The MALDI-TOF mass spectra were acquired on a Bruker Daltonics mass spectrometer (MALDI-TOF/TOF Autoflex III Smartbeam) with a 200 Hz Smartbeam pulsed nitrogen laser emitting at 337 nm. The extraction voltage was 19 kV, and all spectra were recorded under delayed extraction conditions and in the reflector positive mode.

The identification of proteins took in account carbamidomethylation of cysteines, a peptide mass tolerance ± 100 ppm, all proteins were identified with MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) searched against the SwissProt (Viridiplantae Databank). The molecular and cellular function were characterized with Uni-ProtKB Database (<http://www.uniprot.org/>).

4.4 RESULTS

Suspension cultures growth dynamics

After the cells were introduced in to the suspension culture system, the initial phase of the growing curve began and followed until the 8th day, the exponential phase succeeded from the 9th -15th day; the linear from the 16th -23rd day and the stationary phase from the 24th to the end of the observation at 50th day. The cell growth curve was

established with the cell volume after sedimentation as shown in Figure 2B.

Complementary to the CVS, the fresh weigh analysis showed highest increment (139%) of fresh weight at the exponential phase. During this phase the average fresh weight was of 7.88 ± 2.08 g, due to the accumulation of cells in the cell suspension system the stationary phase had the highest amount of 17.31 ± 3.14 g.

Mitotic index

All of the mitotic phases were observed in the cultures (Figures 3 A-F). Cell division was observed in all of the phases of the cell growth dynamics, yet the lowest rates of mitoses were found in the stationary phase (Figura 3G). This pointed out the viability of the cells in the initial, exponential and linear phase. It also indicates that the stationary phase has a lowest number of dividing cells.

Number of PEMs

All of the three PEM types were identified using the double coloration of Evans blue and acetic carmine (Figures 4A-C). Independently of the phase, a higher number of PEM III was observed (Figures 4A, D). The number of PEM II was highest on the exponential phase (Figures 4B, D) as for PEM I the highest number of cells was observed in the linear phase (Figures 4C, D). The lowest number of PEM I was seen in the stationary and initial phase (Figure 4C, D). The data shows first a cell cycle among the PEMs and points out the growth decrease in the stationary phase as the number of PEM I decreases. This is the first correlation between cell growth and the proembrional cell types in araucaria. It also points out that the growth expected in exponential phase is a result of the simultaneous increase of PEM I and PEM II.

Viability and cell death

Equally to the mitotic index, the Evans blue assay showed viability during the phases 0 to linear (Figures 5A). No difference was found between the phase 0 and initial phase. However the mean value of absorbance increases over time, indicating that over time cells enter into a cell death programing (Figure 5A).

The stationary phase showed the highest absorbance among all of the phases (Figure 5A). This data is coherent with the fact that over

time there is a depletion of nutrients, an overpopulation of cell, thus, stimuli for cells to enter the cell death process death.

Comparing the exponential to linear phase, the exponential phase shows cells in more viable status than the linear phase (Figure 5A). Thus, it is preferable to cultivate cells until this phase.

PH and conductivity

The PH and the conductivity in a cell free medium were constant: 5.8 (± 0.10) for the pH and (3.07 \pm 0.02) for the conductivity (Figure 5B)

Yet in a second situation where the medium has cells, the pH value becomes more acidic through time if comparing the beginning pH and the final value. The conductivity in same medium condition has an increase in the exponential phase (Figure 5B), a decrease in conductivity in the linear phase, and a slight increase in the stationary phase. The lowest pH and conductivity values are observed at linear phase.

Histochemical characteristics

The observed cells were at the proembryonic stage of development, which is characterized by the presence of PEM I, PEM II and PEM III (Figures 4A-C). PEMs types were constituted by embryonic, embryonic-tube, and suspensor cells. In the double staining of acetocarmine and Evans Blue, the embryonic cells reaction produced a red coloration as for the non-embryonic cells a blue coloration (Figures 4A-C).

The histochemical tests showed no difference between the PEM types, nor between the phases of the cell growth. Yet there was a significant difference in the reactions between the embryonic cells (embryonic cells and embryonic tube cells) and the non-embryonic cells (suspensor cells), in the double staining the Evans Blue.

The embryonic cells had positive reaction to the tests: Sudan III evidencing the presence of total lipids (Figures 6A-C); tinnin indicating the presence of mucilage (Figures 6D-F) and lugol showing a high concentration of starch grains (Figures 6G-I). As for the non-embryonic cells there was a positive reaction to lugol (Figures 6G-I), with a lower number of starch grains. So was with the tinnin that was less intense in the suspensor cells. The red ruthenium test revealed the presence of pectin substances in the suspensor cells (Figures 6J-L). The staining was stronger in the suspensor cells than in the embryonic cells (Figures 6J-L).

The histochemical test revealed the viability of the embryony cells and for the first time a description of some compounds is presented in these cell types.

Proteomic analysis

During the growing dynamics of suspension cells the total protein concentration decreased from the initial to the stationary phase (Figure 7A). No difference was found in the protein concentration in fresh material between the cultures at phase 0 and the cultures in the initial phase of the cell growth dynamics.

Despite the decrease on the protein content, the average number of spots identify had an opposite dynamics. The number of spots was constant from the phase 0 to the exponential phase (phase 0 (359±75); initial (272±17); exponential (308±28)).

Regarding the amount of unique spots, the linear phase revealed the highest number of spots (684±33), followed by the stationary phase (507±41). The linear phase also showed the highest number of unique spots (267), followed by phase 0 (112); exponential phase (86); stationary phase (68) and the initial phase (55) the lowest amount of unique spots. For all of the phases the spots number was highest at the isoelectric range of 6-8, and at the molecular weight range of 75-25kDa.

The analysis of the differential expression of proteins, showed a total of 75 identifiable protein spots with MALDI-TOF MS. Among the proteins with differential expression in all phases, 17 present in all phases, eight occur only in four phases consecutively, present only three phases were six proteins and to two phases were 13. We identified 31 proteins with exclusive expression to only one phase. All of the identified proteins and its expression pattern are summarized on the appendix table.

According to the UniProt KB database classification, most of the proteins were subcellular localized in the cytoplasm (34), secondly in the chloroplast (11) and thirdly in the nucleus (6). Other protein subcellular localization where observed in lower amount (Table 1, Figure 7B).

The protein function was determined by the UniProt KB database classification, and grouped according to Bevan *et al.* (1998). Most of the proteins are involved in the cellular metabolism (16). Cell growth and division, as well as cell structure had equally nine proteins each. Other cellular functions where summarized in the Figure 7C.

Additionally, the 17 proteins present in all phases were also characterized in a schematic biochemical mind-map (Figure 8) showing the associates and integrating pathways, and possible proteins patterns.

4.5 DISCUSSION

The Figure 8 schematically shows proteins differentially expressed and present in all phases of the cell suspension system. It is possible to observe that the proteins are interacting in important pathways of cell metabolism. At the same time, a wide network of connections is established revealing the proteomic complexity as the cells of *A. angustifolia* grow in the suspension system. From all of the encountered proteins we present a discussion of the most relevant ones.

Proteins involved in cell growth

We identified nine proteins related to cell growth. From this category, the highest number was F-box proteins (33%) (Spots 333, 1448, 1973) and an auxin-repressed protein 12.5Kb (Spot 1586) (Figure 9).

During the growth in cell suspension, the expression of F-box protein increased in time (Table 1). Both spots 1448 and 1973 of the F-box protein, presented the same pattern of expression, despite the different number of expressed phases (Figure 8, Table 1). The F-box/WD-40 repeat-containing protein 1 (Spot 333) was an exclusive protein expressed in phase 0.

The auxin repressed 12.5Kb (Spot 1586) showed the highest expression at the stationary phase. The lowest expression level was at phase 0 and the phases initial, exponential and linear had constant level of expression.

The literature has measured the hormonal levels in the zygotic embryogenesis of *A. angustifolia*, in such cases it is known so far that there is a higher expression of auxin during the initial phases of development (ASTARITA *ET AL.*, 2003; PIERUZZI *ET AL.*, 2011). In this study, we found that in *A. angustifolia* suspension culture system there is an increase in both F-box and auxin-repressed proteins in time, suggesting that this event could be related to a similar increase of auxin levels as well. The accumulation of auxin over time would influence the growth by promoting cell growth and elongation through the acidic growth.

Auxin is important in plant development by acting as a morphological organizer of the apical-basal axis (LARSSON *ET AL.*, 2008)

and regulator of the polar intracellular transport (ABRAHAMSSON *ET AL.*, 2012). All of these processes result from a tight control occurring between auxin and its wide network signaling players. In this process, F-box proteins are constitutive adaptors that position a target for ubiquitination and a component of the SCF protein complex (BUCHANAN *ET AL.*, 2000; SOMERS; FUJIWARA, 2009). When the auxin levels are high, degradation of transcription repressors mediated by an F-box protein happens, and auxin related genes are induced (BUCHANAN *ET AL.*, 2000; POZO; MANZANO, 2014). In addition to auxin, the F-box proteins could at the same time controlling other hormonal responses, such as: jasmonate (SANTER; ESTELLE, 2009), gibberellic acid and ethylene (SOMERS; FUJIWARA, 2009); circadian clock (SOMERS; FUJIWARA, 2009) and cell cycle (POZO; MANZANO, 2014).

Equally, the auxin-repressed protein genes have also an induction by high levels of auxin. Shi *et al.* (2013) in pear fruits showed that auxin-repressed protein genes were induced by auxin and inhibited by salicylic acid. It is known that the auxin-repressed protein genes are important proteins in plant growth and development (SHI *ET AL.*, 2013) and fruit development (REDDY; POOVAIAH, 1990). Thus, the expression pattern for the auxin-repressed proteins could be related to an increase of auxin levels, and modulating the development of the PEMs.

Another important protein expressed involved in cell growth is the probable cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase (Spot 2004). This protein expression is constant from phase 0 to phase linear, decreasing on the stationary phase (Table 1 and Figure 8). This protein participates in the cytokinin biosynthesis, by releasing the cytokinin nucleobase and the ribose-59 monophosphate (KUROHA *ET AL.*, 2009). This is a part of the pathway of direct activation of cytokinin (MORTIER *ET AL.*, 2014). The cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase, also known as the LOG proteins, are a key player in plant development since it participates on the release of active cytokinin (KURAKAWA *ET AL.*, 2007; KUROHA *ET AL.*, 2009; MORTIER *ET AL.*, 2014). Cytokinins are important in plant development, and in the embryo they increase the cell division rate (MORTIER *ET AL.*, 2014), inducing the cells to enter mitosis.

In this study, the probable cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase, was observed a decrease on its expression in the stationary phase. Likewise, the growth analysis (CVS and FW) and the number of cells in mitosis showed a lower growth rate in the stationary phase and a higher rate in the begging phases.

Another important protein acting on the cell growth of *A. angustifolia* under the cell suspension system is the WUSCHEL-related homeobox 1 (Spot 1690). This is the first report of this protein in *A. angustifolia* embryogenic cultures since it was not reported in previous proteomic works on *A. angustifolia* zygotic embryos (BALBUENA, 2009; BALBUENA *ET AL.*, 2009; BALBUENA, JO, *ET AL.*, 2011). In the present work the expression of this protein was found only in the exponential, linear and stationary phases. The highest expression of the WUSCHEL-related homeobox 1 was at the exponential phase, followed by a decrease at the linear phase and a slighter increase during the stationary phase (Table 1).

The WUSCHEL-related homeobox 1 is part of the WUSCHEL homeobox (WUS) family of proteins. The WUSCHEL-related homeobox are a large group of proteins with various functions: maintains the shoot apical meristem zone; promotes the zygotic apical cell development; forms the vegetative and floral organs; maintains the stem cells undifferentiated state at the root apical meristem; regulates the ovule development and inhibits the differentiation of the shoot apical meristem (LIAN *ET AL.*, 2014). The WUSCHEL-related homeobox proteins have been clustered into three groups, and the WUSCHEL-related homeobox 1 (WOX1) belongs to the same cluster as WUS, WOX2, WOX4, WOX3 and WOX6 (PALOVAARA; HAKMAN, 2008).

WUSCHEL-related homeobox 1 is responsible for the lateral organ formation in *Arabidopsis thaliana* (GRAAFF *ET AL.*, 2009) and, in the embryonic patterning formation of *A. thaliana*, it is involved in initiation of tissue specific program (HAECKER *ET AL.*, 2004). In this last case the WUSCHEL-related homeobox 1 expression was observed in the heart and torpedo stages, specifically in the vascular primordia of the cotyledons (HAECKER *ET AL.*, 2004). Despite this the identification of orthologue sequences in conifers is not yet accomplished due to experimental difficulties (HEDMAN *ET AL.*, 2013).

For *A. angustifolia* the WUSCHEL-related homeobox 1 expression in the exponential phase could suggest an initiation of tissue specific program, as it was found by Haecker *et al.* (2004) in *A. thaliana*. Because of the redundant action during apical patterning of WUSCHEL-related homeobox 1 with WOX2, WOX3 and WOX5 (GRAAFF *ET AL.*, 2009) and the same clustering belonging (PALOVAARA; HAKMAN, 2008), WUSCHEL-related homeobox 1 is suggest to act together on somatic embryogenesis as it was shown for WOX2 in *Picea abies* (PALOVAARA; HAKMAN, 2008; GRAAFF *ET AL.*, 2009;

PALOVAARA; HAKMAN, 2009). Hedman *et al.* (2013), found a specific expression of some WUSCHEL-related homeobox to embryogenic masses and late embryos in *P. abies*. In a similar way, our results also correlate the expression of *A. angustifolia* the WUSCHEL-related homeobox 1 in the proembryogenic masses. The higher expression of the WUSCHEL-related homeobox 1 could be coordinating the development of the PEMs at the maximum rate of cell division.

Proteins involved in cell structure

In the cell suspension system of *A. angustifolia*, nine proteins were related to the cell structure. Among this number, components of the cytoskeleton were found, such as actin related proteins (Spots 439, 453, 171, 239), profiling-2 (913) and tubulin- β 2 chain (148) (Figure 9). Actin was the most abundant protein (44%) at the category of cell structure function observed (Figure 7C).

Actins are scaffold structural proteins responsible for providing to the cell shape, tension support, intracellular vesicular transport, attachment, adhesion properties, movement and cell cycle progression (HUSSEY *ET AL.*, 2006; HENG; KOH, 2010). Indeed the ability of a cell to grow and divide is lost if added to a cell drugs capable of interfering with the actin filament structure and mechanism (HENG; KOH, 2010).

The actin proteins presented a higher expression in the initial phase. This is coherent with the higher mitotical index and points out the action of actin in the cell cycle progression.

Another component of the cytoskeleton expressed is the tubulin- β 2 chain. The tubulin- β 2 chain together with the tubulin- α chain form a microtubules heteropolymer. The expression of this protein is found in all phases (Table 1 and Figure 8). Similar to actin, the highest expression of tubulin- β 2 chain is also at the initial phase. Also it is observed an increase in the expression of tubulin- β 2 chain from phase 0 to the initial phase. Equally this indicates a similar pattern as in the actin.

In plant cells, microtubules are also components of the cytoskeleton responsible for various cell functions such as: division, motility, transport and morphology (OPPENHEIMER *ET AL.*, 1988; CAI, 2010) and deposition of cell wall polymers (LLYOD; CHAN, 2008). Important processes such as mitosis and vesicular transportation are mediated by tubulins. Comparing the mitotical index with the expression of tubulin- β 2 chain, the highest expression of tubulin- β 2 chain occurs in the same phase as the highest mitotical index. This strong interaction

suggests that the tubulin- $\beta 2$ chain is also coordinating the mitosis allowing a correct chromosomal division.

Another protein found exclusively the linear phase and related to the cytoskeleton is profiling-2. The profiling proteins are evolutionary conserved G-actin-binding proteins responsible for controlling the growth of the F-actin ends and its assembly to one or another factor (CARLSSON *ET AL.*, 1977; HUSSEY *ET AL.*, 2006; BENZANILLA *ET AL.*, 2015). Such control prevents both spontaneous nucleation and chaotic polymerization (HUSSEY *ET AL.*, 2006; BENZANILLA *ET AL.*, 2015). Because of this, profilins play a major role in processes such as cell division, movement, elongation, shape maintenance, pollen tube and root hair growth. (RADAUER; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, 2007).

In the cell suspension system the expression of the profilins in the linear phase could be related with the growth of the suspensor cells. The analysis of the number of PEM and its types along the growing curve, has demonstrated an increase on the number of PEM III at the linear phase to the stationary phase, and a decrease in the number of PEM II (Figure 4C). This is coherent with the schematic process PEM III-to-early somatic embryo showed by Steiner *et al.* (2015). In this process the higher number of suspensor cells produces a PEM II to become a PEM III (STEINER, 2009), and this is accomplished because at the cellular level the tube cells become elongated, to form the new suspensor cells (STEINER *ET AL.*, 2015). Chau *et al.* (2002) has observed that the over production of profiling causes an increased cell elongation, and the under-production of profiling causes the cell elongation to decrease. Due to this, it is plausible to connect the profiling-2 as one of the players responsible for causing the tube cells to elongating, becoming suspensor cells and therefore, PEM II to become PEM III as it was seen in the linear phase of the *A. angustifolia* growing curve.

Proteins involved in metabolism and other relevant processes

In the cell suspension system of *A. angustifolia* most of the proteins were involved in the cellular metabolism (20%), as shown in Figure 7C.

Enolase belongs to glycolytic pathway as shown in Figure 8. This ubiquitous enzyme is responsible for converting 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate in a dehydration process (STRAETEN *ET AL.*, 1991). According to Barkla *et al.* (2009), enolase is a multifunctional protein with an important regulatory and sensor role in

multiple stress situations. Balbuena *et al.* (2009), has also observed enolases in the zygotic embryo of *A. angustifolia*.

In this work, two enolases enzyme were observed: enolase I (Spot 2043), and enolase II (Spot 1582) (Figure 9). Both proteins presented equal patten of expression, a constant higher expression from phase 0 to phase linear and a decrease of expression at the stationary level (Table 1 and Figure 8).

In our cell suspension system, the carbon sources were not continuously supplied, meaning that over time there was a depletion on the carbon sources available. This decrease glucose, in the media, amongst other factors could have triggered a decrease on the expression levels of the enolase.

The enolase proteins interact as well with protein like aldolase and vacuolar H⁺-ATPase V-ATPase (BARKLA *ET AL.*, 2009; AHUJA *ET AL.*, 2010). In this work, we observed the expression of V-type proton ATPase catalytic subunit A (Spot 1419) exclusively to the linear and stationary phases. In an opposite expression pattern as observed for the enolase protein, the V-type proton ATPase catalytic subunit A had a higher expression on the linear phase than the stationary phase.

This enolase V-ATPase interaction is associated with salt stress and was categorized as an intracellular trafficking protein. In fact, enolase can sense multiple stress situations (AHUJA *ET AL.*, 2010). In salt stress situations there is an increase in the ATP generation via glycolysis, thus increasing as well a proton-driven transport by V-ATPases, resulting in a higher accumulation of Na⁺ in the vacuole (BARKLA *ET AL.*, 2009).

In the present work we also measured the medium conductivity. It is well known that the concentration of salts is directly proportional to the conductivity level. In this experiment it was shown that the conductivity was highest in the exponential phase, afterwards decreasing in the linear phase, followed by a slight increase in stationary phase. The higher concentration of salts in the exponential phase could be a consequence of both the growth of the cell culture and excretion of metabolic compounds. This suggests that in the exponential phase the higher concentration of salts was sense by the cells, triggering proteins like enolase 1 and 2. The enolase proteins as shown by Barkla *et al.* (2009) interact with the V-ATPase proteins and stimulate the proteins to increase proton-driven transport. As a consequence there is an accumulation of salts in the vacuole (BARKLA *ET AL.*, 2009) and thus a decrease in the conductivity in the culture medium. Over time, in the

stationary phase, the expression of V-ATPase proteins decreases, the accumulation of salts into the vacuole is lower and thus, the conductivity increases slightly again. Also adding to this at stationary phase the cells start to undergo cell death process, as showed by the Blue Evans assay. Because of cell death solutes are also released to the culture medium contributing with the increase in conductivity.

Another protein identified in *A. angustifolia* under the cell suspension was calmodulin-like protein 7 (Spot 1135). This protein was expressed constantly from exponential phase to linear phase and increased the expression at the stationary phase.

The calmodulin-like protein 7 is a Ca^{2+} -binding proteins responsible for: activating innumerous targets; amplifying and transducing a received signal; producing rapid changes in cellular function within seconds to minutes (SNEDDEN; FROMM, 1998); and also regulating the targets (PEROCHON *ET AL.*, 2011). Calcium is a secondary messenger mediating various plant responses to external and internal stimuli, allowing in the end the ability of a plant to adapt with the changing environment (SNEDDEN; FROMM, 1998; 2001). In situations of plant cell death, the calcium signaling is very important as a mediator. Also in stressful conditions like: drought, salt and osmotic stress, the calmodulin-like protein are a key player for signal transduction (SNEDDEN; FROMM, 1998; PEROCHON *ET AL.*, 2011).

According to the results found in the Evans Blue assay the cells in the stationary phase showed features of cell death pathway. Together with the depletion of nutrients in the culture medium this could create a stressful condition to trigger the protein like the calmodulin-like protein 7.

Another protein encountered that suggests a stressful condition is the heat shock proteins (Spots 1109 and 1441). The heat shock proteins 70kDa was also found with exclusive expression in the linear phase as for the heat shock protein 81-1 (Spot 1441) the expression found in both linear and stationary phase. For the heat shock protein 81-1 the highest expression was also in the linear phase and then decreased at the stationary phase.

The heat shock proteins are expressed in stressful conditions (WANG *ET AL.*, 2004) that interact with cell-cycle and cell death regulators (NOLLEN; MORIMOTO, 2002; WANG *ET AL.*, 2004). Additionally, heat shock proteins also induce the expression of chaperonin proteins. In our experiment the expression of heat shock proteins and chaperonins present a similar expression pattern. The

chloroplastic Chaperonin 60 subunit beta 2 (Spot 1052) (Figure 9, Table 1) is exclusive to the linear phase and mitochondrion Chaperonin CPN60-2 (Spot 1472) was higher at the stationary phase. Together our result, points out a stressful condition of *A. angustifolia* after 20 days culture. This is coherent with the results presented by the Evans Blue assay. At 15 days the cells were in the exponential phase, showing the maximum cell growth and viability in a non-stressful environment.

Phaseolin alpha-type protein (Spot 1939) was another identified protein that belongs to the class of storage proteins. Scanty is the knowledge of storage proteins in gymnosperms (RAGHAVAN; SHARMA, 1995), yet already there has been classified some vincilin-like proteins in gymnosperm (BALBUENA, 2009; BALBUENA *ET AL.*, 2009; STEINER, 2009). The Vincilin-like proteins and phaseolin share a common precursor protein sucrose binding protein (EMANI; HALL, 2008) and widespread similarities (HALL *ET AL.*, 1999).

In the present work the expression of phaseolin alpha-type protein, was constant from the phase 0 to phase linear, yet it decreased in the exponential level. In the exponential phase cells showed the highest division rate. Thus the use of reserves for growth could be related with the decrease in the storage proteins. This is coherent with the increase on the metabolism rate shown by the other proteins (Table 1). In fact, the multiplication of cell in the exponential phase and the higher growth can imply in the consumption of carbon and nitrogen stored in storage proteins. The use of storage proteins also helps to explain why there is a decrease on the amount of total protein concentration on the cells over time, starting in the exponential phase.

Growth analysis

Cell suspension culture in the present work was shown successful in mass propagating *A. angustifolia*. An increment of 139% of fresh weight material was observed in fifteen days. The results here obtained also pointed out the best time for the subculture of the cultures. In *A. angustifolia* embryogenic cultures Farias-Soares *et al.* (2014) subcultured every two weeks, yet Vieira (2011) and Fraga *et al.* (2015) each 20-21 days. According to our results subculture under the cell suspension system should be at maximum of 15 days. At this time the cells are at their higher level of proliferation and viability.

At the same time, the pH and conductivity pointed out that after the exponential phase showed a drastic change. Both biochemical measures showed the lowest value at the linear phase, emphasizing the

importance of subculturing cells until the end of the linear phase. The biochemical changes together with the depletion of the nutrients over time had stimulated the cells to undergo cell death programming as shown both by the Blue Evans assay and the expression of stress related proteins.

Some of these histochemical tests presented in this work were the first time tested in *A. angustifolia* cell suspension cultures. The histochemical tests showed differences between the embryogenic cells (embryonary and embryonary-tube cells) and the non-embryogenic cells (suspensor cells), for the double staining the Evans Blue and for the Sudan III, tionin, lugol and red ruthenium. Together they point out the viability of the embryogenic cells and further confirm that these are the responsible cells formation of somatic embryos.

Also in the present work the red ruthenium positive reaction (COLOMBO; RASCIO, 1977) showed that in fact the suspensor cells are producing pectin substances, lipids and gums. Also the tionin histochemistry test presented a positive reaction to mucilage.

Our findings are coherent with the ultrastructure analysis of the suspensor cells performed by Steiner *et al.* (2015) and Fraga *et al.* (2015), organelles that are involved in the secretion pathway. Steiner *et al.* (2015) attested the presence of large vacuole on the suspensor cells and proves the origin of the suspensor cells from the embryonal tube cells. The embryonal tube cells also present secretory activity and vacuolization on (FRAGA *ET AL.*, 2015).

As for the proteins, under the cell suspension system polysaccharides, glycoproteins and enzymes are secreted to the medium (WEBSTER *ET AL.*, 2008). Some of these compounds are related to cell wall changes during plant cell growth (DARJANIA *ET AL.*, 2002). Among the excreted compounds Maurer *et al.* (2010) has identified for *A. angustifolia* in the same media conditions as this experiment the secretion of arabinogalactans, a protein with growth and developmental importance including cell-cell adhesion.

Biochemically, there was no change in the pH or conductivity in the absence of cells. Yet once the medium contained cells the change was observed. Suggesting those proteins and other excreted compounds produced by the cells could be altering the environmental conditions.

The proteomic data also showed cell wall proteins changing the expression pattern. In sum the positive reaction red ruthenium showed for the first time the presence of pectin substances in *A. angustifolia* cells. This data could explain how the embryonary cells are kept

together and how the cells cluster themselves as the transition from PEM I to PEM III happens and are kept together even with the rotatory shaking.

As for the lugol test, we identified starch granules in the embryogenic cells. MET analysis done by Steiner (2009); Steiner *et al.* (2015) showed also the starch granules present in the cytoplasm of the embryogenic cells.

4.6 CONCLUSIONS

Araucaria angustifolia cells have their maximum growth at 14 days, during the exponential phase. This is also the best phase for subculturing the cells. Under a cell suspension system proteins related to cell growth and cytoskeleton are expressed. Auxin-related proteins indicate the importance of auxin in the growth of the PEM cells. In the linear and stationary phases stress related proteins and cell death signs are observed in the cells of araucaria.

4.7 ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to CEBIME/UFSC for the technical help. Financial support was provided by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Proc. 478393/2013-0, and 306126/2013-3), the National Program in Support the Development of Botany sponsored by CAPES, and FAPESC (Proc. 2780/2012-4, and 3770/2012).

4.8 REFERENCES

- ABRAHAMSSON, M., S. VALLADARES, E. LARSSON, D. CLAPHAM, and S. VON ARNOLD. 2012. Patterning during somatic embryogenesis in Scots pine in relation to polar auxin transport and programmed cell death. *Plant Cell Tissue, Organ and Culture* 109: 391-400.
- AHUJA, I., R. C. H. D. VOS, A. M. BONES, and R. D. HALL. 2010. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science* 15: 664-674.
- ASTARITA, L. V., and M. P. GUERRA. 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, L. V., E. S. I. FLOH, and W. HANDRO. 2003. Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidase associated

- with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). *Plant Growth Regulation* 39: 113-118.
- BALBUENA, T. S. 2009. Proteômica do desenvolvimento da semente de *Araucaria angustifolia*, São Paulo.
- BALBUENA, T. S., E. R. SILVEIRA, M. JUNQUEIRA, L. L. C. DIAS, C. SANTA-CATARINA, A. SHEVCHENKO, and E. S. I. FLOH. 2009. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*). *Journal of Proteomics* 72: 337-352.
- BALBUENA, T. S., L. JO, F. P. PIERUZZI, L. L. C. DIAS, V. SILVEIRA, C. SANTA-CATARINA, M. JUNQUEIRA, et al. 2011. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 72: 302-311.
- BARKLA, B. J., R. VERA-ESTRELLA, M. HERNÁNDEZ-CORONADO, and O. PANTOJA. 2009. Quantitative proteomics of the tonoplast reveals a role for glycolytic enzymes in salt tolerance. *The Plant Cell* 21: 4044-4058.
- BENZANILLA, M., A. S. GLADFELTER, D. R. KOVAR, and W.-L. LEE. 2015. Cytoskeletal dynamics: a view from the membrane. *The Journal of Cell Biology* 209: 329-337.
- BEVAN, M., I. BANCROFT, E. BENT, K. LOVE, H. GOODMAN, C. DEAN, R. BERGKAMP, et al. 1998. Analysis of 1.9Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 391: 485-488.
- BOZHKOV, P. V., L. H. FILANOVA, and S. VON ARNOLD. 2001. A key development 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: 658-667.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 71: 248-256.
- BUCHANAN, B. B., W. GRUISSEM, and R. L. JONES. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants, 1367. American Society of Plant Physiology, Maryland.
- CAI, G. 2010. Assembly and disassembly of plant microtubules: tubulin modifications and binding to MAPs. *Journal of Experimental Botany* 61: 623-626.

- CARLSSON, L., L.-E. NYSTRÖM, I. SUNDKVIST, F. MARKEY, and U. LINDBERG. 1977. Actin Polymerizability is Influenced by Profilin, a Low Molecular Weight Protein in Non-muscle Cells. *Journal of Molecular Biology* 115: 465-483.
- CARVALHO, M. M. X. D. 2006. O desmatamento das florestas de araucária e o Médio Vale do Iguaçu: uma história de riqueza madeireira e colonizações., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- _____. 2010. Uma grande empresa em meio à floresta: a história da devastação da floresta com araucária e a Southern Brazil Lumber and Colonization (1870-1970). Doctor in Science Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CHAU, N.-H., S. RAMACHANDRAN, H. E. MOLAGER, and C. HEDEHUSENE. 2002. Alteration of plant morphology by control of profilin expression. In U. S. Patent [ed.], 1-10. Institute of Molecular Agrobiology, US
- COLOMBO, P. M., and N. RASCIO. 1977. Ruthenium Red Staining for Electron Microscopy of Plant Material. *Journal of Ultrastructure Research* 60: 135-139.
- DARJANIA, L., N. ICHISE, S. ICHIKAWA, T. OKAMOTO, H. OKUYAMA, and G. A. THOMPSON JR. 2002. Dynamic turnover of arabinogalactan proteins in cultured *Arabidopsis* cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 69-79.
- DOS SANTOS, A. L. W., V. SILVEIRA, N. STEINER, M. MARASCHIN, and M. P. GUERRA. 2010. Biochemical and morphological changes during the growth kinetics of *Araucaria angustifolia* suspension cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53: 497-504.
- DOS SANTOS, A. L. W. S., V. N. STEINER, M. VIDOR, and M. P. GUERRA. 2002. Somatic embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45: 97-106.
- DSMA. 2011. II Workshop sobre a lista das espécies da flora catarinense ameaçadas de extinção. In S. d. E. d. d. e. sustentável [ed.], 1-101, Florianópolis.
- DURZAN, D. J. 1988. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 6: 339-376.
- EMANI, C., and T. C. HALL. 2008. Phaseolin: structure and evolution. *The Open Evolution Journal* 2: 66-74.

- FARIAS-SOARES, F. L., N. STEINER, E. C. SCHMIDT, M. L. T. PEREIRA, G. D. ROGGE-RENNER, Z. L. BOUZON, E. S. I. FLOH, et al. 2014. The transition of proembryogenic masses to somatic embryos in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is related to the endogenous contents of IAA, ABA and polyamines. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 1853-1865.
- FARRANT, J. M., N. W. PAMMENTER, and P. BERJAK. 1989. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds -a study on three unrelated species. *Planta* 178: 189-198.
- FRAGA, H. P. F., L. D. N. VIEIRA, C. C. PUTTKAMMER, E. M. OLIVEIRA, and M. P. GUERRA. 2015. Time-lapse cell tracking reveals morphohistological features in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze. *Trees* 29: 1613-1623.
- GRAAFF, E. v. D., T. LAUX, and S. A. RENSING. 2009. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biology* 10: 1-10.
- GUERRA, M. P., V. SILVEIRA, M. S. D. REIS, and L. SCHNEIDER. 2002. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In L. L. Simões AND C. F. Lino [eds.], *Sustentável Mata Atlântica: a exploração dos recursos florestais*, 85-101. FENAC, São Paulo.
- GUERRA, M. P., V. SILVEIRA, A. L. W. DOS SANTOS, L. V. ASTARITA, and R. O. NODARI. 2000. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In S. M. Jain, P. K. Gupta, AND R. J. Newton [eds.], *Somatic embryogenesis in woody plants vol. 6*, 457-478. Kluwer Academic Dordrecht.
- GUPTA, P. K., and G. S. PULLMAN. 1991. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. *US patent* 5: 36-37.
- HAECKER, A., R. GROSS-HARDT, B. GEIGES, A. SARKAR, H. BREUNINGER, M. HERRMANN, and T. LAUX. 2004. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131.
- HAKMAN, I., and L. C. FOWKE. 1987. An embryogenic cell suspension culture of *Picea glauca* (white spruce) *Plant Cell Reports* 6: 20-22.

- HALL, T. C., M. B. CHANDRASEKHARAN, and G. LI. 1999. Phaseolin: its past, proprieties, regulation and future. *In* P. R. Shewry AND R. Casey [eds.], Seed protein, 209-249. Springer Dordrecht.
- HEDMAN, H., T. ZHU, S. VON ARNOLD, and J. J. SOHLBERG. 2013. Analysis of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX gene family in the conifer picea abies reveals extensive conservation as well as dynamic patterns. *Bio Medicine* 13: 2-10.
- HENG, Y.-W., and C.-G. KOH. 2010. Actin cytoskeleton dynamic and the cell division cycle. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42: 1622-1633.
- HUSSEY, P. J., T. KETELAAR, and M. J. DEEKS. 2006. Control of actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annuals Review Plant Biology* 57: 109-125.
- IUCN. 2014. The IUCN Red List of Threatened Species(tm) Website <http://www.iucnredlist.org/search> [accessed April, 14th 2014].
- KRAUS, J. E., and M. ARDUIN. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- KURAKAWA, T., N. UEDA, M. MAEKAWA, K. KOBAYASHI, M. KOJIMA, Y. NAGATO, H. SAKAKIBARA, et al. 2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445: 652-655.
- KUROHA, T., H. TOKUNAGA, M. KOJIMA, N. UEDA, T. ISHIDA, S. NAGAWA, H. FUKUDA, et al. 2009. Functional Analyses of LONELY GUY Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell* 21: 3152-3169.
- LARSSON, E., F. SITBON, K. LIUNG, and S. VON ARNOLD. 2008. Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce. *New Phytologist* 177: 365-366.
- LIAN, G., Z. DING, Q. WANG, D. ZHANG, and J. XU. 2014. Origins and evolution of WUSCHEL-Related Homeobox protein family in plant kingdom. *The Scientific World Journal* 2014: 1-12.
- LLYOD, C., and J. CHAN. 2008. The parallel lives of microtubules and cellulose microfibrils. *Current opinion in Cell Biology* 11: 641-646.
- MARTINS-RAMOS, D., C. L. CHAVES, R. L. D. C. BORTOLUZZI, and A. MANTOVANI. 2011. Florística de Floresta Ombrófila mista altomontana e campos em Urupema, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 9: 156-166.

- MATHESIUS, U., G. KEIJZERS, S. H. A. NATERA, J. J. WEINMAN, M. A. DJORDJEVIC, and B. G. ROLFE. 2001. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 1: 1424-1440.
- MAURER, J. B. B., A. BACIC, A. B. PEREIRA-NETTO, L. DONATTI, S. F. ZAWADZKI-BAGGIO, and F. A. PETTOLINO. 2010. Arabinogalactan-proteins from cell suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 71: 1400-1409.
- MMA. 2000. Convenção sobre a Diversidade Biológica [accessed November, 10th 2015].
- _____. 2002. Floresta com Araucárias [accessed January, 25th 2015].
- MORTIER, V., A. WASSON, P. JAWOREK, A. D. KEYSER, M. DECROOS, M. HOLSTER, P. TRAKOWSKI, et al. 2014. Role of *LONELY GUY* genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 202: 582-593.
- MUSTAFA, N., W. WINTER, F. IREN, and R. VERPOORTE. 2011. Initiation, growth and crypreservation of plant cell suspensions cultures. *Nature Protocols* 6: 715-742.
- NOLLEN, E. A. A., and R. I. MORIMOTO. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science* 115: 2809-2816.
- OPPENHEIMER, D. G., N. HAAS, C. D. SILFLOW, and D. P. SNUSTAD. 1988. The beta tubulin gene family of *Arabidopsis thaliana*: preferential accumulation of the beta1 transcript in roots. *Gene* 63: 87-102.
- PALOVAARA, J., and I. HAKMAN. 2008. Conifer WOX-related homeodomain transcription factors, developmental consideration and expression dynamic of WOX2 during *Picea abies* somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 66: 533-549.
- _____. 2009. WOX2 and polar auxin transport during spruce embryo pattern formation. *Plant Signaling and Behavior* 4: 153-155.
- PEROCHON, A., D. ALDON, J.-P. GALAUD, and B. RANTY. 2011. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. *Biochemistry* 93: 2048-2053.
- PIERUZZI, F. P., L. L. C. DIAS, T. S. BALBUENA, C. SANTA-CATARINA, A. L. W. DOS SANTOS, and E. S. I. FLOH. 2011. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds:

- Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Annals of Botany* 108: 337-345.
- POZO, J. C. D., and C. MANZANO. 2014. Auxin and the ubiquitin pathway. Two players—one target: the cell cycle in action. *Journal of Experimental Botany* 65: 2617-2632.
- RADAUER, C., and K. HOFFMANN-SOMMERGRUBER. 2007. Profilins. In E. N. C. Mills AND P. R. Shewry [eds.], *Plant Food Allergens*, 105-124. Blackwell Publishing, Oxford.
- RAGHAVAN, V., and K. K. SHARMA. 1995. Zygotic embryogenesis in gymnosperm and angiosperm. In T. A. Thorpe [ed.], *In vitro embryogenesis in plants*, 73-115. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- RAMAGLI, L. S., and L. V. RODRIGUEZ. 1985. Quantitation of microgram amounts of protein in twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 1085: 559-563.
- REDDY, A. S. N., and B. W. POOVAIAH. 1990. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed mRNA: correlation between fruit growth and repression of the auxin-regulated gene. *Plant Molecular Biology* 14: 127-136.
- REITZ, R., and R. M. KLEIN. 1966. *Araucariáceas. Flora Illustrada Catarinense*: 1-62.
- ROCKENBACH, M. F., J. I. BONETI, G. C. CANGAHUALA-INOCENTE, M. C. A. GAVIOLI-NASCIMENTO, and M. P. GUERRA. 2015. Histological and proteomics analysis of apple defense responses to the development of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 89: 97-107.
- SANTER, A., and M. ESTELLE. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459: 1071-1078.
- SHI, H.-Y., Y.-X. ZHANG, and L. CHEN. 2013. Two pear auxin-repressed protein genes, PpARP1 and PpARP2, are predominantly expressed in fruit and involved in response to salicylic acid signaling. *Plant Cell Tissue, Organ and Culture* 114: 279-286.
- SILVEIRA, V., N. STEINER, A. L. W. DOS SANTOS, R. O. NODARI, and M. P. GUERRA. 2002. Biotechnology tolls in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 2: 463-470.

- SNEDDEN, W. A., and H. FROMM. 1998. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science* 3: 299-304.
- _____. 2001. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist* 151: 35-66.
- SOMERS, D. E., and S. FUJIWARA. 2009. Thinking outside the F-box: novel ligands for novel receptors. *Trends in Plant Science* 14: 206-213.
- STEINER, N. 2009. Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* (Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão proteica e do gene SERK, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- STEINER, N., F. D. N. VIEIRA, S. MALDONADO, and M. P. GUERRA. 2005. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 895-903.
- STEINER, N., F. L. FARIAS-SOARES, E. C. SCHMIDT, M. L. T. PEREIRA, B. SCHEID, G. D. ROGGE-RENNER, Z. L. BOUZON, et al. 2015. Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Protoplasma*: 1-15.
- STRAETEN, D. V. D., R. A. POUSADA-RODRIGUES, H. M. GOODMAN, and M. V. MONTAGU. 1991. Plant enolase: gene structure, expression and evolution. *The Plant Cell* 3: 719-735.
- SZABADOS, L., L. A. MROGINSKI, and W. M. ROCA. 1993. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. In W. M. Roca AND L. A. Mroginski [eds.], Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones, 174-210. CIAT, Cali.
- VIEIRA, L. D. N. 2011. Regulação da Embriogênese Somática de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze pelo Mecanismo Redox. Engenharia Agrônoma, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- WANG, W., B. VINOCUR, O. SHOSEYOV, and A. ALTMAN. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9: 244-252.
- WEBSTER, J. M., D. OXLEY, F. A. PETTOLINO, and A. BACIC. 2008. Characterisation of secreted polysaccharides and

(glyco)proteins from suspension cultures of *Pyrus communis*.
Phytochemistry 69: 873-881.

Figure 1: Images of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae) Brazilian-Pine tree. **A:** The collection site of the Brazilian-pine tree in Lages. **B:** Female tree of *A. angustifolia*. **C:** Female cone with embryos at the pre-cotyledonary stage. **D:** Araucaria seeds. **E:** An embryo at the pre-cotyledonary stage on a petri dish. **F:** Slow orbital system Steward's apparatus. **G:** Nipple flasks with and without scale to measuring system. **H:** Diagram of the growth dynamics of *A. angustifolia* embryogenic cultures. Triangles indicate collecting points at the phases: 0=day0, begging of the suspension system; 1=initial; 2=exponential; 3=linear and 4=stationary. Scale bar: C=5cm; D=2cm; E=2mm.

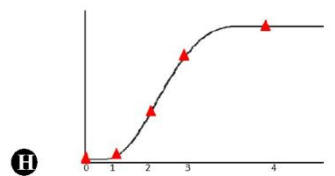
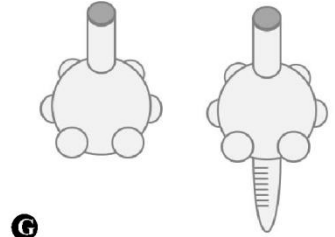
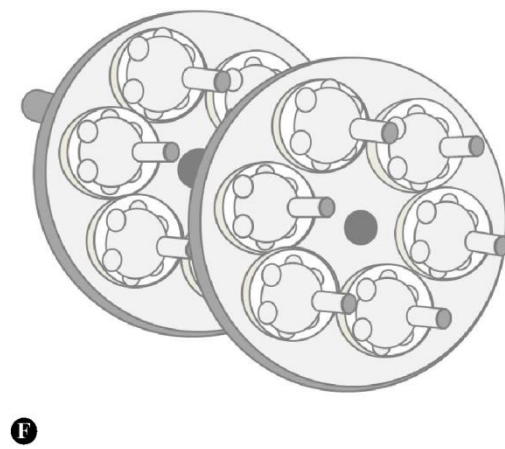


Figure 2: **A:** Diagram of the methodological analysis and approaches used to study the growth of *A. angustifolia* cell suspension. **B:** Growth dynamics measured by means of sedimented cell volume.

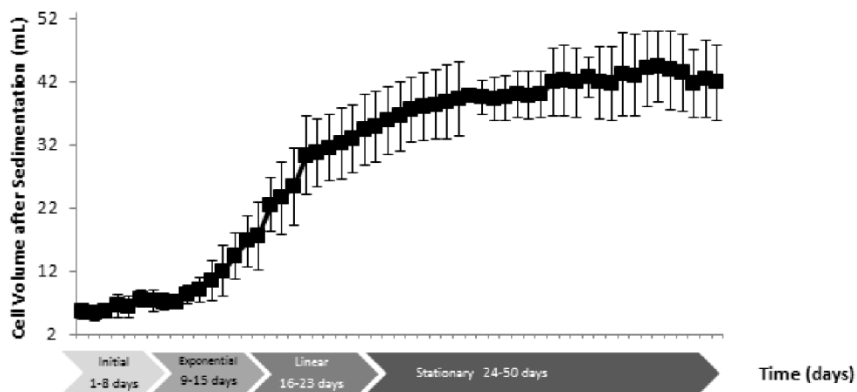
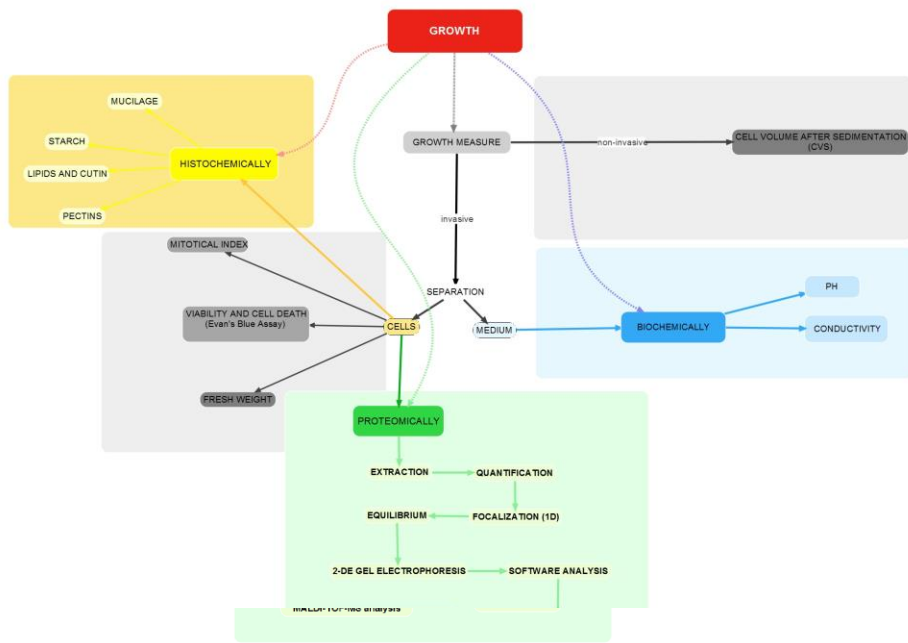


Figure 3: *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae) mitotical index. **A:** Cells of *A. angustifolia* embryogenic cultures in mitosis. **B:** Detail of a cell in interphase. **C:** Profase cell, chromosome can be observed. **D:** Metaphase cell. Chromosomes are present in the equatorial plate. **E:** Anaphase cell. **F:** Telophase cells. **G:** Mitotical index shows the percentage of cells in mitoses versus analyzed phases of the cell growth dynamics. Scale bar: A=100 μ M; B-F=20 μ M.

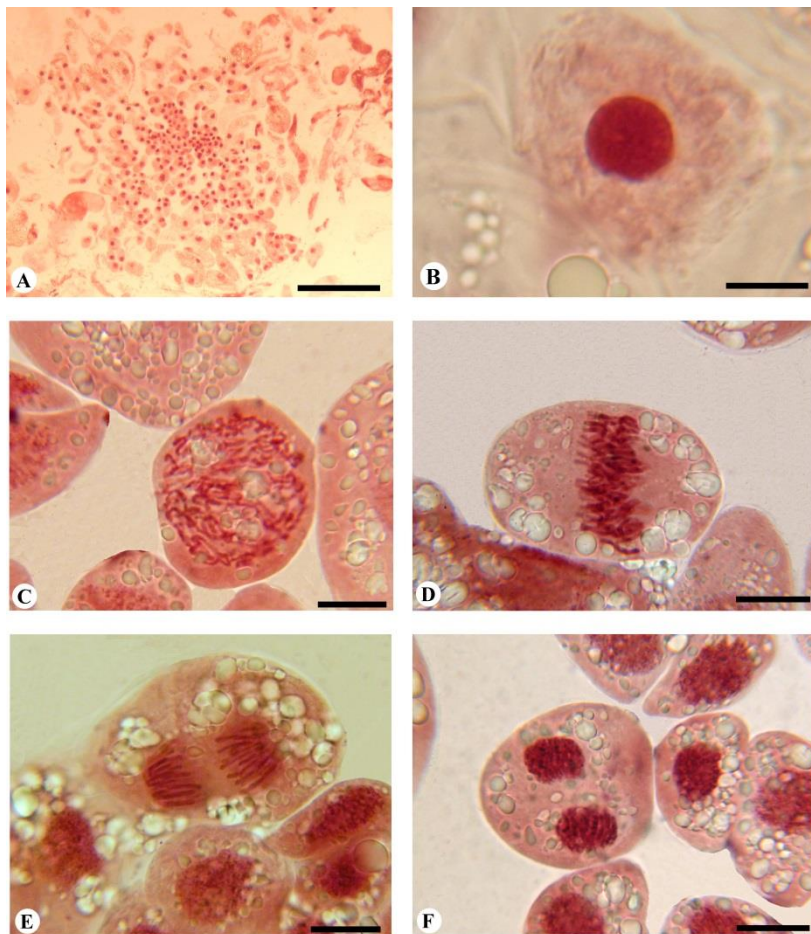
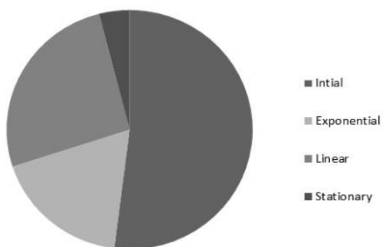
**G**

Figure 4: Histochemical test of double coloration Evans blue and acetic carmine *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. Differential staining indicates in red embryogenic cells and in blue non-embryogenic cells. **A:** Proembryonary masses III (PEMIII) with increased number of suspensor cells. **B:** Two proembryonary masses II (PEM II). **C:** Proembryonary masses I (PEM I), with reduced number of embryogenic cells and suspensor cells. **D:** Different types of PEMs versus analyzed phases of the cell growth dynamics. Values expressed in percentage. Legend: ec=embryogenic cells; n.ec=non embryogenic cells.
Scale bar: A=200 μ M; B: 150 μ M; C=100 μ M.

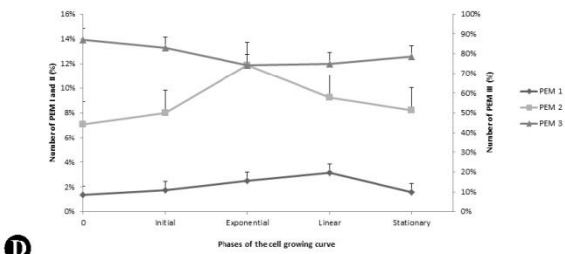
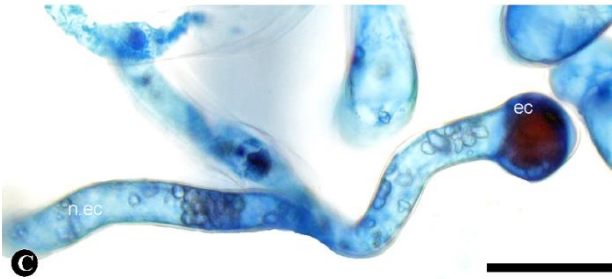
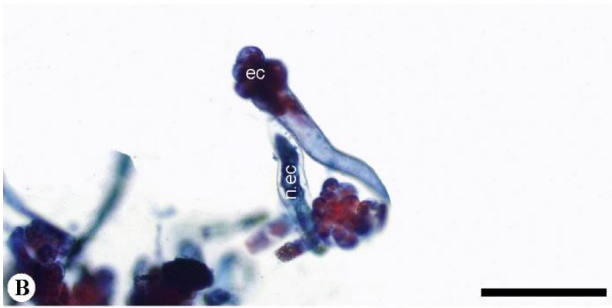
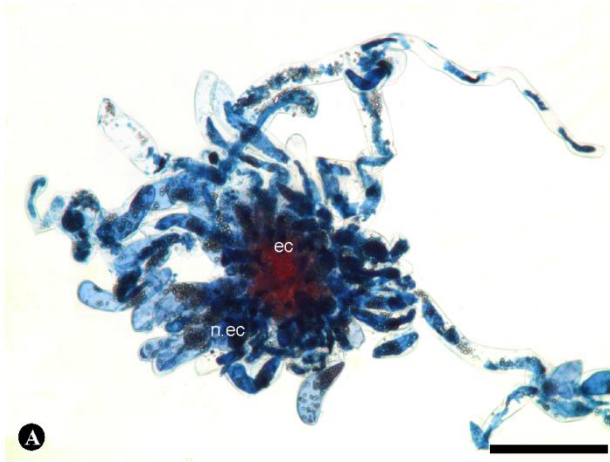


Figure 5: **A:** Cell death and viability under the Evans Blue staining during the various phases of the cell growth dynamics of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. Values are mean \pm standard deviation of the measured absorbance; n=6 biological replicates and three technical replicates; **B:** Mean values of PH and conductivity during the various phases of the cell growth dynamics. Figure shows two mean conditions analyzed: one with and the other without the presence of cells in the medium (cell free medium).

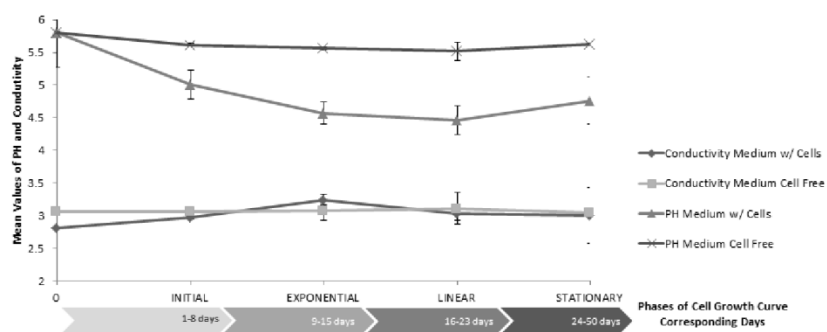
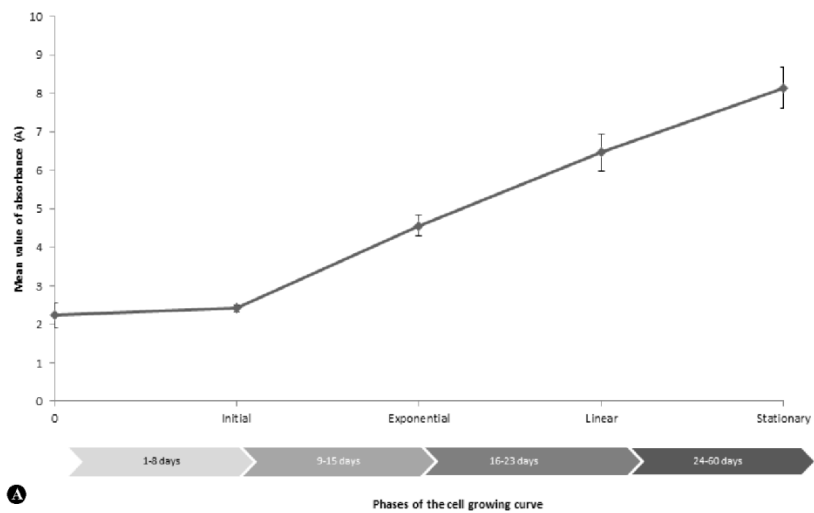


Figure 6: Histochemical analysis of *A. angustifolia* submitted to staining techniques: **A-C:** Sudan III; **D-F:** thionine; **G-I:** lugol; **J-L:** red ruthenium. The images **A, D, G, J** are proembrionary masses (PEM I); **B, E, H, K** are PEM II; and **C, F, I, L** are PEM III. Scale bar: A,G,J=100 μ M; C,D,F,I,K,L=200 μ M; E: 300 μ M; B,H: 400 μ M.

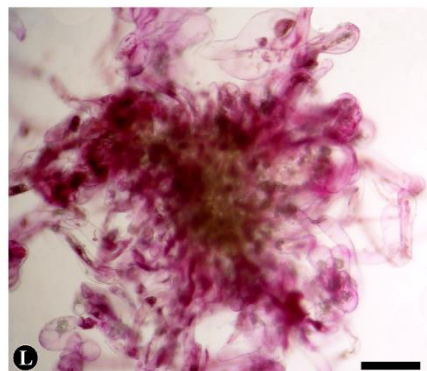
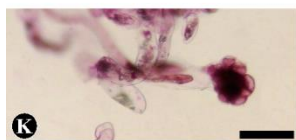
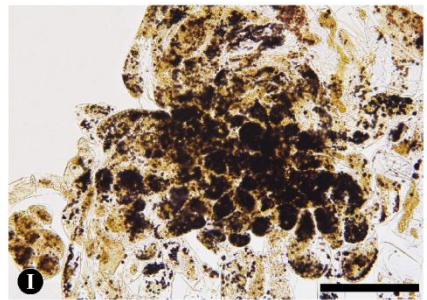
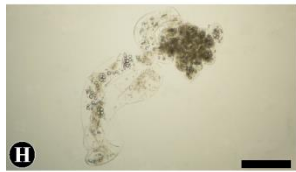
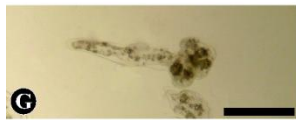
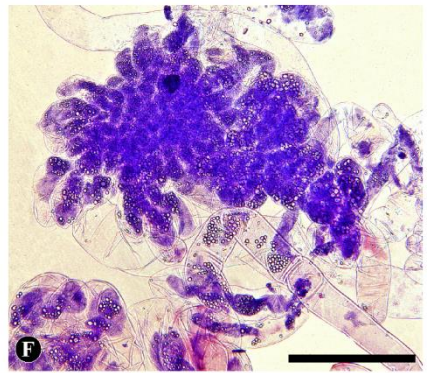
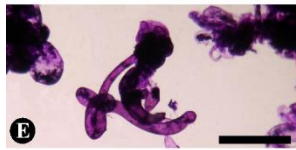
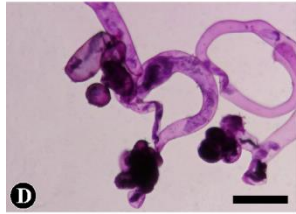
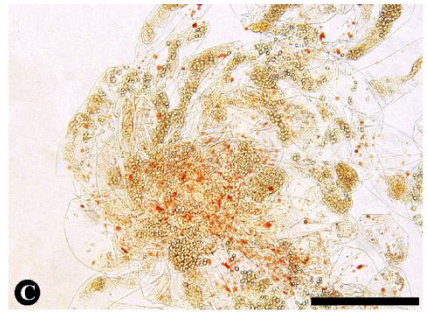
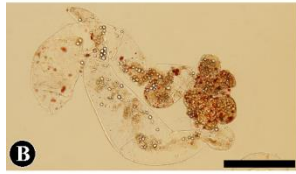
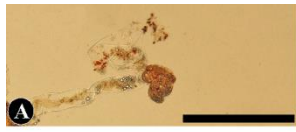


Figure 7: **A:** Protein concentration during the various phases of the cell growth dynamics of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures; **B:** Total number of proteins and their subcellular localization; **C:** Total number of proteins and the described function.

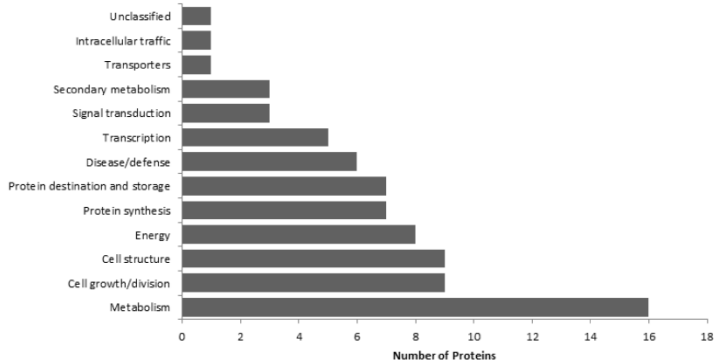
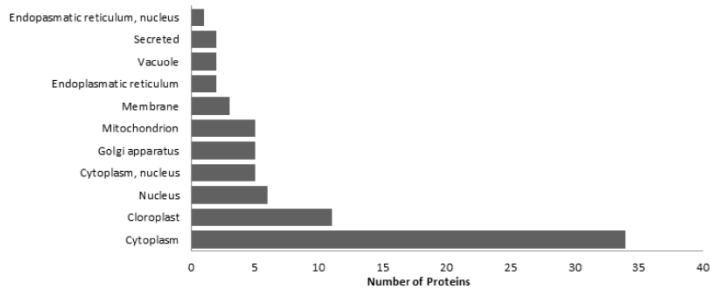
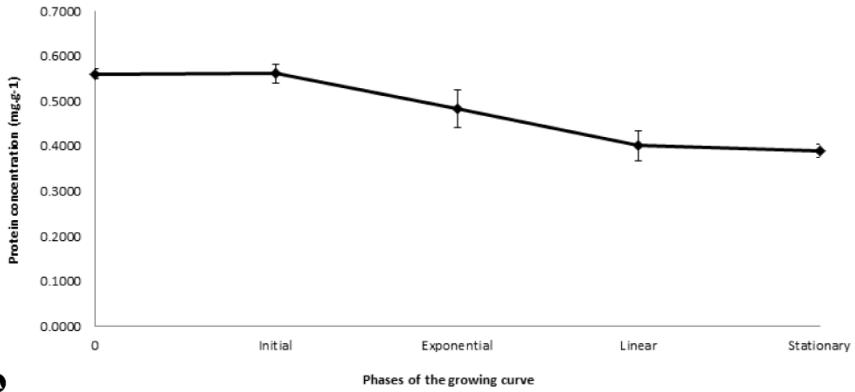


Figure 8: Mind-map of the proteins with differentially expressed, and present in the phases of the cell growth dynamics of *A. angustifolia* embryogenic cultures. Among the various interacting pathways, the mind map shows the most significant metabolic pathways in which these proteins play a role. The gray arrows indicate possible pathways connecting one protein to another, dotted arrows show indirect pathways and straight arrows show direct pathways, red arrows shows the action of an identified protein.

*The proteins number follow Table 1.

** The metabolic pathways were described by: Uni-ProtKB Database; Buchanan *et al.* (2000);

Figure 9: Reference 2-DE gels of phase 0 (A), initial (B), exponential (C), linear (D) and stationary (E) of *Araucaria angustifolia* cell suspensions. The proteins that were identified are marked with numbers and arrows following *Table 1*.

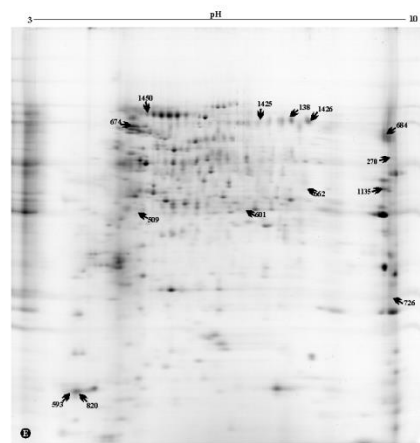
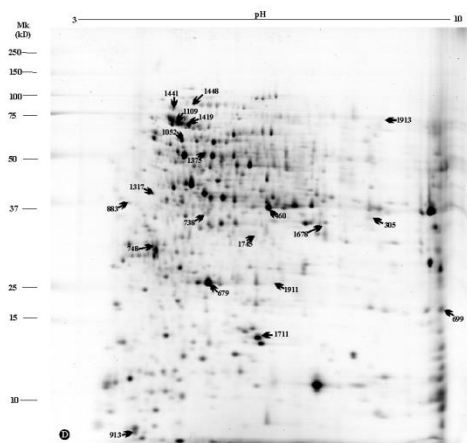
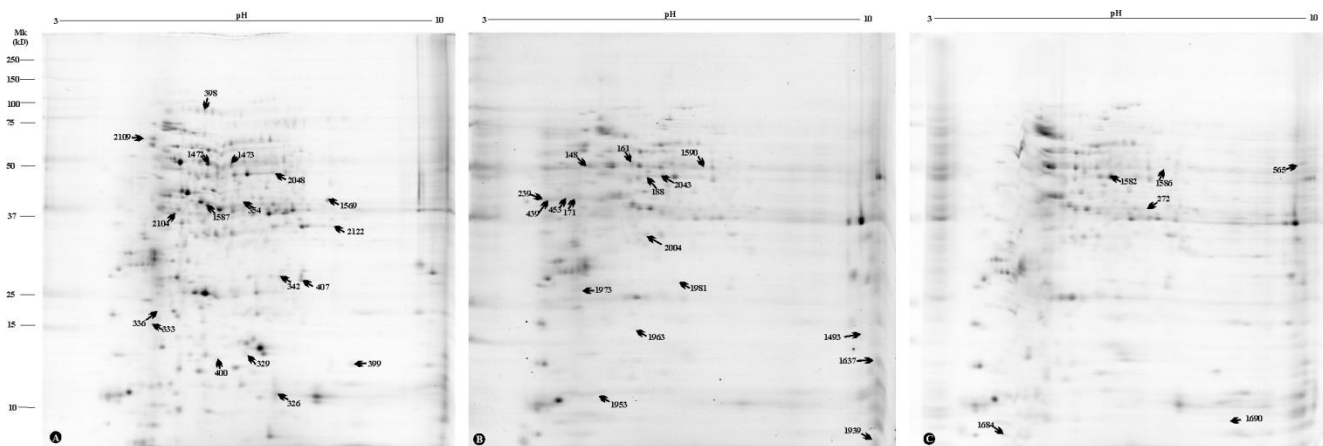


Table 1: Proteins identified in *A. angustifolia* cell suspensions.

Spot #	Protein Name	Organism	Access Code	Coverage	Score	PW Theo	PW Exp	PI Theo	PI Exp	% de Vol	Subcellular localization	Functional Category	Expression	0	1	2	3	4
2048	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTND3_A RATH	0.32	65	23.51	33	4.99	6.96	0.355	Cytoplasm, nucleus	Metabolism	0x1x2x3x4					
748	14-3-3-like protein GF14-C	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	14333_OR YSJ	0.34	78	28.98	30	4.78	4.95	0.533	Cytoplasm. Nucleus	Cell growth/division	3					
400	30S ribosomal protein S3	<i>Chlamydomonas moewusii</i>	RR3_CHL MO	0.09	60	92.66	11	10.58	5.97	0.218	Chloroplast	Protein synthesis	0					
1637	40S ribosomal protein S5-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RSS1_ARA TH	0.3	70	23.09	18	9.69	9.93	1.106	Cytoplasm	Protein synthesis	0x1x2x3					
1493	40S ribosomal protein S7	<i>Avicennia marina</i>	RS7_AVIM R	0.35	80	21.86	20	9.67	9.68	0.483	Cytoplasm	Protein synthesis	1x2x3					
399	4-hydroxycoumarin synthase 1	<i>Sorbus aucuparia</i>	BIPS2_SO RAU	0.14	60	43.51	10	5.42	8.33	0.233	Cytoplasm	Metabolism	0					
336	60S ribosomal protein L9	<i>Pisum sativum</i>	RL9_PEA ACT_GOS	0.21	59	21.85	17	9.32	4.88	0.265	Cytoplasm	Protein synthesis	0					
439	Actin	<i>Gossypium hirsutum</i>	ACT_GOS HI	0.29	98	41.87	41	5.31	4.22	0.804	Cytoplasm	Cell Structure	1					
453	Actin-104	<i>Nicotiana tabacum</i>	ACT7_TO BAC	0.23	63	37.18	40	5.57	4.65	0.960	Cytoplasm	Cell Structure	1					
171	Actin-53	<i>Nicotiana tabacum</i>	ACT2_TO BAC	0.42	111	37.46	40	5.39	4.65	0.960	Cytoplasm	Cell Structure	1					
239	Actin-66	<i>Solanum tuberosum</i>	ACT5_SOL TU	0.29	86	37.29	41	5.54	4.22	0.804	Cytoplasm	Cell Structure	1					
354	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ACBP2_A RATH	0.35	62	38.68	24	4.43	6.36	0.320	Membrane	Metabolism	0					
398	Adenosylhomocysteinase 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SAHH2_A RATH	0.22	68	53.81	84	5.49	5.77	0.259	Cytoplasm	Metabolism	0					
601	Allergen Ara h 1	<i>Arachis hypogaea</i>	ALL12_AR AHY	0.22	59	71.70	37	6.62	7.14	0.355	Chloroplast	Cell Structure	4					
2109	ATP synthase subunit beta	<i>Hevea brasiliensis</i>	ATPBM_H EVBR	0.23	95	60.34	59	5.95	4.59	0.242	Mitochondrion	Energy	0x1					
1678	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH	<i>Medicago sativa</i>	FTSH_ME DSA	0.16	65	75.80	32	5.64	7.79	0.238	Chloroplast	Protein destination and storage	1x2x3x4					
1586	Auxin-repressed 12.5 kDa	<i>Fragaria ananassa</i>	12KD_FRA AN	0.34	59	12.41	48	9.1	7.29	0.349	Cytoplasm	Cell growth/division	0x1x2x3x4					

1569	Formate dehydrogenase 1	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	FDH2_OR YSJ	0.14	63	41.54	26	6.68	7.91	0.214	Mitochondrion	Energy	0x1x2x3x4	
883	Fucosyltransferase 6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	FUT6_AR ATH	0.13	59	61.78	37	6.94	4.46	0.236	Golgi apparatus	Protein synthesis	0x1x2x3x4	
1375	Geraniol 8-hydroxylase	<i>Catharanthus roseus</i>	C76B6_CA TRO	0.18	62	55.91	52	9.08	5.71	0.605	Endoplasmic reticulum	Secondary metabolism	3x4	
1587	Glutamine synthetase cytosolic isozyme	<i>Lotus japonicus</i>	GLNA1_L OTJA	0.2	87	39.29	25	5.49	5.80	0.657	Cytoplasm	Metabolism	0x1x2x3x4	
2104	Glutathione S-transferase U3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GSTU3_A RATH	0.25	59	26.04	37	5.78	5.26	0.446	Chloroplast	Metabolism	0x1x2x3	
509	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Pinus sylvestris</i>	G3PC_PIN SY	0.18	66	36.68	37	6.67	5.33	0.210	Cytoplasm	Metabolism	1	
1911	GTP-binding nuclear protein Ran1	<i>Solanum lycopersicum</i>	RANI_SO LLC	0.38	106	25.51	25	6.25	7.00	0.418	Nucleus	Transcription	2x3	
1109	Heat shock 70 kDa protein	<i>Zea mays</i>	HSP7E_AR ATH	0.26	97	70.87	67	5.22	5.32	0.593	Cytoplasm	Disease/defense/stress response	4	
1441	Heat shock protein 81-1	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>indica</i>	HSP81_OR YSI	0.16	103	80.43	80	5	5.20	0.548	Cytoplasm	Disease/defense/stress response	3x4	
1426	Lanosterol synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LAS1_AR ATH	0.08	61	87.60	77	6.52	8.37	0.382	Endoplasmic reticulum	Metabolism	3x4	
684	Light-independent protochlorophyllide reductase subunit B	<i>Ephedra altissima</i>	CHLB_EP HAL	0.18	59	58.30	65	6.42	9.84	0.748	Chloroplast	Energy	4	
674	Luminal-binding protein in 3	<i>Zea mays</i>	BIP3_MAI ZE	0.23	91	73.28	73	5.13	5.21	0.357	Endoplasmic reticulum	Energy	4	
460	Malate dehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MDHC2_A RATH	0.34	77	36.00	35	6.33	6.89	0.763	Cytoplasm	Metabolism	0x1x2x3x4	
662	Malate dehydrogenase [NADP] 2	<i>Sorghum bicolor</i>	MDHP2_S ORBI	0.16	58	47.12	44	5.97	8.31	0.257	Chloroplast	Metabolism	4	
565	Maturase K	<i>Cannabis sativa</i>	MATK_CA NSA	0.16	58	60.66	75	9.38	9.67	0.290	Chloroplast	Protein synthesis	2	
1317	Monothiol glutaredoxin-S9	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	GRXS9_O RYSJ	0.4	63	13.63	40	6.82	4.94	0.390	Cytoplasm	Energy	0x1x2x3x4	
1939	Phaseolin, alpha-type	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHSA_PH AVU	0.34	141	49.24	13	5.25	9.88	0.773	Vacuole	Protein destination and storage	0x1x2x3	

1711	Phosphoenolpyruvate carboxylase 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAPP4_ARATH	0.14	54	11.73	19	6.68	6.59	0.730	Cytoplasm	Metabolism	0x1x2x3x4	
1913	Photosystem II 5 kDa protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PST2_ARATH	0.71	59	11.19	75	9.55	9.22	0.319	Chloroplast	Energy	2x3	
1450	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CID9_ARATH	0.2	63	36.92	86	6.91	5.47	0.412	Nucleus	Transcription	3x4	
329	Probable beta-1,3-galactosyltransferase 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	B3GT2_ARATH	0.23	66	46.76	11	8.98	6.48	0.225	Golgi apparatus	Metabolism	0	
679	Probable beta-1,4-xylosyltransferase IRIX14H	<i>Arabidopsis thaliana</i>	IX14H_ARATH	0.17	62	55.54	25	9.67	5.83	1.270	Golgi apparatus	Cell Structure	3x4	
2004	Probable cytosolic phosphoribosyltransferase	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	LOGL7_ORYSJ	0.21	61	24.05	23	5.06	5.95	0.368	Golgi apparatus	Cell growth/division	0x1x2x3x4	
1953	Probable fructokinase-3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SCRK3_ARATH	0.22	60	37.95	16	5.51	5.17	0.436	Cytoplasm	Metabolism	0x1x2x3x4	
326	Probable monodehydroascorbate reductase, cytoplasmic isoform 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MDAR1_ARATH	0.22	60	48.39	8	5.2	7.00	0.500	Golgi apparatus	Disease/defense/stress response	0	
913	Profilin-2	<i>Olea europaea</i>	PROCA_OLEEU	0.09	104	14.38	12	5	4.53	0.226	Cytoplasm	Cell Structure	3	
1963	Proteasome subunit beta type-3	<i>Picea mariana</i>	PSB3_PICMA	0.24	73	23.18	21	5.48	5.63	0.303	Cytoplasm, Nucleus	Protein destination and storage	0x1x2x3x4	
738	Putative disease resistance protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DRL4_ARATH	0.08	60	98.58	20	6.18	9.68	0.226	Nucleus	Disease/defense	3	
1973	Putative F-box protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	FB151_ARATH	0.21	60	21.62	24	9.44	4.92	0.652	Cytoplasm	Cell growth/division	0x1x2x3	
1590	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)	<i>Vitis aestivalis</i>	RBL_VITA	0.24	146	52.02	51	6.29	6.92	0.201	Chloroplast	Energy	1x2x3x4	
161	Serine/threonine protein phosphatase 2A 59 kDa regulatory subunit B' gamma isoform	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2A5G_ARATH	0.18	69	59.52	51	8.04	4.59	0.237	Cytoplasm	Signal transduction	1	

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram estudadas as culturas embriogênicas constituídas por PEMs em suspensão celular. Averiguou-se que:

- i. O sistema de suspensão celular é eficaz para a multiplicação de células em larga escala, com incremento de até 1,39x no massa fresca;
- ii. O subcultivo ótimo é com o máximo de duas semanas durante a fase exponencial a partir de um explante inicial de 2g de cultura para 100 mL de meio de cultura;
- iii. A fase inicial possui expressão de actinas e alta taxa de células em mitose;
- iv. A fase exponencial possui o máximo incremento em massa fresca;
- v. As proteínas vinculadas ao citoesqueleto, metabolismo e organização dos meristemas são expressas;
- vi. Na fase linear o meio de cultura é o mais ácido e com menor taxa de condutividade. São observadas proteínas relacionadas ao estresse como heat-shocks e chaperoninas.
- vii. Fase estacionária é observada sinais de morte celular tanto pela expressão de proteínas como pela análise de viabilidade e morte celular;
- viii. Mucilagem, pectinas foram vistos nas células suspensoras.

As conclusões supracitadas são resumidas de forma gráfica (Figura 2).

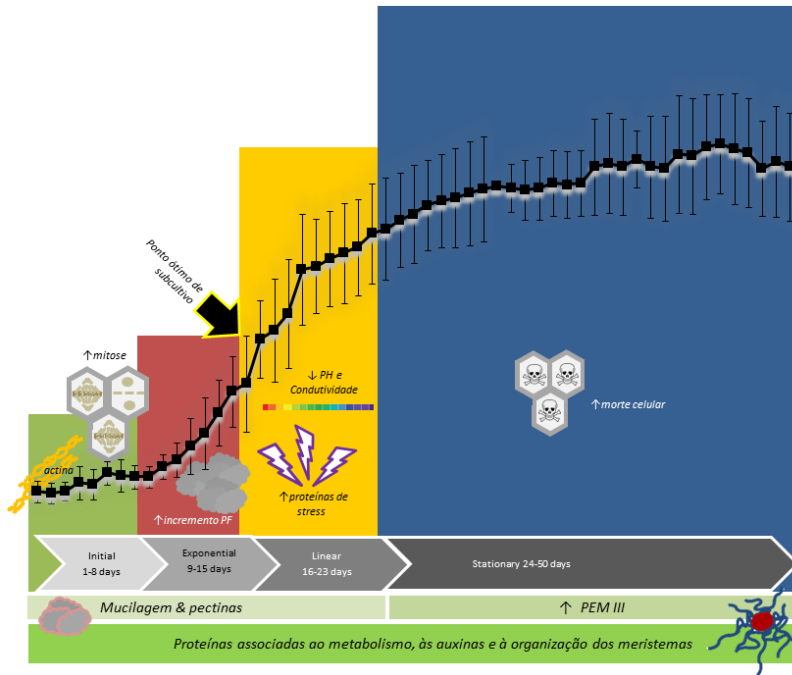


Figura 2: Resumo gráfico dos principais resultados das análises bioquímicas, histoquímicas e proteômicas de *A. angustifolia* em suspensão celular.

Neste estudo, observou-se a eficácia do sistema de suspensões celulares para a propagação massal e para estudo da biologia celular das araucárias. Sendo assim, salienta-se a aplicabilidade dessa técnica para futuros protocolos de visando a maturação das culturas celulares.

Igualmente, neste estudo foi constatado a forte presença de proteínas vinculadas ao citoesqueleto. Essas análises proteômicas abrem margem para maiores estudos com imunolocalização dessas proteínas, correlacionando com os descritos trabalhos de MET já realizados para a espécie.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSSON, M.; VALLADARES, S.; LARSSON, E.; CLAPHAM, D.; VON ARNOLD, S. Patterning during somatic embryogenesis in Scots pine in relation to polar auxin transport and programmed cell death. **Plant Cell Tissue, Organ and Culture**, v. 109, p. 391-400, 2012.
- AHUJA, I.; VOS, R. C. H. D.; BONES, A. M.; HALL, R. D. Plant molecular stress responses face climate change. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 664-674, 2010.
- AKIN-IDOWU, P. E.; IBITOYE, D. O.; ADEMOYEGUN, O. T. Tissue culture as plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3782-3788, 2009.
- ASCOM, I. Paraná perde mais de 700 hectares de floresta de araucária <http://www.ibama.gov.br/publicadas/parana-perde-mais-de-700-hectares-de-floresta-de-araucaria>, 2011.
- ASTARITA, L. V.; FLOH, E. S. I.; HANDRO, W. Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidase associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 113-118, 2003.
- ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* - induction and maintenance of embryonal suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 2, p. 113-118, 1998.
- _____. Conditioning of the Culture Medium by Suspension Cells and Formation of Somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, v. 36, n. 3, p. 194-200, 2000.
- BALBUENA, T. S. **Proteômica do desenvolvimento da semente de *Araucaria angustifolia***. 2009. 102, São Paulo.
- BALBUENA, T. S.; DIAS, L. L. C.; MARTINS, M. L. B.; CHIQUIERI, T. B.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E. I. S.; SILVEIRA, V. Challenges in proteome analyses of tropical plants. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 23, n. 2, p. 91-104, 2011.
- BALBUENA, T. S.; JO, L.; PIERUZZI, F. P.; DIAS, L. L. C.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; JUNQUEIRA, M.; THELEN, J. J.; SCHEVCHENKI, A.; FLOH, E. S. I. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 302-311, 2011.
- BALBUENA, T. S.; SILVEIRA, E. R.; JUNQUEIRA, M.; DIAS, L. L. C.; SANTA-CATARINA, C.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E. S. I. Changes in the 2-DE protein

profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*). **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 337-352, 2009.

BARKLA, B. J.; VERA-ESTRELLA, R.; HERNÁNDEZ-CORONADO, M.; PANTOJA, O. Quantitative proteomics of the tonoplast reveals a role for glycolytic enzymes in salt tolerance. **The Plant Cell**, v. 21, p. 4044-4058, 2009.

BENZANILLA, M.; GLADFELTER, A. S.; KOVAR, D. R.; LEE, W.-L. Cytoskeletal dynamics: a view from the membrane. **The Journal of Cell Biology**, v. 209, n. 3, p. 329-337, 2015.

BEVAN, M.; BANCROFT, I.; BENT, E.; LOVE, K.; GOODMAN, H.; DEAN, C.; BERGKAMP, R.; DIRKSE, W.; VAN STAVEREN, M.; STIEKEMA, W.; DROST, L.; RIDLEY, P.; HUDSON, S.-A.; PATEL, K.; MURPHY, G.; PIFFANELLI, P.; WEDLER, H.; WEDLER, E.; WAMBUTT, R.; WEITZENEGGER, T.; POHL, T. M.; TERRY, N.; GIELEN, J.; VILLARROEL, R.; CLERCK, R. D.; VAN MONTAGU, M.; LECHARNY, A.; AUBORG, S.; GY, I.; KREIS, M.; LAO, N.; KAVANAGH, T.; HEMPER, S.; KOTTER, P.; ENTIAN, K.-D.; RIEGER, M.; SCHAEFFER, M.; FUNK, B.; MULLER-AUER, S.; SILVEY, M.; JAMES, R.; MONTFORT, A.; PONS, A.; PUIGDOMENECH, P.; DOUKA, A.; VOUKELATOU, E.; MILIONI, D.; HATZOPOULOS, P.; PIRAVANDI, E.; OBERMAIER, B.; HILBERT, H.; DÜSTERHÖFT, A.; MOORES, T.; JONES, J. D. G.; ENEVA, T.; PALME, K.; BENES, V.; RECHMAN, S.; ANSORGE, W.; COOKE, R.; BERGER, C.; DELSENY, M.; VOET, M.; VOLCKAERT, G.; MEWES, H.-W.; KLOSTERMAN, S.; SCHUELLER, C.; CHALWATZIS, N. Analysis of 1.9Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 391, p. 485-488, 1998.

BOZHKO, P. V.; FILANOVA, L. H.; VON ARNOLD, S. A key development switch during norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. **Biotechnology and bioengineering**, v. 77, n. 6, p. 658-667, 2001.

BRASIL, A. **PF faz operação para combater crimes de madeiras em 11 cidades paranaenses.** Folha de São Paulo. <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ambiente/ult10007u656802.shtml> 2009.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants.** Maryland: American Society of Plant Physiology, 2000.

CAI, G. Assembly and disassembly of plant microtubules: tubulin modifications and binding to MAPs. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 3, p. 623-626, 2010.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. **Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret).** 2007. 276 Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARLSSON, L.; NYSTRÖM, L.-E.; SUNDKVIST, I.; MARKEY, F.; LINDBERG, U. Actin Polymerizability is Influenced by Profilin, a Low Molecular Weight Protein in Non-muscle Cells. **Journal of Molecular Biology**, v. 115, p. 465-483, 1977.

CARVALHO, M. M. X. D. **O desmatamento das florestas de araucária e o Médio Vale do Iguaçu: uma história de riqueza madeireira e colonizações**. 2006. 202 Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

_____. **Uma grande empresa em meio à floresta: a história da devastação da floresta com araucária e a Southern Brazil Lumber and Colonization (1870-1970)**. 2010. 313 (Doctor in Science). History, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Colombo: Embrapa Florestas, 1994. 639.

CHAU, N.-H.; RAMACHANDRAN, S.; MOLAGER, H. E.; HEDEHUSENE, C. **Alteration of plant morphology by control of profilin expression**. PATENT, U. S. US Institute of Molecular Agrobiolgy. 6344601B1: 1-10 p. 2002.

CITES. Apendices I, II and III. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>, 2014. Acesso em: April, 14th.

CODRINGTON, R. A.; SCOTT, K. D.; GRAHAM, G. C.; ROSSETTO, M.; RYAN, M.; WIFFEN, T.; HENRY, R. J.; HILL, K. Unresolved phylogenetic position of Wollemia, Araucaria and Agathis. In: BIELESKI, R. (Ed.). **Araucariaceae**. London: IDS, 2005. p.86-91.

COLOMBO, P. M.; RASCIO, N. Ruthenium Red Staining for Electron Microscopy of Plant Material. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 60, p. 135-139, 1977.

CULLIS, C. A. **Plant genomics and proteomics**. John Wiley & Sons, Inc, 2004.

DA SILVA, C. V.; DOS REIS, M. S. Produção de pinhão na região de Caçador, SC: Aspectos da obtenção e sua importância para comunidades locais **Ciência Floresta**, v. 19, n. 4, p. 363-374, 2009.

DANNER, M. A.; ZANETTE, F.; RIBEIRO, J. Z. O cultivo da araucária para produção de pinhões como ferramenta para a conservação. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 441-451, 2012.

DARJANIA, L.; ICHISE, N.; ICHIKAWA, S.; OKAMOTO, T.; OKUYAMA, H.; THOMPSON JR, G. A. Dynamic turnover of arabinogalactan proteins in cultured *Arabidopsis* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 69-79, 2002.

DEMARCHI, G.; STEFENON, V. M.; STEINER, N.; VIEIRA, F. D. N.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Ultra-low temperature conservation of Brazilian Pine embryogenic cultures. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 2057-2063, 2014.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 313, p. 1493-1509, 1997.

DOS REIS, M. S.; LADIO, A.; PERONI, N. Landscapes with Araucaria in South America: evidence for a cultural dimension. **Ecology and Society**, v. 19, n. 2, p. 1-14, 2014.

DOS SANTOS, A. L. W.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; MARASCHIN, M.; GUERRA, M. P. Biochemical and morphological changes during the growth kinetics of *Araucaria angustifolia* suspension cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 497-504, 2010.

DOS SANTOS, A. L. W.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; VIDOR, M.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 97-106, 2002.

DOS SANTOS, A. L. W.; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; ZOGLAUER, K.; MOERSCHBACHER, B. M. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 195-199, 2008.

DOS SANTOS, A. L. W. S., V.; STEINER, N.; VIDOR, M.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian Archives of Biology and Technology** v. 45, p. 97-106, 2002.

DSMA. **II Workshop sobre a lista das espécies da flora catarinense ameaçadas de extinção**. Secretaria de Estado do desenvolvimento econômico sustentável. Florianópolis, p.1-101. 2011a

_____. **II Workshop sobre a lista das espécies da flora catarinense ameaçadas de extinção**. SUSTENTÁVEL, S. D. E. D. D. E. Florianópolis: 1-101 p. 2011b.

DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. **Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology**, v. 8, p. 147, 1988a.

_____. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology and genetic engineering reviews**, v. 6, p. 341-377, 1988b.

DURZAN, D. J.; CHALUPA, V. Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (*Pinus banksiana*). III. Growth of cells in ferous Plants by Somatic Embryogenesis liquid suspension cultures in light and darkness. **Canadian Journal of Botany**, v. 54, p. 456-467, 1976.

DURZAN, D. J.; GUPTA, P. K. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in conifers. **Biotechnology in agriculture**, p. 53-81, 1988.

DUTRA, N. T.; SILVEIRA, V.; AZEVEDO, A. G. D.; GOMES-NETO, L. R.; FAÇANHA, A. R.; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. S. I.; SANTA-CATARINA, C. Polyamines affect the cellular growth and structure of the pro-embryogenic masses in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures through the modulation of proton pump activities and endogenous levels of polyamines. **Physiologia Plantarum**, v. 148, p. 121-132, 2013.

EMANI, C.; HALL, T. C. Phaseolin: structure and evolution. **The Open Evolution Journal**, v. 2, p. 66-74, 2008.

EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillian, 1983. 970.

FARIAS-SOARES, F. L.; BURRIEZA, H. P.; STEINER, N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos. **Protoplasma**, v. 250, p. 911-918, 2013.

FARIAS-SOARES, F. L.; STEINER, N.; SCHMIDT, E. C.; PEREIRA, M. L. T.; ROGGE-RENNER, G. D.; BOUZON, Z. L.; FLOH, E. S. I.; GUERRA, M. P. The transition of proembryogenic masses to somatic embryos in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is related to the endogenous contents of IAA, ABA and polyamines. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, p. 1853-1865, 2014.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds -a study on three unrelated species. **Planta**, v. 178, p. 189-198, 1989.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUTIS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, v. 74, p. 201-228, 2003.

FILANOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; VON ARNOLD, S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 4399-4411, 2000.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. D. N.; HERINGER, A. S.; PUTTKAMMER, C. C.; SILVIERA, V.; GUERRA, M. P. DNA methylation and proteome profiles of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures as affected by plant

growth regulators supplementation. **Plant Cell Tissue, Organ and Culture**, p. 1-23, 2016.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. D. N.; PUTTKAMMER, C. C.; OLIVEIRA, E. M.; GUERRA, M. P. Time-lapse cell tracking reveals morphohistological features in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze. **Trees**, v. 29, p. 1613-1623, 2015.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3 rd. Dordrecht: Springer, 2008.

GIFFORD, E. M.; FOSTER, A. S. Coniferophyta. In: (Ed.). **Morphology and evolution of vascular plants**. 3rd. New York: W. H. Freeman and Company, 1996. cap. 17, p.401-453.

GRAAFF, E. V. D.; LAUX, T.; RENSING, S. A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. **Genome Biology**, v. 10, n. 248, p. 1-10, 2009.

GUERRA, M. P.; DE LUCCA, P.; NIETSCHE, S.; KEMPER, E. L. Biotecnologia de coníferas: inducao e estabelecimento de linguagens celulares poliembriogeneticas de *Araucaria angustifolia* e *Pinus elliottii* var. *elliottii*., Congresso Florestal Panamericano e Congresso Florestal Brasileiro, 1993, Curitiba. SBS. p.87-91.

GUERRA, M. P.; KEMPER, E. L. Tecnologias futuras: aplicação da poliembriogênese para a propagação massal de plantas elite de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista do Instituto Florestal**, v. 4, p. 1233-1236, 1992.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; DOS SANTOS, A. L. W.; ASTARITA, L. V.; NODARI, R. O. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K., *et al* (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants** Dordrecht: Kluwer Academic v.6, 2000a. p.457-478.

_____. The somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K., *et al* (Ed.). **Somatic Embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, v.6, 2000b. cap. 14, p.457-479.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; REIS, M. S. D.; SCHNEIDER, L. **Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*)**. Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais. SIMÕES, L. L. e LINO, C. F. São Paulo: SENAC: 85-101 p. 2002a.

_____. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L. L. e LINO, C. F. (Ed.). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração dos recursos florestais**. São Paulo: FENAC, 2002b. p.85-101.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; SANTOS, A. L. W.; ASTATIRA, L. V.; NODARI, R. O. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. In: JAIN, S. e GUPTA, R. N. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, v.6, 2000. p.180-205.

GUERRA, M. P.; STEINER, N.; MANTOVANI, A.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. D.; SANTOS, K. L. D. Araucária In: BARBIERI, R. L. e STUMPF, E. R. T. (Ed.). **Origem e evolução das plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p.149-184.

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

HAECKER, A.; GROSS-HARDT, R.; GEIGES, B.; SARKAR, A.; BREUNINGER, H.; HERRMANN, M.; LAUX, T. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 131, n. 656-668, 2004.

HALL, T. C.; CHANDRASEKHARAN, M. B.; LI, G. Phaseolin: its past, proprieties, regulation and future. In: SHEWRY, P. R. e CASEY, R. (Ed.). **Seed protein**. Dordrecht: Springer 1999. p.209-249.

HANDRO, W.; FERREIRA, C. M. Preliminary report on tissue culture of *Araucaria angustifolia*. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 8, p. 71-74, 1980.

HEDMAN, H.; ZHU, T.; VON ARNOLD, S.; SOHLBERG, J. J. Analysis of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX gene family in the conifer *Picea abies* reveals extensive conservation as well as dynamic patterns. **Bio Medicine**, v. 13, p. 2-10, 2013.

HELDT, H.-W.; PIECHULLA, B.; HELDT, F. **Plant Biochemistry**. London: Elsevier, 2011.

HENG, Y.-W.; KOH, C.-G. Actin cytoskeleton dynamic and the cell division cycle. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, p. 1622-1633, 2010.

HÖGGER, K.-A. **Possibilities and Limitations of Vegetative Propagation in Breeding and Mass Propagation of Norway Spruce**. 2003. 43 (Doctor). Plant biology and forest genetics, Swedish University of Agriculture Sciences, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.

HUSSAIN, A.; QARSHI, I. A.; NAZIR, H.; ULLAH, I. Plant tissue culture: current status and opportunities. In: LEVA, A. e RINALDI, L. M. R. (Ed.). **Recent advances in plant in vitro culture**: INTECH, 2012. cap. 1, p.1-28.

HUSSEY, P. J.; KETELAAR, T.; DEEKS, M. J. Control of actin cytoskeleton in plant cell growth. **Annuals Review Plant Biology**, v. 57, p. 109-125, 2006.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species(tm). 2014. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/search> >. Acesso em: April, 14th.

JACOBS, D. I.; HEIJDEN, R. V. D.; VERPOORTE, R. Proteomics in plant biotechnology and secondary metabolism research. **Phytochemical analysis**, v. 11, p. 277-287, 2000.

JO, L.; DOS SANTOS, A. L. W.; BUENO, C. A.; BARBOSA, H. R.; FLOH, E. S. I. Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. **Tree Physiology**, v. 34, p. 94-104, 2014.

KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, v. 12, p. 17-45, 1960.

KLIMASZEWSKA, K.; CYR, D. R. Conifer somatic embryogenesis: I developmelnt. **Dendrobiology**, v. 48, p. 31-39, 2002.

KORLACH, J.; ZOGLAUER, K. Developmental patterns during direct somatic embryogenesis in protoplasts culture of european larch (*Larix decidua* Mill.). **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 242-247, 1995.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Universidade Rural do Rio de Janeiro, 1997.

KURAKAWA, T.; UEDA, N.; MAEKAWA, M.; KOBAYASHI, K.; KOJIMA, M.; NAGATO, Y.; SAKAKIBARA, H.; KYOZUKA, J. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. **Nature**, v. 445, p. 652-655, 2007.

KUROHA, T.; TOKUNAGA, H.; KOJIMA, M.; UEDA, N.; ISHIDA, T.; NAGAWA, S.; FUKUDA, H.; SUGIMOTO, K.; SAKAKIBARA, H. Functional Analyses of *LONELY GUY* Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 21, p. 3152-3169, 2009.

LARSSON, E.; SITBON, F.; LIUNG, K.; VON ARNOLD, S. Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce. **New Phytologist**, v. 177, p. 365-366, 2008.

LAUX, T.; JÜRGENS, G. Embryogenesis: a new start in life. **The Plant Cell**, v. 9, p. 989-1000, 1997.

LIAN, G.; DING, Z.; WANG, Q.; ZHANG, D.; XU, J. Origins and evolution of WUSCHEL-Related Homeobox protein family in plant kingdom. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

LLYOD, C.; CHAN, J. The parallel lives of microtubules and cellulose microfibrils. **Current opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 641-646, 2008.

LULSDORF, M. M.; TAUTORUS, T. E.; KIKCIO, S. I.; DUNSTAN, D. I. Growth parameters of embryogenic suspension cultures of interior spruce (*Picea glauca-engelmannii*) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). **Plant Science**, v. 82, p. 227-234, 1992.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. C.; REIS, M. S. D. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 787-796, 2004.

MARCHIORI, J. N. C. Família Araucariaceae. In: (Ed.). **Dendrologia das gimnospermas**. Santa Maria: UFSM, 1996. cap. 10, p.111-125.

MARTINS-RAMOS, D.; CHAVES, C. L.; BORTOLUZZI, R. L. D. C.; MANTOVANI, A. Florística de Floresta Ombrófila mista altomontana e campos em Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 2, p. 156-166, 2011.

MATHESIUS, U.; KEIJZERS, G.; NATERA, S. H. A.; WEINMAN, J. J.; DJORDJEVIC, M. A.; ROLFE, B. G. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. **Proteomics**, v. 1, p. 1424-1440, 2001.

MAURER, J. B. B.; BACIC, A.; PEREIRA-NETTO, A. B.; DONATTI, L.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; PETTOLINO, F. A. Arabinogalactan-proteins from cell suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1400-1409, 2010.

MMA. **Convenção Sobre a Diversidade Biológica**
www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/arquivos/cdbport.pdf 2000a.

_____. **Convenção sobre a Diversidade Biológica**
www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/arquivos/cdbport.pdf 2000b. Acesso em: November, 10th.

_____. **Floresta com Araucárias**
www.mma.gov.br/estruturas/202/arquivos/folder_consulta02.pdf, 2002. Acesso em: January, 25th.

_____. **INSTRUÇÃO NORMATIVA No 06, DE 23 DE SETEMBRO DE 2008. II 06/2008**. AMBIENTE, M. D. M. Brasil: 52 p. 2008.

MORTIER, V.; WASSON, A.; JAWOREK, P.; KEYSER, A. D.; DECROOS, M.; HOLSTER, M.; TRAKOWSKI, P.; MATHESIUS, U.; GOORMACHTIG, S. Role of *LONELY GUY* genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*. **New Phytologist**, v. 202, p. 582-593, 2014.

MUSTAFA, N.; WINTER, W.; IREN, F.; VERPOORTE, R. Initiation, growth and crypreservation of plant cell suspensions cultures. **Nature Protocols**, v. 6, p. 715-742, 2011.

NOLLEN, E. A. A.; MORIMOTO, R. I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 14, p. 2809-2816, 2002.

OPPENHEIMER, D. G.; HAAS, N.; SILFLOW, C. D.; SNUSTAD, D. P. The beta tubulin gene family of *Arubidopsis thaliana*: preferential accumulation of the beta1 transcript in roots. **Gene**, v. 63, p. 87-102, 1988.

PALOVAARA, J.; HAKMAN, I. Conifer WOX-related homeodomain transcription factors, developmental consideration and expression dynamic of WOX2 during *Picea abies* somatic embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, v. 66, p. 533-549, 2008.

_____. WOX2 and polar auxin transport during spruce embryo pattern formation. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4, n. 2, p. 153-155, 2009.

PEROCHON, A.; ALDON, D.; GALAUD, J.-P.; RANTY, B. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. **Biochemistry**, v. 93, p. 2048-2053, 2011.

PIERUZZI, F. P.; DIAS, L. L. C.; BALBUENA, T. S.; SANTA-CATARINA, C.; DOS SANTOS, A. L. W.; FLOH, E. S. I. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). **Annals of Botany**, v. 108, p. 337-345, 2011.

PIVETTA, M. Quando os pinheiros eram anões. **Pesquisa FAPESP**, v. 84, p. 50-53, 2003.

POZO, J. C. D.; MANZANO, C. Auxin and the ubiquitin pathway. Two players—one target: the cell cycle in action. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 10, p. 2617-2632, 2014.

RADAUER, C.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Profilins. In: MILLS, E. N. C. e SHEWRY, P. R. (Ed.). **Plant Food Allergens**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p.105-124.

- RAGHAVAN, V.; SHARMA, K. K. Zygotic embryogenesis in gymnosperm and angiosperm. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1995. p.73-115.
- RAMAGLI, L. S.; RODRIGUEZ, L. V. Quantitation of microgram amounts of protein in twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. **Electrophoresis**, v. 1085, n. 6, p. 559-563, 1985.
- REDDY, A. S. N.; POOVAIAH, B. W. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed mRNA: correlation between fruit growth and repression of the auxin-regulated gene. **Plant Molecular Biology**, v. 14, p. 127-136, 1990.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M. Araucariáceas. **Flora Ilustrada Catarinense**, p. 1-62, 1966.
- ROCKENBACH, M. F.; BONETI, J. I.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; GAVIOLI-NASCIMENTO, M. C. A.; GUERRA, M. P. Histological and proteomics analysis of apple defense responses to the development of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 89, p. 97-107, 2015.
- ROGGE-RENNER, G. D. **Origem e desenvolvimento de embriões zigóticos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**. 2014. 92 (Doctor). Recurso Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SANTER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, v. 459, p. 1071-1078, 2009.
- SANTOS, S. C. **Índios e brancos no Sul do Brasil: a dramática experiência dos Xokleng**. Florianópolis: Edune, 1973. 312.
- SETOGUCHI, H.; OSAWA, T. A.; PINTAUD, J.-P.; JAFFRÉ, T.; VEILLON, J.-M. Phylogenetic Relationships within Araucariaceae Based on RBCL gene sequences **American Journal of Botany**, v. 85, n. 11, p. 1507-1516, 1998.
- SHI, H.-Y.; ZHANG, Y.-X.; CHEN, L. Two pear auxin-repressed protein genes, PpARP1 and PpARP2, are predominantly expressed in fruit and involved in response to salicylic acid signaling. **Plant Cell Tissue, Organ and Culture**, v. 114, p. 279-286, 2013.
- SILVEIRA, V.; BALBUENA, T. S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E. S. I.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regulation**, v. 44, p. 147-156, 2004.

SILVEIRA, V.; DOS SANTOS, A. L. W.; STEINER, N.; GUERRA, M. P. Fatores associados a indução da poliembriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bert) Ktze.. **Brazilian Journal of Plant Physiology** v. 11, n. supplement, p. 66, 1999.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N. N.; SCHERER, G. F. E.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. S. I. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, v. 171, p. 91-98, 2006.

SILVEIRA, V.; STEINER, N.; DOS SANTOS, A. L. W.; GUERRA, M. P. Indução, caracterização citoquímica e dinâmica de crescimento em linhagens poliembriogênicas de *Araucaria angustifolia* **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 11, n. supplement, p. 66-67, 1999.

SILVEIRA, V.; STEINER, N.; DOS SANTOS, A. L. W.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biotechnology tools in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 463-470, 2002.

SNEDDEN, W. A.; FROMM, H. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 8, p. 299-304, 1998.

_____. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. **New Phytologist**, v. 151, p. 35-66, 2001.

SOMERS, D. E.; FUJIWARA, S. Thinking outside the F-box: novel ligands for novel receptors. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 4, p. 206-213, 2009.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, v. 73, p. 15-35, 2003.

STEFENON, V. M.; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: a case study of *Araucaria angustifolia*. **Biodiversity Conservation**, v. 18, p. 2433-2448, 2009.

STEINER, N. **Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* (Linnaeus) e *Picea abies* (Linnaeus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão proteica e do gene SERK**. 2009. 155 Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

STEINER, N.; FARIAS-SOARES, F. L.; SCHMIDT, E. C.; PEREIRA, M. L. T.; SCHEID, B.; ROGGE-RENNER, G. D.; BOUZON, Z. L.; SCHMIDT, D.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Toward establishing a morphological and

ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Protoplasma**, p. 1-15, 2015.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J. B. R.; BALBUENA, T. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W.; FLOH, E. S. I.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* biotechnology. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 20-28, 2008.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E. S. I.; GUERRA, M. P. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell Tissue, Organ and Culture**, v. 89, p. 55-62, 2007.

STEINER, N.; VIEIRA, F. D. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 705-708, 1958.

STRAETEN, D. V. D.; POUSADA-RODRIGUES, R. A.; GOODMAN, H. M.; MONTAGU, M. V. Plant enolase: gene structure, expression and evolution. **The Plant Cell**, v. 3, p. 719-735, 1991.

SZABADOS, L.; MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. In: ROCA, W. M. e MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1993. p.174-210.

TAUTORUS, T. E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1873-1899, 1991.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; MALABADI, R. B. Factors affecting somatic embryogenesis in conifers. **Journal of Forestry Research**, v. 23, n. 4, p. 503-515, 2015.

THIELLEMENT, H.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C. **Plant Proteomics**. Totowa: Humana Press, 2007. 416.

THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v. 37, p. 169-180, 2007.

VALENTE, C.; PASQUALIM, P.; JACOMASSO, T.; MAURER, J. B. B.; SOUZA, E. M. D.; MARTINEZ, G. R.; ROCHA, M. E. M.; CARNIERI, E. G. S.; CADENA,

S. M. S. C. The involvement of PUMP from mitochondria of *Araucaria angustifolia* embryogenic cells in response to cold stress. **Plant Science**, p. 84-91, 2012.

VIEIRA DA SILVA, C.; MARTINS, G.; STEINER, N.; SANTOS, K. L.; CAMARGO, R. S.; MANTOVANI, A.; KUBO, R. R.; GUERRA, M. P.; REIS, M. S. D. *Araucaria angustifolia*: pinheiro brasileiro. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A., *et al* (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - região sul**. Brasília: MMA, 2011a. p.134-150.

VIEIRA DA SILVA, C.; MARTINS, G.; STEINER, N.; SANTOS, K. L.; CAMARGO, R. S.; MANTOVANI, A.; KUBO, R. R.; GUERRA, M. P.; REIS, M. S. D. *Araucaria angustifolia*: pinheiro brasileiro. . In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A., *et al* (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - região sul**. Brasília: MMA, 2011b. p.134-150.

VIEIRA, L. D. N. **Regulação da Embriogênese Somática de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze pelo Mecanismo Redox**. 2011. 34 (Engenheira Agrônoma). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

VOGEL, G. How does a single somatic cell become a whole plant? **Science**, v. 309, p. 86, 2005.

VON ARNOLD, S. Somatic Embryogenesis. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A., *et al* (Ed.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3 rd. Dordrecht: Springer, v.1, 2008. p.335-358.

VON ARNOLD, S.; EGERTSDOTTER, U.; EKBERG, I.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. Somatic Embryogenesis in Norway Spruce (*Picea abies*). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K., *et al* (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrchet: Springer Netherlands, v.3, 1995. p.44-46.

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

WANG, W.; VINOUCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 5, p. 244-252, 2004.

WEBSTER, J. M.; OXLEY, D.; PETTOLINO, F. A.; BACIC, A. Characterisation of secreted polysaccharides and (glyco)proteins from suspension cultures of *Pyrus communis*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 873-881, 2008.