

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –
UENF**

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DURANTE O CONTROLE
DO CICLO CELULAR NA EMBRIOGENESE SOMÁTICA EM *Araucaria
angustifolia* (Bert.) O. Ktze.**

JACKELLINNE CAETANO DOUÉTTS PERES

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO/2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –
UENF
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL**

JACKELLINNE CAETANO DOUÉTTS PERES

**ORIENTADOR: Prof. Dra. CLAUDETE SANTA-CATARINA
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCO ANTONIO LOPES CRUZ**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DURANTE O CONTROLE
DO CICLO CELULAR NA EMBRIOGENESE SOMÁTICA EM *Araucaria
angustifolia* (Bert.) O. Ktze.**

JACKELLINNE CAETANO DOUÉTTS PERES

“Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia”.

Orientadora: Prof^a. Dra. Claudete Santa Catarina

Co-orientado: Prof. Dr. Marco Antonio Lopes Cruz

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO- 2013

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DURANTE O CONTROLE
DO CICLO CELULAR NA EMBRIOGENESE SOMÁTICA EM *Araucaria
angustifolia* (Bert.) O. Ktze.**

JACKELLINNE CAETANO DOUÉTTS PERES

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia”.

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2013.

Comissão Examinadora:

Prof^a. (Título e área de especialização) – UENF

Prof^a. (Título e área de especialização) – UENF

Prof^a. (Título e área de especialização) – UENF

Prof. Dr. Marco Antônio Lopes Cruz (D.Sc. Biotecnologia) – UFRJ
(Co-orientador)

Prof^a. Dra. Claudete Santa Catarina (D.Sc. Biotecnologia) – UENF
(Orientadora)

Dedico a minha mãe Telma
e a minha filha Marianna.

*"Nem toda semente germina,
por isso, continue plantando."*

Juahres Alves

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a Professora Claudete Santa-Catarina pela oportunidade da realização deste trabalho, pelos ensinamentos, apoio, confiança e efetiva orientação, que me enriqueceram tanto no âmbito acadêmico quanto pessoal.

Ao Professor Marco Antônio Lopes Cruz (UFRJ/Macaé) pela coorientação, que foi imprescindível para realização deste trabalho.

Aos Professores do Grupo de Biotecnologia que deram suporte para a realização deste trabalho principalmente os Professores Vanildo Silveira, Miguel Pedro Guerra (CCA/UFSC) e Eny lochevet Segal Floh (IB/USP).

Agradeço a CAPES pela bolsa e ao CNPq e a FAPERJ pelo suporte financeiro. A Professora Nadir Sant'Anna pelo incentivo e encaminhamento para o Grupo de Biotecnologia do qual agora faço parte.

Aos colegas do Laboratório, especialmente Bruno, Victor, Kariane, Carol, Ana, Vanessa, Ellen, Tainá, Ricardo, Luiz André, Lucas e Tatiana, por tornarem mais agradáveis as aulas, os experimentos e os dias nesta Universidade.

Aos funcionários da UENF, em especial Gerusa, Adrianinha e Luciana pela boa vontade em todos os momentos.

Agradeço a Deus e a minha família, pois todos de alguma forma contribuíram para minha trajetória até o presente momento.

A minha mãe Telma, e as tias Gianni, Rita, Luciene e Juciene que sempre me incentivaram e apoiaram em todos momentos da vida.

A minha avó Genilsa, carinhosamente chamada de mãezinha, pois sua ajuda foi imprescindível para a realização deste trabalho.

As amigas e irmãs de coração Adriana, Karine, Tânia e Rosiane pelos momentos de descontração em meio a tantos contratemplos.

Ao meu amado marido Felipe, pelo amor e paciência que me dedica todos os dias, por nossa filha Marianna, que traz alegria para minha vida com seu lindo sorriso e pelo Eduardo quem já considero meu filho e completa nossa família.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VI
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A ESPÉCIE.....	3
2.2 EMBRIOGÊNESE ZIGÓTICA.....	4
2.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	6
2.4 CICLO DE DIVISÃO CELULAR.....	10
2.5 POLIAMINAS.....	14
2.6 ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	16
2.7 CARBOIDRATOS.....	19
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	23
4.2 ESTABELECIMENTO DAS SUSPENSÕES CELULARES.....	23
4.3 EFEITO DO INIBIDOR SP600125 SOBRE O CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E CONTEÚDO ENDÓGENO DE PAs, CARBOIDRATOS E NO.....	24
4.4 CRESCIMENTO CELULAR.....	24
4.4.1 Análise do volume celular sedimentado.....	24
4.4.2 Análise de MF e MS.....	25
4.4.3 Área das células embriogênicas e das células suspensor.....	25
4.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	26
4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	26
4.6.1 Quantificação e visualização de NO.....	26
4.6.2 Quantificação das PAs.....	27
4.6.3 Quantificação de carboidratos.....	27
5 RESULTADOS.....	29
5.1 CRESCIMENTO CELULAR.....	29
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	34
5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	36
5.3.1 Carboidratos.....	36
5.3.2 Óxido Nítrico (NO).....	40
5.3.3 Poliaminas.....	43
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÕES.....	63
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento do embrião zigótico de <i>A. angustifolia</i>	6
Figura 2. Representação esquemática da embriogênese somática em <i>A. angustifolia</i>	9
Figura 3. Estrutura do Inibidor SP600125..	13
Figura 4. Rota de síntese de PAs e enzimas..	15
Figura 5. Vias de síntese de NO dependente de L-arginina e dependente do nitrito descritas em plantas	18
Figura 6. Crescimento em VCS (mm) em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	30
Figura 7. Crescimento em MF (mg) em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	31
Figura 8. Crescimento em MS em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	32
Figura 9. Área das células embriogênicas de PEMS em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	33
Figura 10. Área das células suspensor das PEMs em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	34
Figura 11. Aspectos morfológicos de PEMs em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	35
Figura 12. Aspectos morfológicos das PEMs em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	36
Figura 13. Conteúdo (mg/g de MF) de sacarose em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	37
Figura 14. Conteúdo (mg/g de MF) de frutose em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	39
Figura 15. Conteúdo (mg/g de MF) de glicose em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	40
Figura 16. Conteúdo (fluorescência relativa/ μm^2) de NO em células embriogênicas de culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	41
Figura 17. Conteúdo (fluorescência relativa/ μm^2) de NO em células do suspensor de culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	42
Figura 18. Conteúdo ($\mu\text{g/g}$ MF) de PAs livres totais em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	44
Figura 19. Conteúdo ($\mu\text{g/g}$ de MF) de PAs livres totais em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	45
Figura 20. Conteúdo de PAs em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	47
Figura 21. Conteúdo de PAs em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	48
Figura 22. Razão entre as PAs [Put/(Spd+Spm)] em culturas celulares de <i>A. angustifolia</i>	49

RESUMO

Araucaria angustifolia é uma espécie nativa que devido a sua importância econômica foi intensamente explorada e atualmente, encontra-se ameaçada de extinção. Como alternativa para a conservação, o aprimoramento de técnicas biotecnológicas, como a embriogênese somática, se torna relevante e pode contribuir tanto para a conservação da espécie, como para servir de modelo em estudos básicos. Estudos mostram a importância de compostos como poliaminas (PAs), carboidratos e óxido nítrico (NO), os quais estão associados a etapas cruciais durante o crescimento e desenvolvimento, atuando na transição entre a multiplicação e a diferenciação de embriões somáticos na maturação. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inibição do ciclo celular em culturas celulares de *A. angustifolia* através de alterações na morfologia, no crescimento e no metabolismo endógeno de NO, PAs e carboidratos. O inibidor SP600125, que atua sobre o ciclo celular, foi utilizado nas concentrações de 0, 1 e 10 μM em duas diferentes linhagens celulares mantidas em suspensão. Foi observada inibição dose-dependente da divisão celular, reduzindo o crescimento e a multiplicação das culturas celulares de ambas linhagens estudadas, MSG (embriogênica) e BM (não embriogênica) na maior concentração (10 μM) utilizada. A inibição neste tratamento afetou o metabolismo de carboidratos, PAs e NO, reduzindo o conteúdo destes compostos nas duas linhagens utilizadas comparando-se com os tratamentos controle e 1 μM do inibidor. As duas linhagens celulares apresentaram diferenças entre si tanto na morfologia, quanto no perfil dos metabólitos analisados. A linhagem não embriogênica (BM) apresentou teores de frutose, glicose e NO inferiores aos encontrados na linhagem embriogênica (MSG). Por outro lado, o conteúdo de PAs livres endógenas putrescina (Put), espermedina (Spd) e espermina (Spm) e a razão [Put/(Spd+Spm)] observados na linhagem não embriogênica (BM), foi superior aos da linhagem embriogênica (MSG). Estes estudos forneceram resultados inéditos e importantes sobre o metabolismo destes compostos durante o controle do ciclo celular em culturas celulares com diferentes potenciais para a embriogênese somática, os quais poderão ser utilizados para melhor entender as fases de multiplicação e maturação das culturas embriogênicas em *A. angustifolia* e outras espécies de interesse.

Palavras-Chave: Embriogênese somática, Ciclo celular, Carboidratos, Poliaminas, Óxido Nítrico, SP600125.

ABSTRACT

Araucaria angustifolia is a native species that due to its economic importance was heavily exploited and currently, is threatened with extinction. As an alternative to the conservation, improvement of biotechnological techniques such as somatic embryogenesis, becomes relevant and can contribute to both the conservation of the species, to serve as a model for basic studies. Studies show the importance of compounds such as polyamines (PAs), carbohydrates, and nitric oxide (NO), which were associated in critical stages during development and growth, acting in the transition from the multiplication and differentiation of somatic embryo maturation. This study aimed to evaluate the effect of inhibition of the cell cycle in cell cultures of *A. angustifolia* by changes in morphology, growth and metabolism of endogenous NO, PAs and carbohydrates. The inhibitor SP600125, which acts on the cell cycle was used at concentrations of 0, 1 and 10 mM in two different cell lines maintained in suspension. We observed dose-dependent inhibition of cell division, reducing the growth and multiplication of both cell lines studied, MSG (embryogenic) and BM (not embryonic) at the highest concentration (10 mM) used. Inhibition this treatment affected the metabolism of carbohydrates, PAs and NO, reducing the content of these compounds in the two cell lines used compared with the control treatment and 1 mM inhibitor. The two cell lines differ from each other both in morphology and in the profile of metabolites analyzed. The lineage non embryogenic (BM) showed levels of fructose, glucose and NO lower than those found in embryonic lineage (MSG). On the other hand, the content of free endogenous PAs putrescine (Put), spermedine (Spd) and sperminae (Spm) and the ratio [Put / (Spd + Spm)] observed in non embryogenic line (WB) was superior to that of embryonic lineage (MSG). These studies have provided important new results and on the metabolism of these compounds during the cell cycle control in cell cultures with different potential for somatic embryogenesis, which can be used to better understand the steps of multiplication and maturation of embryogenic cultures in *A. angustifolia* and other species of interest.

Keywords: Somatic embryogenesis, cell cycle, carbohydrates, polyamines, nitric oxide, SP600125.

1 INTRODUÇÃO

Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze é uma conífera nativa da Mata Atlântica com importância econômica pela alta qualidade da madeira. Em decorrência da exploração indiscriminada sem o reflorestamento das áreas afetadas, ocorreu um esgotamento das reservas naturais restando atualmente, apenas 1-2% do original (Guerra *et al.*, 2002). Esta condição resultou na inclusão desta espécie na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais), na categoria de espécie criticamente em perigo (IUCN, 2012).

O estabelecimento de estratégias de conservação das espécies florestais nativas, como *A. angustifolia*, exige informações sobre a biologia reprodutiva e a ecologia, bem como, estudos básicos sobre sistemas de cultura de embriões zigóticos, embriogênese somática e micropropagação, complementadas com a caracterização molecular. Tais estudos podem fornecer as bases para a integração com as abordagens convencionais, possibilitando a conservação de germoplasma de espécies nativas a curto, médio e longo prazo.

Neste contexto, a aplicação de técnicas biotecnológicas pode ser uma alternativa para a manutenção de espécies nativas. A embriogênese somática é uma técnica biotecnológica que possibilita criar um modelo de referência para estudos básicos em fisiologia, bioquímica e biologia celular e molecular. Esta técnica permite também alcançar a propagação clonal, possibilitando que espécies sejam conservadas (Guerra *et al.*, 2000). Esta estratégia possui o potencial de ser utilizada na produção de mudas, em programas de reflorestamento e restauração de áreas degradadas, além disso pode ser utilizada em programas de melhoramento genético, pela facilidade de aplicação de técnicas de transformação genética.

A modulação do desenvolvimento da embriogênese somática envolve vários fatores, como reguladores de crescimento (por exemplo as poliaminas - PAs) e carboidratos, que apresentam efeitos diretos na sinalização celular, atuando nos processos fisiológicos e bioquímicos nas várias etapas da embriogênese. O balanço destes compostos controla o crescimento, a diferenciação e o desenvolvimento dos embriões somáticos. Neste sentido,

recentes estudos tem demonstrado o efeito das PAs (Silveira *et al.*, 2006) e glutathiona (Vieira *et al.*, 2012) no crescimento, morfologia e metabolismo de óxido nítrico (NO) em culturas celulares de *A. angustifolia*. Foi sugerido que estes compostos desempenham um papel fundamental no processo de embriogênese, orientando fases sequenciais deste processo morfogênético. O perfeito funcionamento do ciclo celular é crucial para a formação do embrião somático, e níveis adequados de PAs, carboidratos e NO são requeridos para sua formação (Carrier *et al.*, 1999; Ötvös *et al.*, 2005; Steiner *et al.*, 2008; Osti *et al.*, 2010).

Estudos tem mostrado que a adição de agentes promotores de maturação, como ácido abscísico (ABA), maltose e polietileno glicol (PEG), promovem uma redução no crescimento celular e direcionam a diferenciação dos embriões somáticos, induzindo a transição do embrião somático da fase de proliferação celular para a maturação (Stasolla *et al.*, 2002; 2003; Langhansova *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2011). Esta transição está associada não somente com a alteração no perfil de crescimento e divisão celular, mas também com a indução da síntese de proteínas de reserva e LEA “Late Embryogenesis Abundant”, bem como carboidratos de reserva na maturação (Rai *et al.*, 2011). Neste contexto, acredita-se que a inibição da divisão celular pode modular os níveis endógenos de carboidratos e hormônios, como as PAs.

Destaca-se a importância de estudar como a transição da fase de proliferação para a maturação, pela inibição da divisão celular, afeta o desenvolvimento da embriogênese somática em *A. angustifolia*, em especial a sua influência no crescimento, morfologia e no metabolismo endógeno de NO, PAs e carboidratos. Desta forma será possível contribuir para a elucidação do papel destes compostos na embriogênese somática e como eles variam ao longo de ciclo de crescimento desta espécie

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Espécie

A. angustifolia constitui o dossel superior da Floresta Ombrófila Mista e apresenta um caráter dominante na vegetação (Longhi, 1980; Leite e Klein, 1990). O gênero *Araucaria* só ocorre no hemisfério Sul, com duas das 14 espécies na América Sul (Whitmore, 1975), a *A. araucana* (Molina) K. Koch localizada em zonas restritas do Chile e Argentina, e a *A. angustifolia* com uma área de dispersão maior no Brasil e restrita na Argentina (Ntima, 1968), sendo esta última de maior importância no mercado mundial (Nutto, 2001). Segundo Carvalho (1994), sua área de distribuição ocupava originalmente uma superfície de cerca de 200.000 km², ocorrendo nos estados do Paraná (40% da superfície), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%) e em manchas esparsas no sul de São Paulo (3%), até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (1%).

Araucária é caracterizada por árvores altas, com 20 a 50 m de altura, 1 a 2 m de diâmetro, tronco cilíndrico, reto, raramente ramificado, casca grossa (15 cm) e resinosa. É uma planta dióica, sendo assim, apresenta os gêneros masculino e feminino em indivíduos separados. As flores masculinas formam um “charuto” e liberam o pólen ao vento que o transporta aos milhões até as flores femininas situadas em outras árvores (Basso, 2010). As flores femininas têm formato de “cone” arredondado denominado pinha, protegidas por cerca de mil brácteas escamiformes inseridas num eixo central. Na base das brácteas férteis apenas um óvulo se forma e essas vão envolvendo o pinhão que se desenvolve. As pinhas possuem em média 10 a 150 pinhões, semente cujo centro encontra-se o embrião com cotilédones retos (Basso, 2010).

As características de *A. angustifolia* não são propícias para a espécie se disseminar ou ampliar seus habitats. As sementes são grandes e conseqüentemente, não são facilmente espalhadas. Servem a uma cadeia alimentar grande de animais mamíferos e a gralha azul é a principal dispersora das sementes (Nutto, 2001).

A idade das árvores é um importante fator que define o período e a intensidade do florescimento e da frutificação. De acordo com Carvalho (1994),

a produção de sementes em árvores isoladas de araucária começa entre os 10 e 15 anos de idade, já nos plantios, a reprodução se inicia aos 20 anos de idade, destacando grandes diferenças de espessura e altura de acordo com o habitat.

A madeira de árvores adultas possui boas características físicas e mecânicas, indicada para fabricação de móveis e para os outros tipos de utilização de madeira. Além disso, sua aplicação estende-se ao importante campo da fabricação de papel (Guerra *et al.*, 2000; Basso, 2010). Por possuir um alto valor econômico, madeireiro, resinífero e alimentar, tem havido uma progressiva extração das populações naturais ao longo dos anos, e a espécie foi incluída na “Lista de espécies que necessitam atenção” elaborada pela “Food and Agriculture Organization” (FAO, 1986) e na “Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção”, como uma espécie vulnerável (Brasil, 1992). De acordo com a “Red List” 2012 organizada pela IUCN “International Union for Conservation of Nature”, ela se encontra criticamente em perigo na listagem de espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2012).

Outro fator que vem contribuindo para a vulnerabilidade da espécie é o fato das sementes terem curta longevidade natural, com perda total de viabilidade em até um ano após a coleta (Aquila e Ferreira, 1984). Atualmente, a espécie é encontrada em áreas reduzidas, tanto em sua formação primária como em florestas secundárias, provenientes da regeneração natural. Estimativas apontam nos três Estados do Sul a existência de 1 a 2% das áreas originais cobertas pela floresta com araucária (Koch e Corrêa, 2002). Devido à ameaça de extinção, o volume de exportação de araucária foi contingenciado (Brasil, 1996).

2.2 Embriogênese Zigótica

A fase mais crítica no ciclo reprodutivo da araucária é a fase de produção de sementes, incluindo a fase da polinização, que se inicia em setembro, estendendo-se até dezembro. A polinização é predominantemente anemocórica (pelo vento) e ocorre entre os meses de setembro e outubro enquanto a maturação pode ser de até quatro anos após a fecundação (Solórzano-Filho, 2001). A época do amadurecimento acontece, em geral, durante os meses de abril a junho (Reitz *et al.*, 1988). Conforme Carvalho

(1994), após iniciar a sua produção de sementes, a espécie *A. angustifolia* produz em média 40 pinhas por ano, cujo ciclo pode atingir mais de 200 anos.

Estudos relatam ser de aproximadamente 4 anos o tempo de formação de uma pinha desde a diferenciação celular. O desenvolvimento do cone feminino inicia-se na primavera, entre os meses de agosto a outubro, estando prontos para a polinização no mês de setembro do ano seguinte. A fertilização ocorre somente a partir do terceiro ano, entre outubro e dezembro e os cones iniciam a maturação no quarto ano (Guerra *et al.*, 2000).

A embriogênese zigótica é uma etapa importante no processo de desenvolvimento, e nas coníferas pode ser dividida em duas fases: (1) fase pró-embriônica: esta fase vai desde a fertilização até o rompimento da arquegônia pelo pró-embrião e (2) fase embriônica: a partir do rompimento da arquegônia até a maturação do embrião (Haines e Prakash, 1980).

Na fase pró-embriônica (Figura 1), a embriogênese zigótica em *A. angustifolia*, assim como a de outras coníferas, é caracterizada pela presença de núcleos livres, quando ocorrem sucessivas divisões nucleares sem a biossíntese de parede celular (Cairney e Pullman, 2007), resultando na formação do pró-embrião primário (Fernandez, 2002). Sua polaridade ocorre pela organização destes núcleos, que constituem três tipos celulares bem definidos: as células do suspensor, da capa e do grupo embriônico (Figura 1) (Guerra *et al.*, 2008).

Em espécies de coníferas ocorre um fenômeno comum, denominado poliembrião, que é definido pela presença de mais de um embrião nos estádios iniciais do desenvolvimento da semente, sendo eliminados por morte celular programada ao longo do desenvolvimento (Gifford e Foster, 1989), e por isso usualmente é chamado de poliembriogênese zigótica.

Nos estádios iniciais de desenvolvimento do embrião, o suspensor representa a principal via de transporte de nutrientes para o pró-embrião (Astarita, 2000; Balbuena, 2009). Análises histológicas de embriões maduros mostram a presença de vacúolos armazenadores de proteínas, mitocôndrias diferenciadas e ativas no citoplasma embriônico, além da presença de grande quantidade de água livre, características de sementes recalcitrantes (Espindola *et al.*, 1994; Panza *et al.*, 2002). Dentre estas características, os embriões de *A. angustifolia* apresentam alterações estruturais e tornam-se inviáveis quando

o teor hídrico atinge valores inferiores a 70 % (Tompsett, 1984; Farrant *et al.*, 1989).

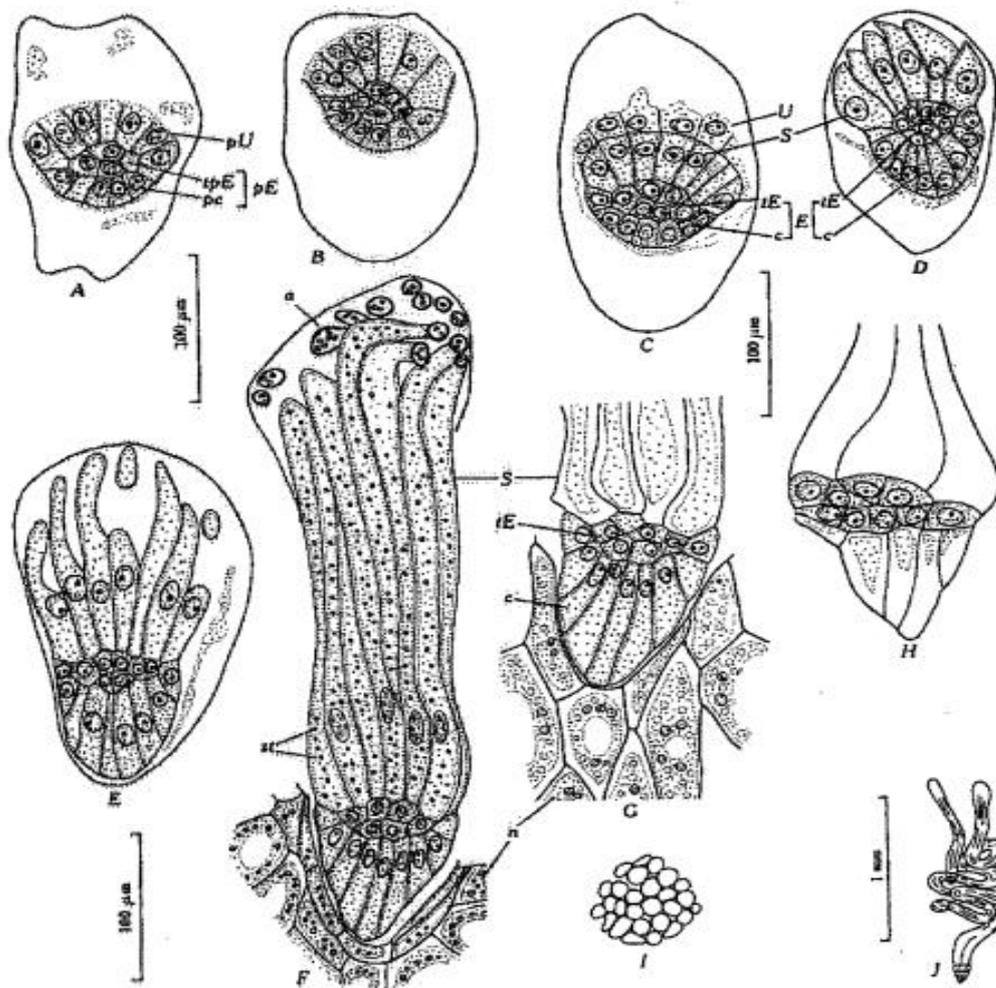


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento do embrião zigótico de *A. angustifolia*. Fase pró-embriônica. (A,B) pE- camada embriônica primária, pU- camada superior primária, pC- capa primária, tpE- grupo embriônico verdadeiro; (C-G) tE- grupo embriônico, S- suspensor primário, C- capa, n- células polinucleadas do megagametófito, (H) capa, (I) células embriônicas, (J) PEMs – Massa pró embriônica. Fonte: Adaptado de Haines e Prakash (1980) e Fernandez (2002).

2.3 Embriogênese Somática

Estudos visando o aprimoramento de técnicas de propagação são importantes para a manutenção da espécie e dos recursos naturais. Neste contexto, técnicas biotecnológicas, utilizando sistemas de embriogênese

somática, têm sido utilizadas visando diferentes objetivos, que vão desde a obtenção de um modelo de referência para estudos básicos em fisiologia, bioquímica e biologia celular e molecular, até a propagação clonal, incluindo a conservação em várias espécies (Park *et al.*, 1998; Guerra *et al.*, 2000).

A embriogênese somática permite a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos), um alto grau de automatização que reduz os custos por unidade produzida. Os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e pureza genética. Além disso, a embriogênese somática pode ser utilizada como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento genético florestal, em especial, quando associada à técnica de criopreservação. Estes fatores fazem com que esta técnica seja considerada mais vantajosa quando comparadas às demais técnicas de micropropagação (Merkle e Dean, 2000). Adicionalmente, no sistema de embriogênese somática, as mudas podem ser produzidas em qualquer período do ano e não apenas no período de produção das matrizes, como é realizado nos métodos convencionais. Genótipos selecionados e/ou melhorados poderiam ser recuperados pelo método da embriogênese somática produzindo em escala massal clones de interesse. Entretanto, a utilização destes embriões é limitada pelo baixo índice de conversão destes embriões em plântulas (Guerra *et al.*, 2000).

A embriogênese somática é um processo pelo qual células somáticas se diferenciam em embriões somáticos (Tautorus *et al.*, 1991), passando por estádios de desenvolvimento morfológicamente semelhantes aos de embriões zigóticos, que são derivados da fusão de células gaméticas (Termignoni *et al.*, 2005). Neste sentido, denomina-se embrião somático aquele derivado de células somáticas adultas, já diferenciadas (Termignoni *et al.*, 2005).

A indução da embriogênese somática depende da utilização do explante apropriado, meios de cultura e condições ambientais adequadas (George *et al.*, 2008). O processo de embriogênese somática pode ser dividido em quatro fases: a) indução em meios de cultura contendo reguladores de crescimento como auxinas (mais frequente) e citocininas (menos frequente); b) multiplicação em meios contendo baixas concentrações de auxinas; c) maturação na ausência de reguladores de crescimento e/ou em presença de

ácido abscísico (ABA) e agentes osmóticos; e d) germinação em meios de cultura isentos de reguladores de crescimento, com conversão dos embriões somáticos em plantas (Tautorus *et al.*, 1991; Guerra *et al.*, 2000).

Os primeiros estudos da embriogênese somática em *A. angustifolia* foram relatados por Astarita e Guerra (1998). As condições básicas para o estabelecimento, manutenção e multiplicação de culturas celulares, bem como alguns fatores associados ao metabolismo destas culturas foram estudados (Guerra *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2002; 2006; Steiner *et al.*, 2007; 2008; Osti *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012).

As condições básicas e os fatores que afetam a indução, manutenção e multiplicação de culturas celulares de *A. angustifolia* já foram estabelecidas em vários estudos (Dos Santos *et al.*, 2002; Guerra *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2002; Steiner, 2005; 2007). Foi demonstrado que a indução da cultura embriogênica nesta espécie é dependente do estágio de desenvolvimento do explante e o genótipo da árvore-mãe, enquanto a composição do meio basal e a presença ou ausência de reguladores de crescimento não influenciou a frequência de indução nem a simetria bipolar dos pró-embriões formados (Santos *et al.*, 2002). A estratégia empregada no estabelecimento da embriogênese somática nesta espécie consiste em: um ciclo de indução/multiplicação de culturas celulares, originadas a partir do embrião zigótico imaturo pela utilização de auxinas e citocininas; e um ciclo de maturação, promovido por alterações no balanço de reguladores de crescimento e fontes de carbono adicionado ao meio de cultura (Figura 2). Os resultados destas etapas levam à formação de embriões somáticos (Steiner, 2005; 2008; Guerra *et al.*, 2008). Adicionalmente, sabe-se que as rotas morfogenéticas na multiplicação e maturação podem ser influenciadas pela adição de ABA, agentes osmóticos, carvão ativado, PAs, glutathiona e NO aos meios de cultura (Astarita, 2000; Silveira *et al.*, 2002; 2006; Steiner, 2005; 2007; Osti *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012). Entretanto, os eventos tardios da embriogênese somática, como a conversão de células em embriões somáticos, nesta espécie, ainda não estão suficientemente elucidados, e a conversão de embriões somáticos em plantas completas ainda é uma etapa crucial neste processo.

O emprego da embriogênese somática pode ter uma série de objetivos que vão desde a obtenção de um modelo de referência para estudos básicos em fisiologia e bioquímica, até o uso visando a propagação em larga escala e a transformação genética (Von Arnold *et al.* 2002). Como modelo para estudo de um processo morfogênético, a embriogênese somática é ideal para investigar o processo de diferenciação em plantas, bem como a expressão de mecanismos de totipotencialidade da célula vegetal (Andrade, 2010). Neste sentido, estudos com reguladores de crescimento vegetal, como PAs, ABA, e outros compostos sinalizadores, como NO e carboidratos, são fundamentais para entender o papel destes compostos no processo morfogênético durante a embriogênese somática, e sua atuação no ciclo de divisão celular durante estes eventos.

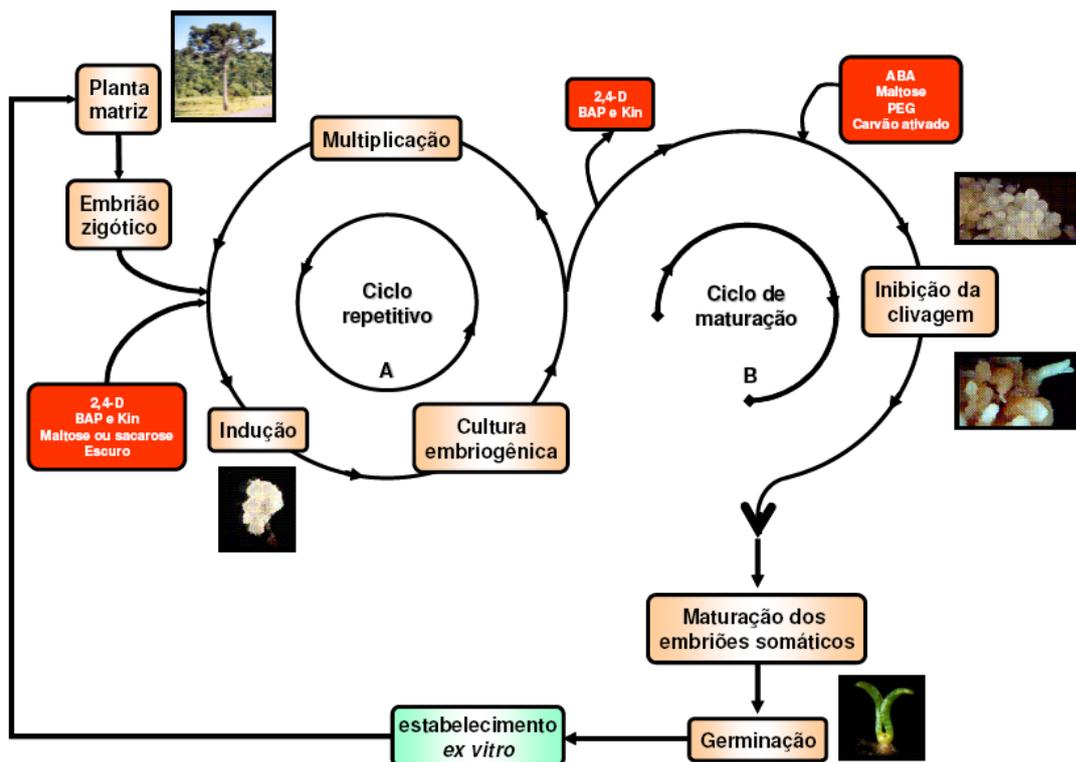


Figura 2. Representação esquemática dos ciclos de multiplicação e maturação que compõem o processo de embriogênese somática em *A. angustifolia*. 2,4 D: 2,4 diclorofenoxiacético; BAP: benzilaminopurina; Kin: cinetina; ABA: ácido abscísico; PEG: polietileno glicol. Fonte: Balbuena (2009).

2.4 Ciclo de divisão celular

A capacidade do controle preciso de quando as células se dividem, obviamente, tem impacto profundo sobre o desenvolvimento de todos os organismos. Nas plantas, em função do seu estilo de vida sésstil, a regulação da divisão celular deve ser coordenada com o desenvolvimento, para que, desta forma as plantas possam responder a um ambiente variável (Inze e De Veylder, 2006).

O ciclo de divisão celular, conhecido como ciclo celular, é o mecanismo essencial para a manutenção da vida de todos os seres vivos. Embora a divisão celular vegetal compartilhe mecanismos básicos com todos os eucariotos, as células vegetais têm uma capacidade de desdiferenciação e pluripotência, um recurso que permite uma plasticidade maior ainda no seu desenvolvimento (Inze e De Veylder, 2006). A divisão celular compreende quatro fases sequenciais ordenadas temporalmente que resulta na formação de duas células filhas. Na primeira fase, denominada G1, a célula percebe sinais relevantes que iniciam os processos de divisão celular. Posteriormente, a célula passa para a fase S, ocorrendo entre outros eventos a replicação do DNA, e em seguida, entra na fase G2 que separa a fase S da fase M subsequente. As células em G2 são, portanto, diferentes das células G1 por possuir um conteúdo de DNA e volume celular duplicado. Durante a progressão do ciclo celular existem pontos de checagem que são fundamentais, pois permitem o funcionamento dos controles que garantem que a fase anterior tenha sido completada de forma precisa antes de iniciar a próxima fase (Vantard *et al.*, 2000; Dewitte e Murray, 2003). Na maioria das células eucarióticas, o sistema controle do ciclo celular ativa a progressão do ciclo em três principais pontos de verificação. O primeiro ponto é o início (ou ponto de restrição) no final da fase G1, no qual a célula se compromete à entrada no ciclo celular e à duplicação dos cromossomos. O segundo é o ponto de verificação G2/M, quando o sistema de controle desencadeia os eventos mitóticos iniciais que levam ao alinhamento dos cromossomos no fuso metafásico. O terceiro é a transição entre metáfase e anáfase, quando o sistema de controle verifica a separação das cromátides-irmãs, levando conclusão da mitose e da citocinese (Alberts *et al.*, 2010).

Este sistema controle responde a vários sinais intracelulares e extracelulares e interrompe o ciclo quando a célula falha em completar um processo essencial do ciclo celular ou encontra condições ambientais ou intracelulares desfavoráveis (Alberts *et al.*, 2010). As células eucarióticas desenvolveram uma complexa rede de proteínas reguladoras que governa sua progressão. O ciclo celular eucariótico é regulado em múltiplos pontos e a maioria deles, senão todos se estabelecem devido a ativação de uma classe especial de proteínas quinases. Estas proteínas são funcionais a partir da ligação com uma proteína reguladora conhecida como ciclina e são, portanto, chamadas quinases dependentes de ciclina (CDKs) (Dewitte e Murray, 2003).

Alterações nas atividades de vários complexos de ciclina-CDKs controlam vários eventos do ciclo celular. Os mecanismos que controlam as atividades dos complexos de ciclina-CDK incluem a fosforilação das subunidades das CDKs, a ligação de proteínas inibidoras de CDK (CKIs), a proteólise de ciclinas e mudanças na transcrição de genes que codificam reguladores das CDKs (Inze e De Veylder, 2006). Nas células vegetais, algumas proteínas reguladoras tais como ciclinas e inibidores de CDKs, são particularmente mais numerosos (Inze e De Veylder, 2006), e a atividade destas quinases em diferentes espécies podem ter diferenças de ativação entre as fases do ciclo celular (Dewitte e Murray, 2003).

Em leveduras, e em algumas algas, o corpo do fuso é uma organela cilíndrica de multi-componentes, contendo microtúbulos e proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs), inseridas no envelope nuclear durante a divisão celular, e atuam como um centro organizador de microtúbulos (Jaspersen e Winey, 2004). Este ponto de verificação, também conhecido como o ponto de verificação de montagem do fuso, impede avanço do ciclo celular da metáfase para anáfase, antes da fixação de cada cromossomo aos microtúbulos do fuso (Lan e Cleveland, 2010). Alguns autores ressaltam que a segregação cromossômica precisa durante a meiose é essencial para a divisão celular normal, e a formação de um fuso bipolar é necessária tanto para células de animais quanto para células de plantas (Dawe, 1998; Compton, 2000; Chen *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudos posteriores demonstraram que os genes necessários para a meiose também desempenham um papel na formação do fuso mitótico (Marcus *et al.*, 2003; Ambrose *et al.*, 2005).

Na ausência de um ponto de verificação mitótico funcional, as células podem sofrer aneuploidia e posteriormente morrem. Isso ocorre, por exemplo, quando a função de uma proteína chamada Mps1 (Fuso Monopolar) é perdida (Lan e Cleveland, 2010). A proteína Mps1 é uma quinase descrita em humanos, caracterizada como um regulador conservado evolutivamente em eucariotos (Liu e Winey, 2012). Ela consiste de uma região N-terminal não catalítica e um domínio C-terminal catalítico, o qual expõe homologia fraca com outras quinases humanas, porém é altamente conservada entre ortólogos eucarióticos (Fisk *et al.*, 2004). Recentemente, De Oliveira *et al.* (2012) verificou em plantas uma proteína altamente semelhante a Mps1 humana. Os autores identificaram que características estruturais, como o sítio catalítico, observado na proteína Mps1 humana é claramente conservada na proteína Mps1 encontrada em *Arabidopsis thaliana*.

Neste sentido, a manipulação do funcionamento do ciclo celular pode ser uma importante ferramenta para estudos relacionados a diversos aspectos que ocorrem ao longo do desenvolvimento vegetal. Atualmente, diversos compostos, ou agentes químicos, atuam como inibidores do ciclo celular e são utilizados para sincronizar células vegetais em estudos associados à progressão do ciclo celular em plantas. Os agentes químicos atuam bloqueando o ciclo celular, agindo sobre vários aspectos, como a condução de forças motoras do ciclo celular (atividade de CDKs), enzimas envolvidas na síntese de DNA ou proteólise de reguladores do ciclo celular, ou ainda sobre a maquinaria do ciclo celular como o fuso mitótico. Estes inibidores podem ser usados para estudar a expressão de funções ciclo-reguladas das células (Planchais *et al.*, 2000). A concentração ótima de um inibidor, a duração do tratamento e o tempo necessário para voltar a entrar no ciclo celular têm de ser estabelecido para cada espécie vegetal, pois a concentração ideal de cada substância pode variar de acordo com a espécie ou tipo celular, além disso, níveis elevados destes compostos podem ser tóxicos, causando danos irreversíveis para os sistemas utilizados (Biranova *et al.*, 1998; Planchais *et al.*, 2000).

Vários são os agentes químicos utilizados para inibição do ciclo de divisão celular. Destaca-se a roscovitina, utilizada para bloquear o ciclo celular na fase G1 em suspensões celulares de *A. thaliana* e os compostos roscovitina

e bohemina, usados em células da ponta da raiz de *Vicia faba*, e mostraram perturbar a formação do fuso quando aplicados nas células em metáfase (Biranova *et al.*, 1998). Os inibidores também podem atuar bloqueando a síntese de DNA como é o caso da hidroxiuréia, mimosina e afidicolina. Hidroxiuréia por exemplo inibe a atividade da ribonucleotídeo difosfato redutase, privando as células recém-sintetizadas de desoxiribonucleotídeo trifosfatos, conseqüentemente, evitando a replicação do DNA (Young e Hodas, 1964; Mironov *et al.*, 1999; Planchais *et al.*, 2000).

Dentre os inibidores químicos, o SP600125 (Figura 3) é um inibidor de proteínas quinase. Ele atua no sítio de ligação com ATP e foi originalmente descrito como um inibidor das proteínas quinases JNK1, JNK2, e JNK3 em animais (Bennet *et al.*, 2001). Este inibidor também tem sido valioso para validar as funções celulares de Mps1, com o qual as isoformas JNK compartilham algumas características conservadas no local de ligação com o ATP (Jelluma *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2005). Foi demonstrado que na proteína Mps1 humana, a qual apresenta uma conformação típica de proteína quinase, o SP600125 atua como um inibidor ATP competitivo, ficando alojado no sítio de ligação do ATP onde é estabilizado por interações hidrofóbicas, verificando-se que a inibição da Mps1 no domínio catalítico purificado era de 90% na presença deste inibidor (Chu *et al.*, 2008). Adicionalmente alguns resultados indicam que SP600125 bloqueia a transição G2-M em *Arabidopsis* por inibir especificamente a atividade da AtMps1 (De Oliveira *et al.*, 2012).

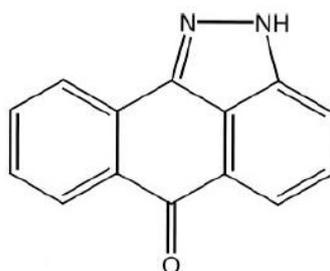


Figura 3. Estrutura do Inibidor SP600125. Fonte: Bennett *et al.* (2001).

Outros compostos também podem atuar no controle do ciclo celular, conforme foi constatado em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Maki *et al.*, 1991). Estudos mostraram que as PAs são requeridas para a progressão normal do ciclo celular, verificando que a inibição da biossíntese de Putrescina (Put) causou a inibição da proliferação celular pela prevenção da progressão do ciclo celular, destacando-se a importância dos estudos destes compostos na divisão celular. Acredita-se que a Put pode atuar no controle da progressão do ciclo na fase G1 para a fase S, embora haja ainda a possibilidade de que ela atue também entre as fases G2 e M (Maki *et al.*, 1991).

Na embriogênese somática, um balanço entre promoção e inibição do crescimento celular regula a morfogênese. Tratamentos de maturação com PAs, e agentes promotores de maturação, como ABA, PEG e maltose, promovem a inibição do crescimento celular, impedindo a divisão celular e promovendo a diferenciação das culturas celulares (Attree e Fowke, 1993, Silveira *et al.*, 2006; Santa-Catarina *et al.*, 2007; Steiner *et al.*, 2008; Andrade, 2010; Vieira *et al.*, 2012). Por outro lado, compostos como auxinas, NO e Put, promovem a divisão celular, aumentando o crescimento e inibindo a diferenciação para embriões somáticos maduros (Silveira *et al.*, 2006; Santa-Catarina *et al.*, 2007; Osti *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem que o controle do ciclo celular é fundamental para a resposta morfogenética, e vários compostos estão associados ao processo de promoção ou inibição deste ciclo celular em plantas, incluindo as PAs e NO.

2.5 Poliaminas

As PAs são moléculas alifáticas de baixo peso molecular presente em todos os organismos vivos. As principais PAs encontradas em plantas superiores são putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm), ocorrendo na forma livre ou conjugada com ácidos fenólicos e moléculas de baixo peso molecular (Bouchereau *et al.*, 1999, Kuznetsov *et al.*, 2006; Baron e Stassola, 2008). Nas plantas, além do citosol elas podem ser encontradas em organelas como mitocôndrias, cloroplastos e vacúolos (Kumar *et al.*, 1997).

Elas atuam em vários processos nas plantas, como a divisão celular, formação de raízes, iniciação e desenvolvimento floral, desenvolvimento dos frutos, metabolismo secundário, senescência, respostas aos estresses

abióticos e bióticos (Bais e Ravishankar, 2002; Baron e Stassola, 2008; Alcazar *et al.*, 2010), e na embriogênese zigótica e somática (Minocha *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2006; Santa-Catarina *et al.*, 2007).

Nas plantas, a primeira etapa para a síntese das PAs é a ação das enzimas arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC) que convertem, respectivamente, arginina e ornitina à Put. Spd e Spm são formadas a partir de Put pela adição de grupos aminopropil derivados da metionina (Kuznetsov *et al.*, 2006). Neste processo, metionina é convertida a S-adenosilmetionina (SAM), sendo então, transferidos grupos aminopropil, pela S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC) para Put para a formação de Spd, pela ação da Spd sintase, e subsequentemente para Spm, pela ação da Spm sintase para a formação de Spm. A metionina também é precursora para a biossíntese de etileno, a qual a SAM é metabolizada, formando o ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC), que é convertido a etileno (Kuznetsov *et al.*, 2006) (Figura 4).

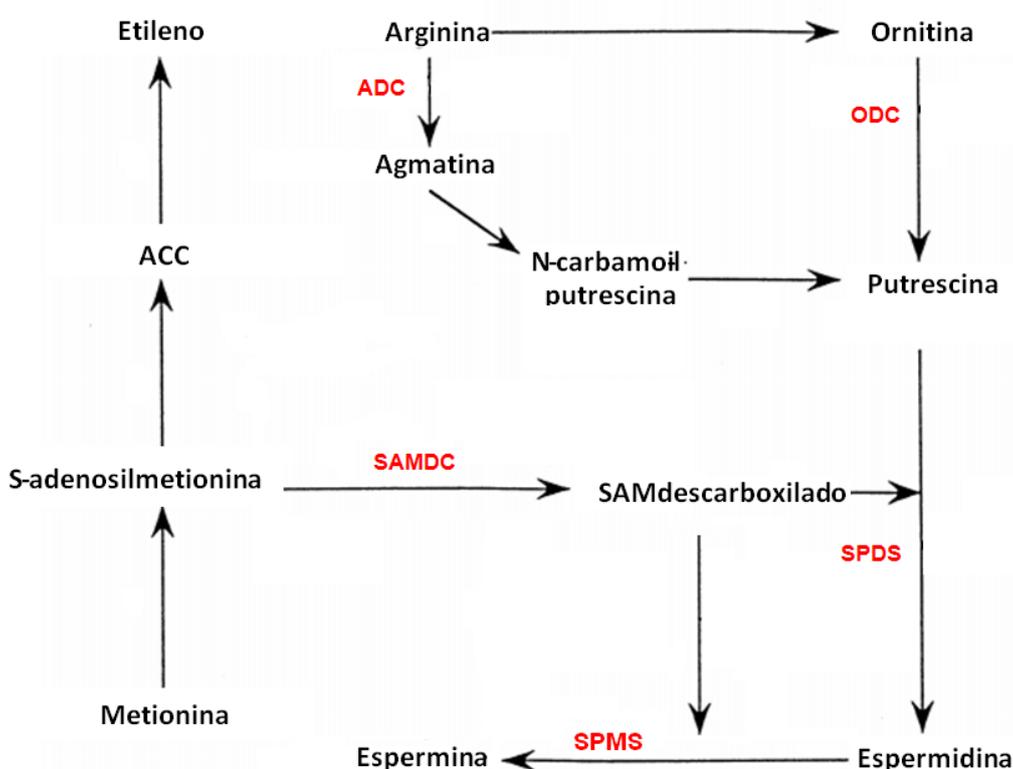


Figura 4. Rota de síntese de PAs e enzimas. ADC: arginina descarboxilase; ODC: ornitina descarboxilase; SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilase; SPMS: Spm sintase; SPDS: Spd sintase. Fonte: Adaptado de Bouchereau *et al.* (1999).

Trabalhos recentes têm mostrado que as PAs podem ser usadas como biomarcadores durante a embriogênese zigótica e somática (Minocha *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2006, Santa-Catarina *et al.*, 2007). Na embriogênese somática de *Picea rubens*, foi relatado que a PA predominante no tecido pró-embriogênico é a Put, enquanto a Spm predomina durante o desenvolvimento do embrião (Minocha *et al.*, 2004). Em outras espécies, como *Ocotea catharinensis* (Santa-Catarina *et al.*, 2007) e *A. angustifolia* (Silveira *et al.*, 2006) as razões de PAs livres mostraram variações durante os diferentes estádios de desenvolvimento do embrião somático, atuando sobre a embriogênese.

Silveira *et al.* (2006) concluíram que as PAs, Spd e Spm agem de uma forma distinta sobre o crescimento, a evolução morfológica e biossíntese de NO em culturas celulares de *A. angustifolia*. Foi verificado que Spd e Spm acrescentadas ao meio de cultura de células embrionárias, reduzem o crescimento e permitem uma evolução morfogenética (Silveira *et al.*, 2006). As PAs possuem um precursor comum ao NO, o aminoácido arginina. A relação entre os dois grupos de substâncias foi demonstrada pela primeira vez em *Arabidopsis* (Tun *et al.*, 2006) e em seguida, em outros sistemas vegetais (Silveira *et al.*, 2006; Santa-Catarina *et al.*, 2007). Entretanto, ainda não está completamente elucidado como e quais as vias que as PAs modulam a síntese de NO durante a morfogênese.

2.6 Óxido Nítrico (NO)

O NO é uma molécula gasosa altamente difusível, que desempenha um papel fundamental como um mensageiro intra e inter-celular para indução de vários processos em plantas, incluindo germinação, morte celular programada, regulação da abertura de estômatos, floração, fotossíntese, defesa de patógeno (Yamasaki, 2005; Neill *et al.*, 2008) e embriogênese somática (Otvos *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2006; Osti *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012).

Em plantas foram descritas quatro vias de produção de NO: uma não-enzimática e três enzimáticas (Figura 5). Nas vias enzimáticas ocorre a participação de uma enzima com atividade semelhante a óxido nítrico sintase (NOS) em animais, produzindo NO a partir do aminoácido arginina, e a enzima nitrato redutase (NR) produzindo NO a partir do nitrito (Neil *et al.*, 2003). A NR

é a via enzimática mais bem descrita até o momento para a síntese de NO (Planchet e Kaiser, 2006; Crawford, 2006; Narita, 2010). A rota de síntese via enzima nitrato:óxido nítrico redutase (Ni:NOR) em membrana plasmática de células de raiz também já foi descrita (Stohr *et al.*, 2001). Adicionalmente, a síntese de NO via PAs foi descrita, porém o mecanismo enzimático ainda não é conhecido (Tun *et al.*, 2006), e a produção de NO também pode ocorrer via hidroxilamina como substrato primário (Rumer *et al.*, 2009). Pesquisas recentes indicam que as rotas biossintéticas de NO podem ser classificadas como oxidativas ou redutivas. As rotas via NR e Ni:NOR são reações redutivas, dependentes do nitrito como substrato primário, enquanto a produção de NO via NOS, PAs ou hidroxilamina são rotas oxidativas (Gupta *et al.*, 2011).

A via não-enzimática para a biossíntese de NO ocorre sob condições específicas em compartimentos acidificados com pH entre 4.5 e 3.2, como é o caso do apoplasto, local onde ocorre a redução química do nitrito a NO (Bethke *et al.*, 2004; Planchet e Kaiser, 2006).

A existência de uma enzima similar a NOS em animais ainda não está bem elucidada. Após a descoberta de uma rota de síntese de NO em plantas, em 1998 (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998), muitos pesquisadores iniciaram as buscas pela identificação da NOS em plantas. Entretanto, após o sequenciamento do genoma de *Arabidopsis* não foi possível identificar genes com homologia significativa a NOS em animal (Gupta *et al.*, 2011). Desde então, vários candidatos à enzima com atividade similar a NOS em plantas foram analisados, mas seu funcionamento putativo nunca foi confirmado (Zemojtel *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2010). Muitos estudos revelam a existência de uma rota bioquímica dependente de arginina pela ação de uma enzima similar a NOS, cujas evidências estão baseadas em estudos entre a produção de NO e a suplementação de arginina ou análogos, bem como pelo uso de inibidores da NOS em animais que resultam na redução do conteúdo de NO (Gupta *et al.*, 2011).

Adicionalmente, foi proposta uma rota alternativa para a produção de NO via PAs em plantas (Figura 5) (Tun *et al.*, 2006). Embora ainda não se conheça o mecanismo bioquímico (Yamasaki e Cohen, 2006), trabalhos iniciais mostram que as PAs atuam na modulação do conteúdo endógeno de NO em

diferentes sistemas vegetais, como em plântulas de *Arabidopsis* (Tun *et al.*, 2006), e durante o processo de embriogênese somática em *A. angustifolia* (Silveira *et al.*, 2006; Osti *et al.*, 2010) e *Ocotea catharinensis* (Santa-Catarina *et al.*, 2007). Entretanto, estudos necessitam ser realizados para entender como a interação entre as PAs e o NO podem modular o processo de embriogênese somática em plantas.

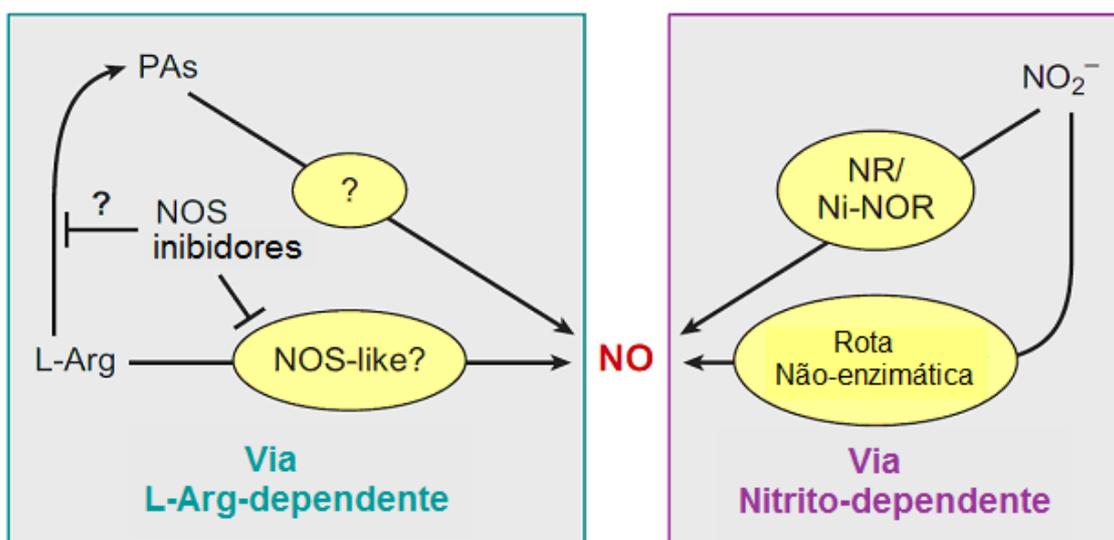


Figura 5. Vias de síntese de NO dependente de L-arginina e dependente do nitrito descritas em plantas NR: enzima nitrato redutase; Ni-NOR: enzima nitrito-NO redutase; NOS-like: NO sintase similar à observada em animais, ainda não caracterizada completamente em plantas. PAs = poliaminas como precursor de NO por via ainda não elucidada. Fonte: Adaptado de Besson-Bard *et al.* (2008).

Estudos mostram que o NO, em conjunto com a auxina, desempenha um importante controle do ciclo celular durante a formação de células embriogênicas a partir de protoplastos de alfafa (*Medicago sativa*) (Otvos *et al.*, 2005). Silveira *et al.* (2006) demonstraram a correlação entre PAs e NO na embriogênese somática em *A. angustifolia*. Foi mostrado que a adição de Put ao meio de cultura aumentou a liberação de NO da cultura embriogênica enquanto a Spd e Spm teve um efeito inibidor. Estes resultados sugerem a redução na biossíntese de NO quando tratadas com Spd e Spm estão correlacionadas com a diferenciação morfológicas das massas pró-embriogênicas (PEMs), enquanto Put está associada a multiplicação, talvez

por aumentar o conteúdo de NO endógeno em culturas celulares de *A. angustifolia* (Steiner *et al.*, 2008). De acordo com resultados obtidos por Andrade (2010), a redução na síntese endógena de NO, obtida através de agentes promotores de maturação, induziram a maturação em culturas celulares de *A. angustifolia*. Estes resultados corroboram com os observados por Osti *et al.* (2010) os quais mostraram que a adição de NO em culturas celulares aumenta o crescimento celular e inibe a organização e evolução morfogênica das culturas celulares de *A. angustifolia*. Estes resultados sugerem que uma redução nos níveis de NO é essencial para a maturação das culturas celulares, enquanto aumento deste composto está associado a manutenção e multiplicação destas.

2.7 Carboidratos

Os carboidratos são moléculas formadas por carbono, hidrogênio e oxigênio, e desempenham múltiplas funções nas células, incluindo transporte, fornecimento de energia e de esqueletos carbônicos além da regulação do potencial osmótico e da expressão gênica (Lehninger e Cox, 2011). São componentes importantes, que adicionados ao meio de cultura proporcionam uma fonte de energia ao explante, e são fundamentais para indução de vários processos morfogênicos *in vitro*, como a embriogênese somática e cultivo dos embriões (Castro *et al.*, 2010), e atuam também como sinalizadores do processo morfogênico (Lou *et al.*, 1996). Estudos recentes usando mutantes de milho (*Zea mays*) e Arabidopsis também sugerem que os açúcares podem atuar como moléculas de sinalização que controlam aspectos distintos no desenvolvimento das plantas (Eveland e Jackson, 2012).

Nas plantas, o CO₂ atmosférico assimilado é combinado enzimaticamente com a água para produzir intermediários que serão reduzidos a carboidratos por reações específicas nos cloroplastos e no citoplasma (Taiz e Zeiger, 2009; Lehninger e Cox, 2011). Após assimilação de CO₂, o carbono é convertido em trioses fosfato que servirão como precursores para a biossíntese de frutose, glicose, ribose e xilose. As trioses-fosfato sintetizadas podem ser exportadas do cloroplasto para então, no citoplasma serem convertidas em sacarose a partir da ligação entre frutose e glicose (Lehninger e Cox, 2011; Taiz e Zeiger, 2009). A síntese de sacarose é modulada através de alterações no estado de

ativação da sacarose-fosfato sintase (SPS) (Geigenberger e Stitt, 2004). Parte da glicose presente no citoplasma pode ainda dar origem a outros carboidratos, como por exemplo, ribose, manose e arabinose (Voet *et al.*, 2000).

O metabolismo dos carboidratos representa um dos mais importantes processos no ciclo celular (Carrier *et al.*, 1999) e o acúmulo adequado de reservas como carboidratos solúveis, amido e proteínas afeta de forma especial a embriogênese somática, sendo crucial para a retomada do desenvolvimento após a obtenção de embriões cotiledonares (Attree *et al.*, 1992; Flinn *et al.*, 1993; Chanprame *et al.*, 1998). De acordo com Baud *et al.* (2002), os carboidratos solúveis são mais importantes nas fases iniciais do processo de formação do embrião, atuando como fonte de energia, esqueletos carbônicos e/ou como sinalizadores.

A variação dos carboidratos solúveis e do amido na embriogênese somática pode fornecer informações importantes sobre a conversão de embriões somáticos em plântulas (Pescador *et al.*, 2008). Em estudos com goiabeira serrana (*Acca sellowiana*), a presença de glicose e frutose foi relevante nas fases iniciais da embriogênese somática correspondentes ao embrião zigótico, diminuindo seus teores nas fases finais desse processo (Mengarda *et al.*, 2009; Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009). Adicionalmente, Pescador e colaboradores (2008), demonstraram, na mesma espécie, uma alta quantidade de sacarose, frutose e outros carboidratos em diferentes estádios do desenvolvimento de embriões somáticos.

Em embriões somáticos de coníferas, os carboidratos desempenham um papel essencial, sendo a glicose relatada como o açúcar preferencial para atender às demandas metabólicas (Treat *et al.*, 1989; Lipavská e Konrádová, 2004). Estudos mostram que a glicose e a sacarose, juntamente com outras moléculas sinalizadoras (como reguladores de crescimento vegetais), atuam como mediadoras dos processos de embriogênese (Gibson, 2003). Acredita-se que a sacarose seja responsável pela ação protetora contra a dessecação, devido à sua capacidade de estabilizar proteínas da membrana plasmática (Crowe e Hoekstra, 1992), e que ela possa afetar a diferenciação celular e o armazenamento de substâncias de reserva (Weber *et al.*, 1997). Os teores endógenos e a disponibilidade desses açúcares podem ser afetados pela adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. Assim, a

combinação e a interação desses fatores *in vitro* podem alterar a regulação dos processos fisiológicos e conseqüentemente o controle da indução e o estabelecimento de culturas celulares embriogênicas a partir de células somáticas (Mengarda *et al.*, 2009).

Outros carboidratos solúveis também foram evidenciados em culturas embriogênicas como o mio-inositol e rafinose em *A. sellowiana* (Mengarda *et al.*, 2009) e maltose e galactose em *Citrus sinensis* (Castro *et al.*, 2010). O mio-inositol é um constituinte importante da membrana plasmática (Moore, 1982) e sua presença em sistemas de cultivo *in vitro* pode inativar auxinas, por meio da formação do complexo auxina-inositol (Cohen e Bandurski, 1982), além de outras funções essenciais no metabolismo celular. A rafinose é um açúcar solúvel que pode atuar com reserva e, também, interagir com a sacarose, impedindo sua cristalização, fato que levaria o embrião à deterioração (Bruni e Leopold, 1992). A família de oligossacarídeos de rafinose foi identificada como compostos abundantes do espectro de carboidratos de coníferas (Lux *et al.*, 1997; Lipavská *et al.*, 2000). A maltose tem sido eficiente no estímulo à embriogênese somática a partir de calos embriogênicos de *Citrus* e possui papel tanto como fonte de carbono, como também regulador osmótico na indução da maturação (Perez *et al.*, 1998). Em coníferas, a maltose provou ser superior à sacarose para formação de embriões maduros (Lipavská e Konrádová, 2004). Por outro lado, a galactose foi responsável pelas melhores respostas, seguida pela glicose na indução de embriões somáticos de diversas cultivares de *C. sinensis* (Benedito *et al.*, 2000). Outros açúcares, como lactose, celobiose, manitol e sorbitol, também já foram testados em culturas celulares embriogênicas e provaram ser menos eficientes na maioria dos casos (Lipavská e Konrádová, 2004).

Embora estudos mostrem a importância dos carboidratos na embriogênese somática, pouco se conhece sobre o papel destes compostos na inibição da divisão celular durante este processo morfogênético. Estudos neste sentido são fundamentais para entender o papel destes compostos no controle da divisão celular durante a embriogênese somática em *A. angustifolia*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da inibição do ciclo celular sobre as alterações morfológicas e o metabolismo endógeno de Óxido Nítrico, Poliaminas e carboidratos em culturas celulares de *A. angustifolia*.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Analisar o efeito do inibidor do ciclo celular (SP600125) sobre o crescimento celular de culturas celulares de *A. angustifolia*.
- ❖ Avaliar os aspectos morfológicos das Massas Pró-embriogênicas das culturas celulares de *A. angustifolia* tratadas com o inibidor.
- ❖ Analisar o efeito do inibidor do ciclo celular sobre os níveis endógenos de PAs, aminoácidos, carboidratos e NO em culturas celulares de *A. angustifolia*.
- ❖ Avaliar diferenças metabólicas associadas ao metabolismo de carboidrato, PAs e NO em duas linhagens de culturas celulares com diferentes competências para o desenvolvimento de embriões somáticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Para a realização dos experimentos foram utilizadas culturas celulares de *A. angustifolia* induzidas de acordo com a metodologia estabelecida por Steiner (2005) e mantidas no LBCT/CBB/UENF. Estas culturas foram obtidas através de uma colaboração com o Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra e a Profa. Dra. Neusa Steiner do Centro de Ciência Agrárias (CCA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Para o início das culturas, como fonte de explantes foram utilizados embriões zigóticos retirados de sementes imaturas, obtidas a partir de cones femininos imaturos, coletados em Santa Catarina. A partir das induções, foram obtidas duas linhagens, sendo a linhagem BM não embriogênica e a linhagem MSG embriogênica, conforme descrito por Andrade (2010).

4.2 Estabelecimento das suspensões celulares

Foram estabelecidas duas linhagens em suspensão celular obtidas a partir de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, BM e MSG. Para a obtenção das suspensões celulares, as culturas da linhagem BM foram multiplicadas e mantidas em meio líquido BM (Gupta e Pullman, 1981), suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹), caseína hidrolisada (0,5 g.L⁻¹), L-glutamina (1,0 g.L⁻¹), mio-inositol (0,1 g.L⁻¹) e os reguladores de crescimento vegetal ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (2 µM), cinetina (Kin) (0,5 µM) e 6-benzilaminopurina (BAP) (0,5 µM). As culturas da linhagem MSG foram multiplicadas e mantidas em meio de cultura líquido MSG (Becwar *et al.*, 1989), suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹), L-glutamina (1,4 g.L⁻¹) e mio-inositol (0,1 g.L⁻¹).

Para ambas as linhagens, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, por 20 min, 1,5 atm. Os subcultivos foram realizados em intervalos de 15 dias com a transferência de 10 mL de células embriogênicas para o novo meio e mantidas em agitação de 100 rpm, à temperatura de 25 ± 2 °C, no escuro.

4.3 Efeito do inibidor SP600125 sobre o crescimento, morfologia e conteúdo endógeno de PAs, carboidratos e NO

Visando verificar o efeito do inibidor do ciclo celular SP600125 sobre o crescimento, morfologia e conteúdo endógeno de PAs, carboidratos e NO, diferentes concentrações (0, 1 e 10 μM) do inibidor SP600125 foram adicionadas aos respectivos meios de cultura das linhagens BM e MSG. Estas concentrações foram determinadas em ensaios prévios em que foram testadas as concentrações 0, 1, 5, 10 e 20 μM do composto. Para ambas as linhagens, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, por 20 min, 1.5 atm. Foram utilizados frascos erlenmeyer (250) com 60 mL de meio de cultivo. O inibidor foi adicionado aos meios de cultura após a autoclavagem, em câmara de fluxo laminar. Após a transferência das células, os frascos foram mantidos em agitação em mesa giratória Cientec -165 de 100 rpm, à temperatura de 25 ± 2 °C, no escuro por um período de 30 dias.

Foram realizadas análises do crescimento celular, morfologia, e conteúdo endógeno de PAs, NO e carboidratos.

4.4 Crescimento celular

A análise do crescimento celular foi avaliado de três formas: pelo volume celular sedimentado, pelo incremento em massas fresca (MF) e seca (MS), e pela área das células embriogênicas e suspensor das PEMs.

4.4.1 Análise do volume celular sedimentado

O crescimento celular pelo volume celular sedimentado (VCS) foi feita segundo a metodologia descrita por Osti *et al.* (2010). Para tanto, foram utilizados frascos Erlenmeyers (50 mL) adaptados com uma proveta na lateral do frasco, contendo 10 mL de meio de cultura BM ou MSG, suplementado com diferentes concentrações do inibidor SP600125 (0, 1, e 10 μM). Em cada frasco foi inoculado 120 mg de células da linhagem BM ou da linhagem MSG, ao respectivo meio de cultura utilizado (120 mg/10 mL de meio de cultura). Para cada tratamento foram realizadas triplicatas, e o experimento foi repetido duas vezes.

A análise do crescimento foi realizada em intervalos de 3 dias de cultivo, durante 30 dias de incubação, estabelecendo a curva de crescimento para as concentrações citadas.

A partir desta curva de crescimento foram estabelecidas as datas para as coletas de amostras e as concentrações do inibidor para as análises de crescimento, morfologia e bioquímicas. Assim, as coletas foram realizadas antes da inoculação (tempo inicial - 0) e nas fases lag (6 dias), início da exponencial (15 dias), exponencial (21 dias) e estacionária (27 dias).

4.4.2 Análise de MF e MS

Para a análise do crescimento através do incremento em MF e MS das culturas celulares das duas linhagens, 60 mg de células da linhagem BM ou MSG foram inoculadas em 2 mL de meio de cultura suplementados com as concentrações de 0, 1 e 10 μ M do inibidor SP600125. As amostras foram coletadas antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação, pesadas para a obtenção da MF e posteriormente desidratadas em estufa de secagem da Cienlab, modelo CE 220, a 70°C por 48 h. Em seguida, as células foram pesadas novamente para a obtenção da MS. Foram utilizadas cinco repetições para cada período analisado.

4.4.3 Área das células embriogênicas e das células suspensor

Para analisar o crescimento a partir da área das células embriogênicas e suspensor das PEMs, culturas celulares das linhagens BM e MSG foram incubadas nas diferentes concentrações do inibidor SP600125 (0, 1 e 10 μ M). Amostras antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação foram coletadas, preparadas em lâminas e analisadas no microscópio ótico Axio Imager M2 (Zeiss), com o programa Axio Vision 4.8 (Zeiss), e fotografado com o auxílio de uma câmera Axio Cam MR3 (Zeiss) acoplada ao equipamento. As áreas das células embriogênicas (em conjunto) e de células do suspensor foram obtidas com auxílio do Software AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss). Foram preparadas três lâminas para cada tratamento em cada data de análise, obtendo-se no mínimo 10 imagens de PEMs de cada lâmina, totalizando 30 dados para análise do tamanho de células embriogênicas e de células de suspensor.

4.5 Análises morfológicas

O aspecto morfológico das culturas celulares das duas linhagens nos diferentes tratamentos foi monitorado utilizando-se um microscópio Axio Imager M2 (Zeiss), com o programa Axio Vision 4.8 (Zeiss), e fotografado com o auxílio de uma câmera Axio Cam MR3 (Zeiss) acoplada ao equipamento. Amostras antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação, foram coletadas, preparadas em lâminas e analisadas no microscópio. Foram realizadas três lâminas para cada tratamento, obtendo-se no mínimo dez imagens de células em cada lâmina.

4.6 Análises bioquímicas

4.6.1 Quantificação e visualização de NO

A quantificação e visualização do NO nas culturas celulares das duas linhagens foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por Silveira *et al.* (2006). Para a análise, amostras de 1 mL das células antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nos diferentes tratamentos foram incubadas com o marcador intracelular de NO, o DAR - 4M AM (diaminorodamina-4M acetoximetil éster), permeável à membrana plasmática. As células foram incubadas por 45 min no escuro, sob agitação de 60 rpm, a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Em seguida, as células foram lavadas com os meios de cultura contendo os respectivos tratamentos, montadas em lâminas, e analisadas em microscópio de fluorescência Axio Imager (Zeiss). Foram obtidas imagens com câmera Axio Cam MR5 (Zeiss), obtendo-se imagens em campo claro e fluorescência para efeito de comparação e identificação do local de produção de NO. Foram utilizados os filtros de excitação 546-12 e emissão 575-640, correspondente aos comprimentos de onda de excitação em 560 nm e emissão em 575 nm. As imagens em fluorescência foram obtidas nas mesmas configurações para efeitos de comparação da fluorescência relativa de NO nos diferentes tratamentos. A estimativa da fluorescência relativa foi obtida através da análise de pelo menos 30 imagens com auxílios do Software Axio Vision Rel. 4.8 (Zeiss).

4.6.2 Quantificação das PAs

A metodologia para a determinação do conteúdo de PAs livres foi baseada naquela descrita por Silveira *et al.* (2004). Amostras de 300 mg de MF foram maceradas com 1,6mL de ácido perclórico 5% (v/v), e mantidas no gelo por 1 h. Posteriormente, foram centrifugadas a 20.000 g por 20 min a 4 °C, obtendo-se o sobrenadante que contém as PAs livres. As PAs livres foram derivatizadas utilizando-se 40 µL da amostra contendo PAs, 100 µL de cloreto de dansil (5mg.mL⁻¹ em acetona), 50 µL de solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) e 20 µL de 17-diaminoheptano (DAH), utilizado como padrão interno para análise de perdas durante o processo. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 µL de prolina (100 mg.mL⁻¹) com posterior incubação por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, as PAs derivatizadas foram particionadas com 200 µL de tolueno e a fase apolar (tolueno), que contém as PAs, foi coletada (175 µL), seca sob jato de nitrogênio, e ressuspensa em 175 µL de acetonitrila.

A identificação e quantificação das PAs foi realizada utilizando-se HPLC com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-Pack CLC ODS). Acetonitrila absoluta e acetonitrila 10% em água (pH 3,5 ajustado com HCl 1 M) foram utilizadas como solventes. A mudança na proporção de acetonitrila absoluta em relação à acetonitrila 10% definiu o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65%, durante os primeiros 11 min, de 65 a 100% entre 11 e 25 min, e 100% até 35 min, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 340 nm e emissão de 510 nm. Foram injetados 20 µL da amostra derivatizada com cloreto de Dansil. As áreas e tempos de retenção de cada PA foram avaliados por comparação com as PAs (Put, Spd, Spm e DAH) com concentrações conhecidas obtidas na curva padrão.

4.6.3 Quantificação de carboidratos

A metodologia utilizada para a determinação de carboidratos foi baseada na proposta Filson *et al.* (2009), com modificações. Amostras de 300 mg de MF

cada foram maceradas com 1 mL de solução de extração composta por etanol (ETOH) 80%, polivinilpirrolidona (PVPP) a 3% (m/v) e ácido ascórbico 1% (m/v), a 4 °C. Após a maceração, as amostras foram agitadas brevemente em vórtex, e incubadas em banho-maria a 70°C, por 90 min.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas 12.000g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de solução de extração, e resubmetida a centrifugação nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes resultantes foram adicionados aos respectivos provenientes da primeira centrifugação e armazenados a -20°C até a análise em HPLC.

Os carboidratos foram identificados e quantificados por HPLC usando um detector de espalhamento de luz (ELSD-LT II), com temperatura a 40 °C; pressão de N₂ em 350 mPa, com ganho 9 e filtro 4. A coluna utilizada foi Prevail Carbohydrate ES 5 µm (250 x 4,6 mm), com uma pré coluna do tipo Prevail Carbohydrate ES 5 µm (7,5 x 4,6 mm), a 25°C.

Como solventes foram utilizados água Milli-Q e acetonitrila 100%. A corrida foi realizada em gradiente isocrático ajustado para 85% de acetonitrila 100% durante 50 min, com fluxo de 1 mL.min⁻¹. As áreas e tempos de retenção dos carboidratos detectados foram avaliados por comparação com carboidratos padrão (arabinose, frutose, glicose, manose, ribose, maltose, sacarose e xilose), em concentrações conhecidas obtidas em curva padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Crescimento celular

A análise do crescimento celular foi realizada através da curva de crescimento pelo VCS, incremento em MF e MS e pela área das células embriogênicas e suspensor das PEMs das duas linhagens incubadas nos diferentes tratamentos.

Através da análise pelo VCS, verificou-se para as duas linhagens uma inibição do crescimento celular nas culturas incubadas com a maior concentração do inibidor (10 μM), sugerindo a inibição do ciclo celular. A concentração de 1 μM resultou em crescimento celular similar ao controle para as culturas celulares da linhagem MSG (Figura 6A) e maior em relação ao controle das culturas celulares da linhagem BM (Figura 6B). A partir desta curva de crescimento, determinou-se para ambas as linhagens, as datas de 6, 15, 21 e 27 dias após a incubação para coleta das amostras, relacionadas com as fases lag (6 dias), início da exponencial (15 dias), exponencial (21 dias) e estacionária (27 dias) (Figura 6). Estes dias foram utilizados para as análises bioquímicas e morfológicas.

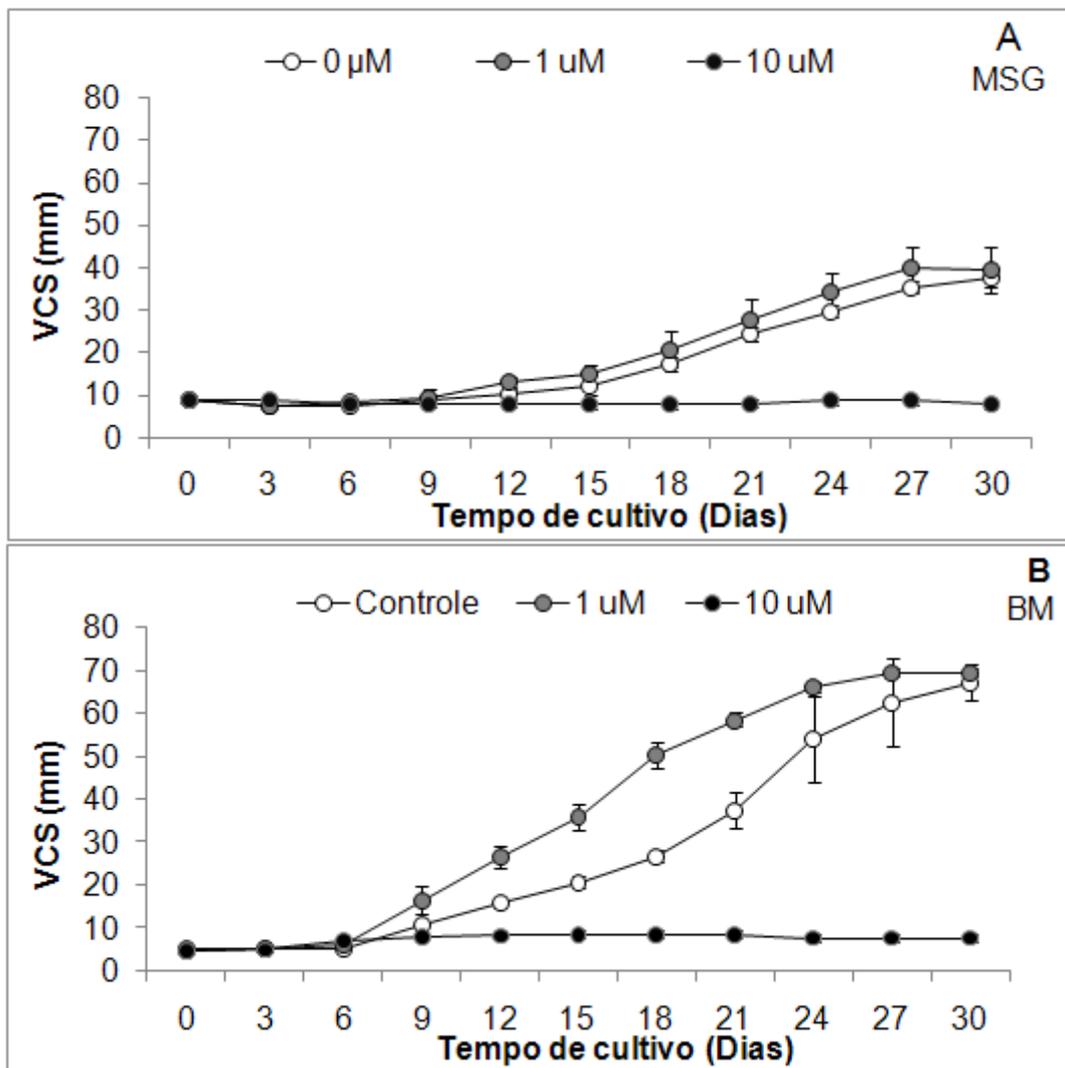


Figura 6. Crescimento em VCS (mm) em culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B), durante 30 dias de cultura (Média \pm desvio padrão, n=4).

A variação da MF e MS para ambas as linhagens MSG e BM estão apresentados nas Figuras 7 e 8. Verificou-se maior crescimento para as culturas embriogênicas em meio BM comparativamente ao MSG (Figura 7). A maior concentração do inibidor (10 μM) resultou na inibição do crescimento celular em MF (Figura 7) e MS (Figura 8) em ambas as linhagens, similar ao observado para a análise por VCS (Figura 6). Entretanto, valores similares em MF e MS foram observados para os tratamentos controle e 1 μM do inibidor para as duas linhagens (Figuras 7 e 8).

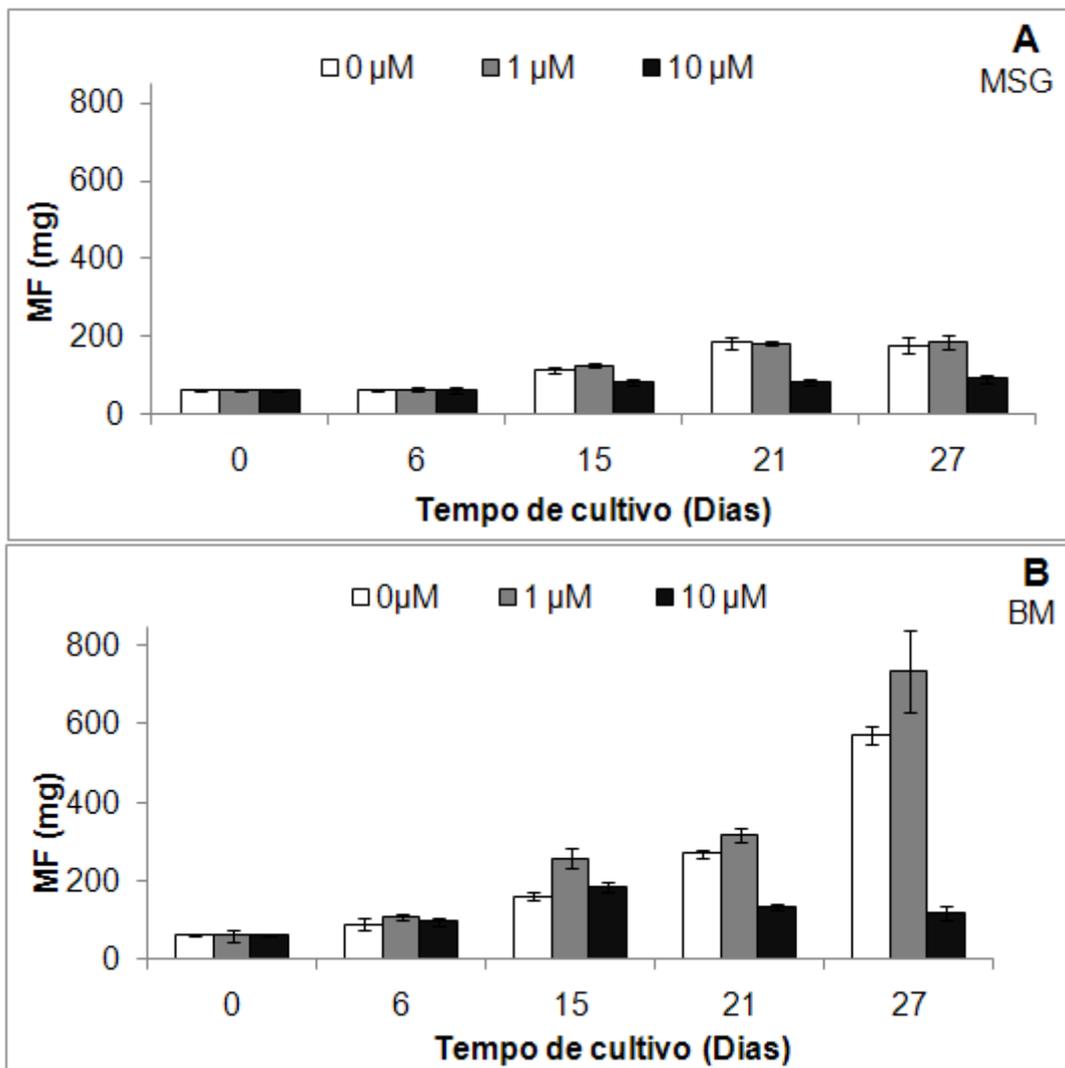


Figura 7. Crescimento em MF (mg) em culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B) antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 μ M do inibidor SP600125 (Média \pm desvio padrão, n= 6).

Pode-se sugerir que o maior crescimento em VCS (Figura 6) observado em especial nas culturas celulares da linhagem BM na concentração de 1 μ M do inibidor poderia estar associada ao tamanho das PEMs, que ocupariam um maior volume celular comparativamente ao seu peso em MF e MS (Figuras 7 e 8). Desta forma, procedeu-se a análise do crescimento em área das células embriogênicas (Figura 9) e suspensor (Figura 10) das PEMs para as duas linhagens, MSG.

Verificou-se, entretanto, que não houve diferença nas áreas das células embriogênicas e do suspensor incubadas nos tratamentos controle (0 μ M) e 1 μ M do inibidor para a linhagem BM, assim como para a MSG (Figura 9).

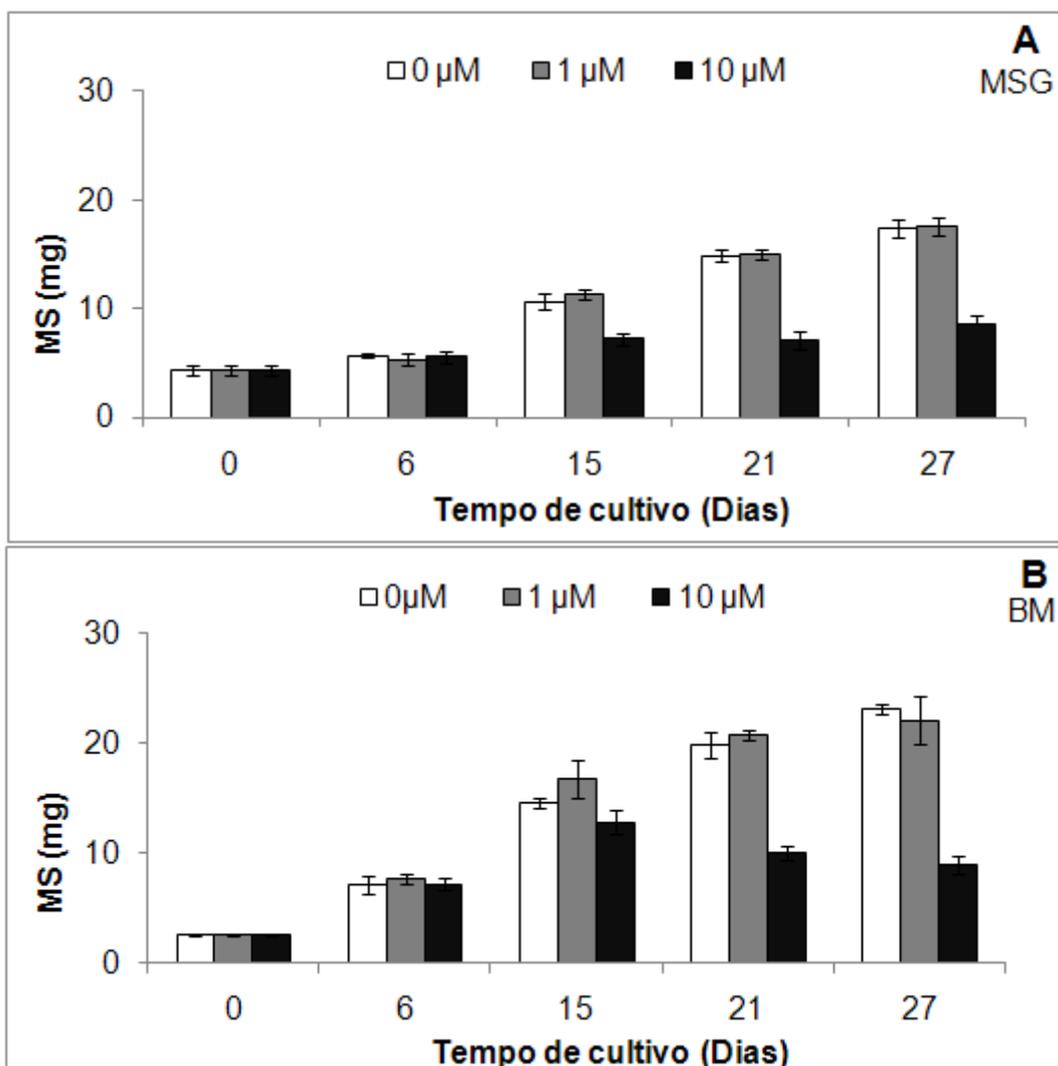


Figura 8. Crescimento em MS em culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B) antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 μ M do inibidor SP600125 (Média \pm desvio padrão, n= 6)

Para a linhagem MSG, as células embriogênicas são maiores nos tratamentos controle e 1 μ M, comparativamente com aquelas tratadas com 10 μ M do inibidor (Figura 9A), sendo que o tamanho deste tipo celular aumenta durante a incubação, verificando-se maior área na fase estacionária. Por outro lado, as culturas celulares da linhagem BM apresentaram áreas similares para células embriogênicas para as três concentrações do inibidor utilizadas (Figura 9B), durante as diferentes fases.

Por outro lado, comparando-se o tamanho das células de suspensor das PEMs, foi possível observar áreas similares para as três concentrações do

inibidor utilizadas, tanto para a linhagem MSG (Figura 10A) quanto para a BM (Figura 10B).

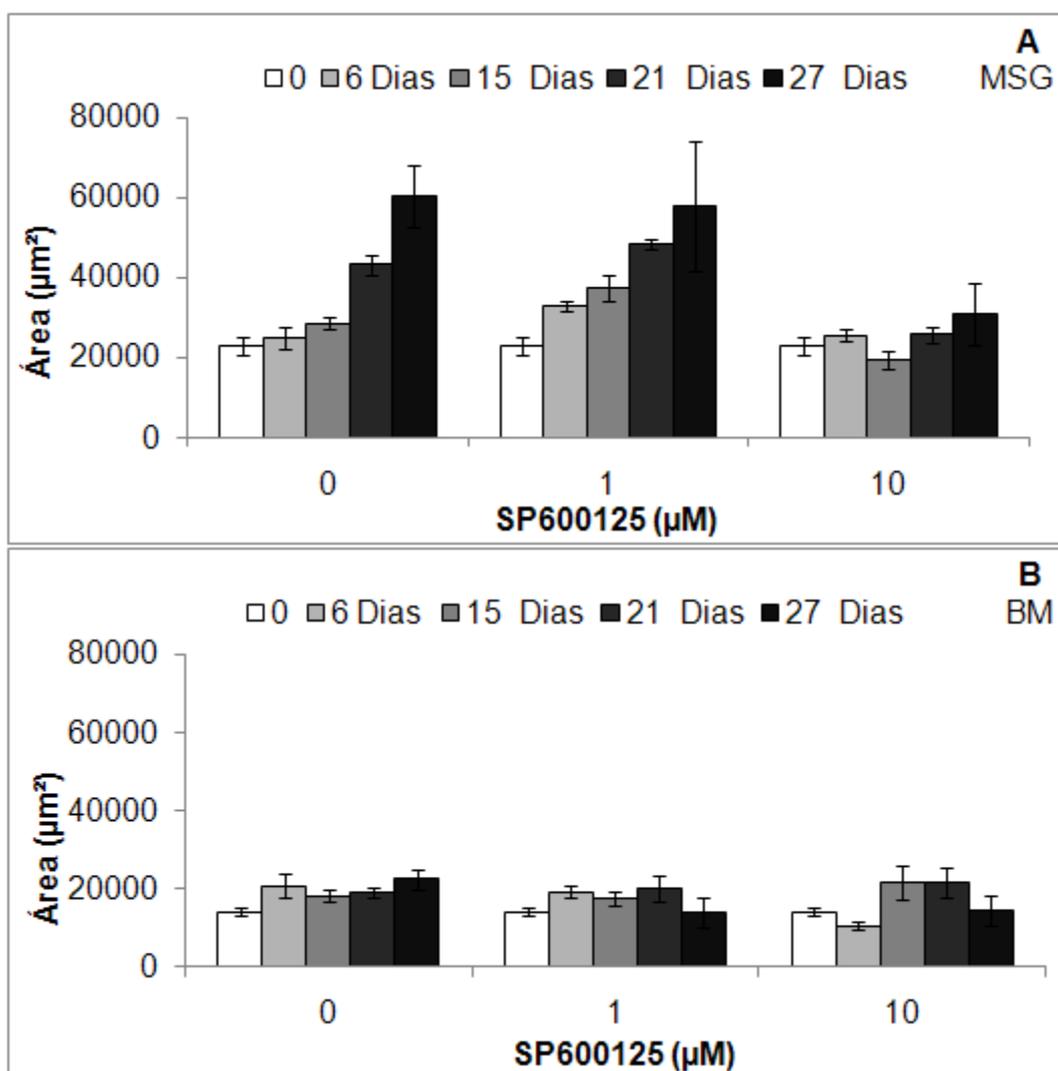


Figura 9. Área das células embriogênicas de PEMS em culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B) antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 µM do inibidor SP600125 (Média ± desvio padrão, n = 10).

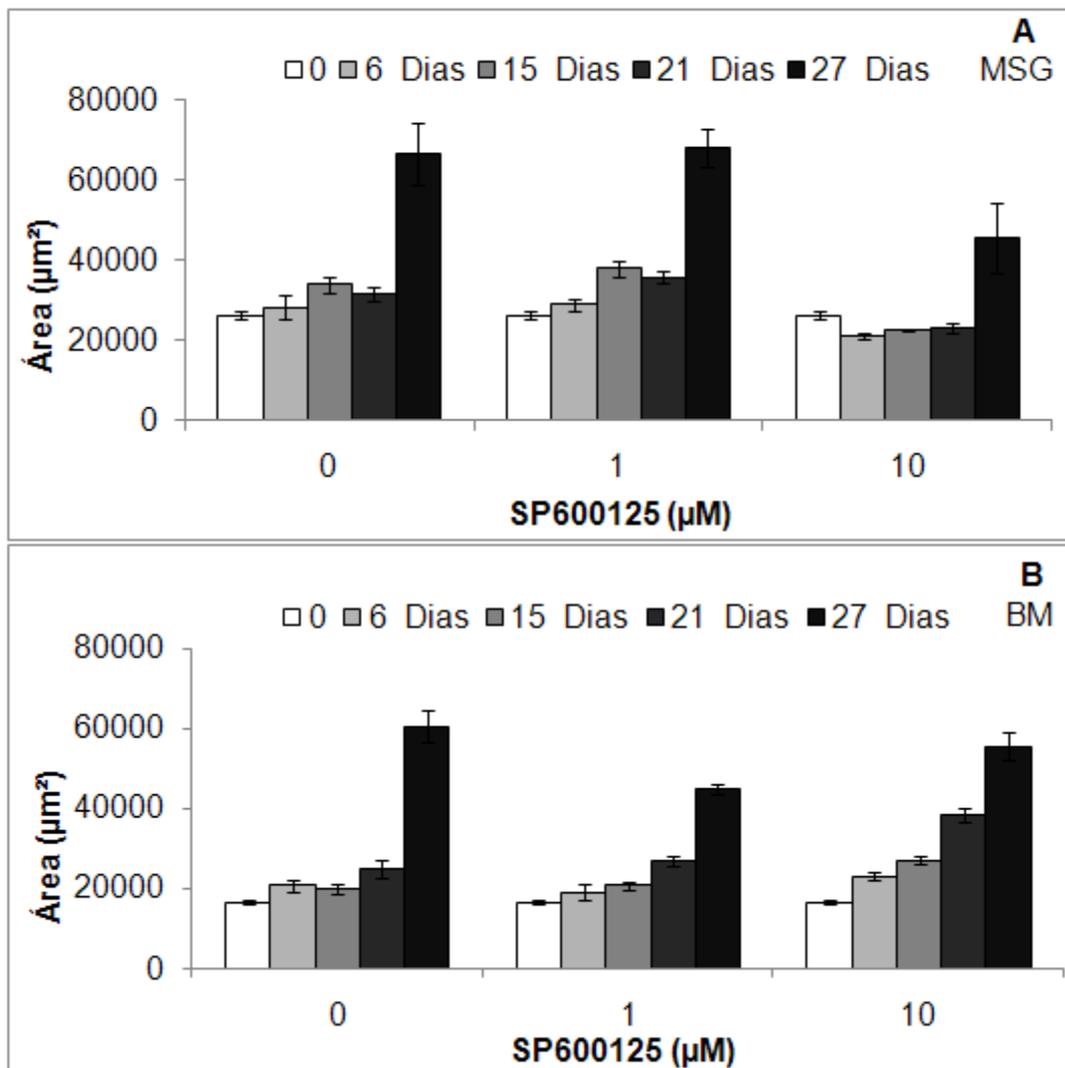


Figura 10. Área das células suspensor das PEMs em culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B) antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 µM do inibidor SP600125 (Média ± desvio padrão, n = 10).

5.2 Análise Morfológica

Pela análise morfológica das PEMs das culturas celulares de *A. angustifolia* verificou-se, a partir do 15º dia de incubação, uma diminuição acentuada do tamanho das PEMs submetidas ao tratamento com 10 µM do inibidor para ambas as linhagens, sendo mais acentuada para a linhagem MSG (Figuras 11 e 12). Entretanto, pela análise da área das células embriogênicas e suspensor somente foi possível observar diferenças no tipo celular embriogênica para a linhagem MSG (Figura 9A).

Nos tratamentos controle e 1 μM de inibidor não foi observada alterações acentuadas na morfologia das células para ambas as linhagens, mantendo um padrão similar ao longo do tempo de incubação (Figuras 11 e 12), conforme mostrado também pela medida da área das células embriogênicas e suspensor das PEMs (Figuras 9 e 10).

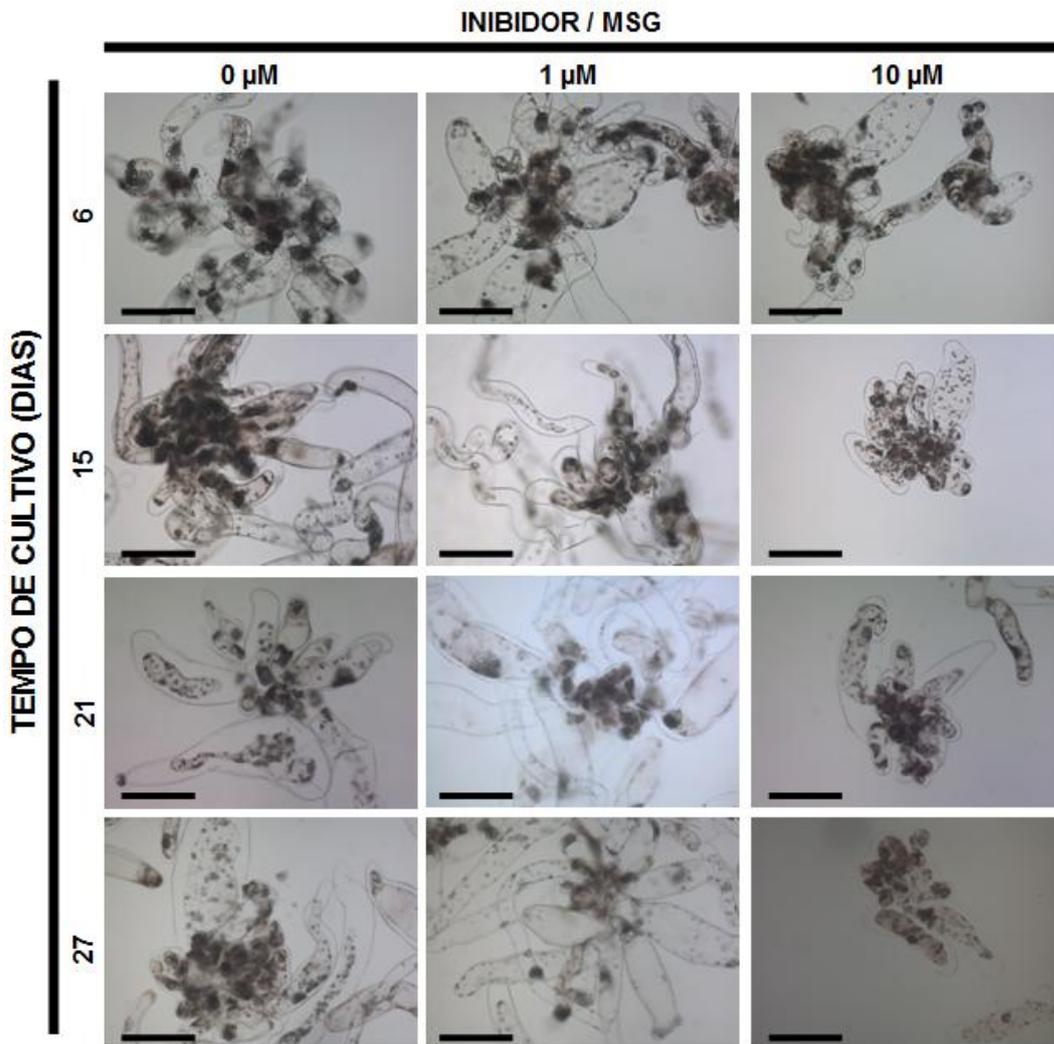


Figura 11. Aspectos morfológicos de PEMs em culturas celulares de *A. angustifolia* da linhagem MSG após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 μM do inibidor SP600125. PEMs= massas pró-embriogênicas. Barras= 200 μm .

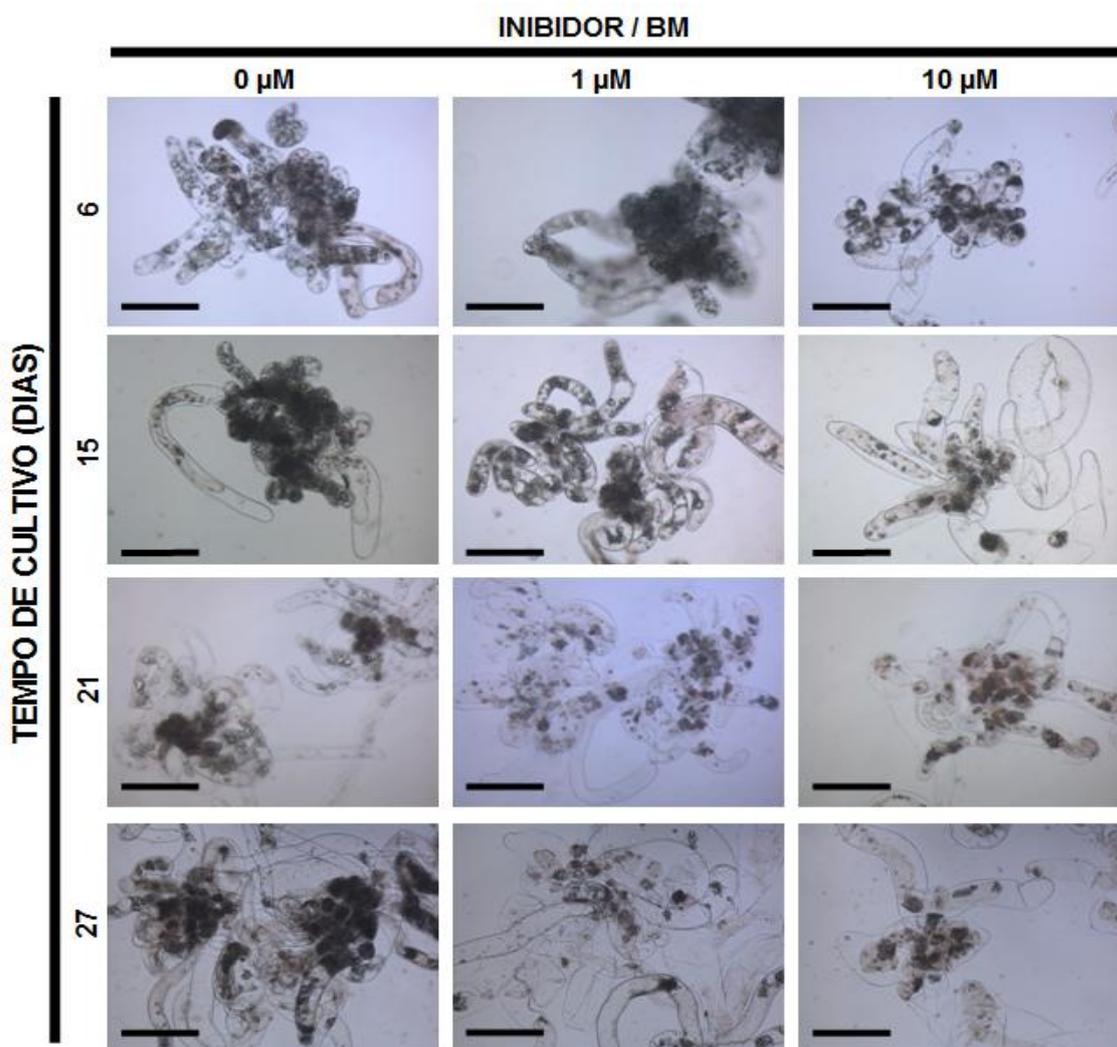


Figura 12. Aspectos morfológicos das PEMs em culturas celulares de *A. angustifolia* da linhagem MSG após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 μM do inibidor SP600125. PEMs: Massas pró-embriogênicas. Barras = 200 μm .

5.3 Análises bioquímicas

5.3.1 Carboidratos

Analisou-se os níveis endógenos de carboidratos em ambas as linhagens celulares, MSG e BM, visando verificar o efeito do inibidor sobre o metabolismo destes compostos. Dentre os carboidratos analisados, identificou-se a presença de sacarose (Figura 13), frutose (Figura 14) e glicose (Figura 15), cujos conteúdos foram afetados pelos tratamentos e tipos de linhagem celular.

Comparativamente à frutose e glicose, verificou-se maiores alterações no conteúdo de sacarose para ambas as linhagens, MSG (Figura 13A) e BM (Figura 13B).

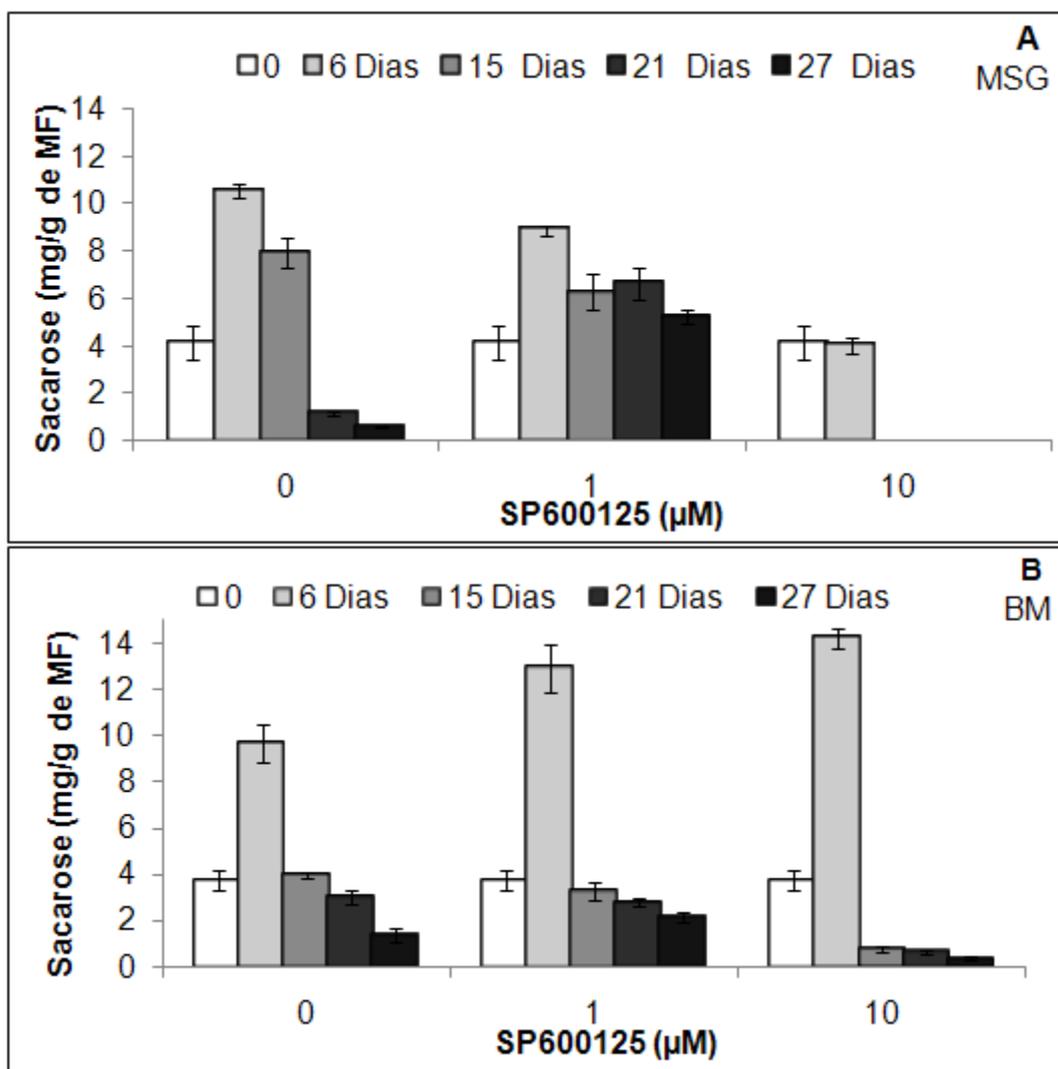


Figura 13. Conteúdo (mg/g de MF) de sacarose em culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B) antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 μM do inibidor SP600125 (Média ± desvio padrão, n = 3).

Para a linhagem MSG (Figura 13A), o conteúdo de sacarose apresentou diferenças acentuadas entre os diferentes tratamentos. Verificou-se para o tratamento controle um aumento acentuado até o 6º, durante a fase lag, dia e uma queda brusca a partir do 21º dia, no final da fase exponencial. Para o tratamento com 1 μM também houve um aumento até o 6º dia, seguido de

redução menos acentuada a partir do 15º dia de incubação. Porém, o conteúdo deste carboidrato no tratamento com 10 µM se manteve com valores similares até o 6º dia de incubação, durante a fase lag, seguido de redução acentuada, não sendo detectado nas datas posteriores de análise na cultura celular da linhagem MSG (Figura 13A).

Por outro lado, o teor de sacarose nas culturas celulares da linhagem BM (Figura 13B) demonstrou um perfil similar para os três tratamentos, ocorrendo um acúmulo acentuado até o 6º dia, durante a fase lag, seguido de decréscimo até o final do cultivo, o qual foi mais acentuado nas culturas celulares incubadas no tratamento com 10 µM do inibidor.

Ao analisar o conteúdo endógeno de frutose (Figura 14), verificou-se para a linhagem MSG um perfil semelhante para os tratamentos controle e 1 µM do inibidor, apresentando um aumento até o 15º dia, no início da fase exponencial, seguido de um leve decréscimo até o final da incubação, na fase estacionária (Figura 14A). Por outro lado, no tratamento com 10µM, o conteúdo deste carboidrato apresentou valores crescentes durante o período de incubação, sendo maiores que o controle e 1 µM do inibidor.

Nas culturas celulares da linhagem BM verificou-se valores menores para frutose no controle e 1 µM do inibidor (Figura 14B) comparando-se com estes mesmos tratamentos na linhagem MSG (Figura 14A).

Estes valores foram similares ao longo da incubação das células na linhagem BM nos tratamentos controle e 1 µM do inibidor, enquanto no tratamento com a maior concentração do inibidor, a frutose apresentou um aumento acentuado a partir do 15º dia, no início da fase exponencial, diferentemente dos outros tratamentos no mesmo período (Figura 14B). Este aumento no tratamento com 10 µM na linhagem BM (Figura 13B) também foi observado na linhagem MSG (Figura 14A), porém com acréscimo menos acentuado que a linhagem BM.

Com relação à glicose, verificou-se que as culturas celulares das duas linhagens apresentaram perfis semelhantes quando incubadas com 0 e 1 µM (Figura 15) comparativamente ao tratamento com 10 µM do inibidor. Adicionalmente, culturas celulares da linhagem BM apresentaram conteúdos menores deste carboidrato comparativamente a linhagem MSG.

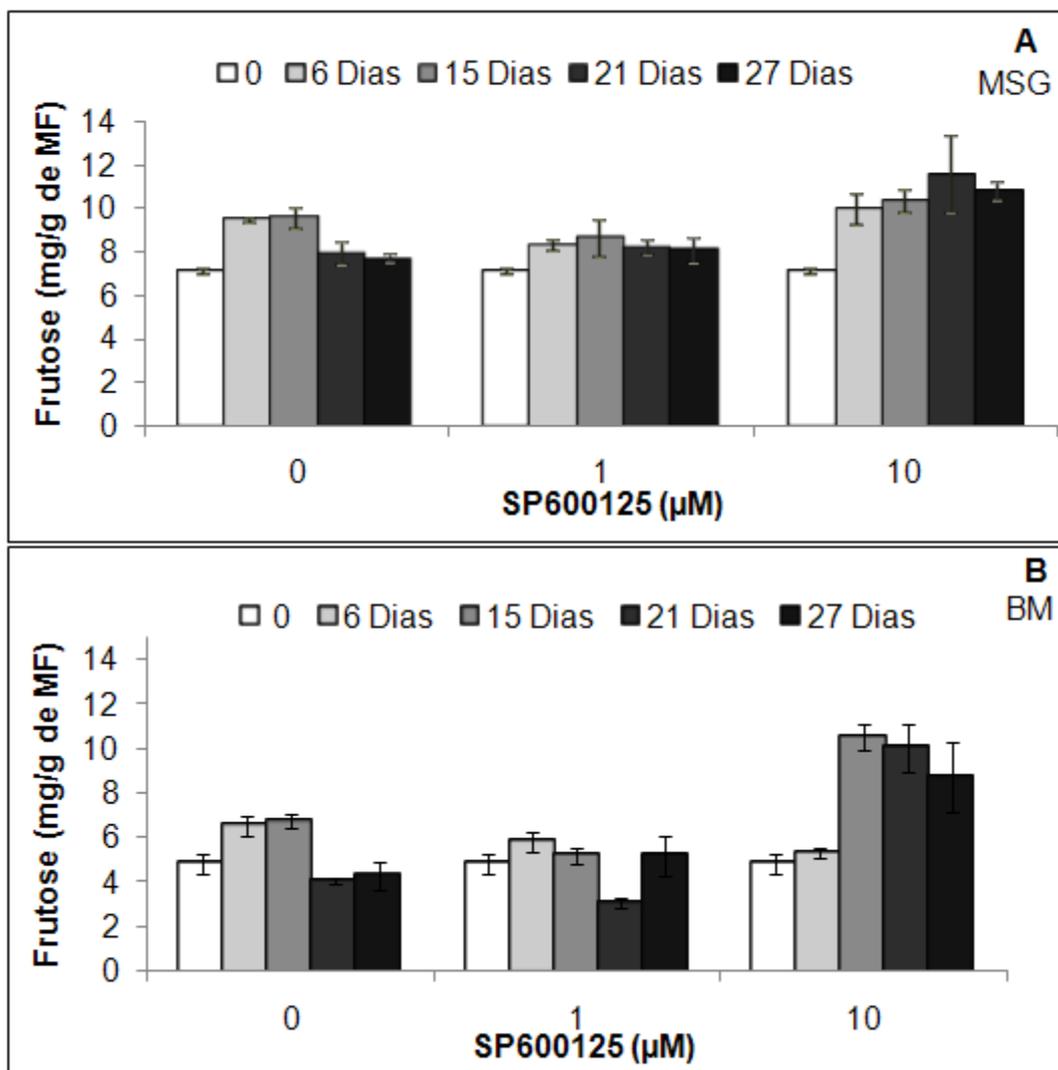


Figura 14. Conteúdo (mg/g de MF) de frutose em culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B) antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 μM do inibidor SP600125 (Média ± desvio padrão, n = 3).

Para ambas as linhagens, houve um decréscimo no conteúdo de glicose ao longo da incubação nos tratamentos com 0 e com 1 μM do inibidor. Em contrapartida o tratamento com 10 μM do inibidor apresentou um acúmulo de glicose, o qual foi constante para a linhagem MSG (Figura 15A) e acentuado a partir do 15º dia de incubação, no início da fase exponencial, para a linhagem BM (Figura 15B).

Adicionalmente, foi observado que as concentrações do inibidor afetaram a quantidade de frutose (Figura 14) e glicose (Figura 15) em ambas as linhagens, porém o perfil do metabolismo se manteve semelhante quando comparados os diferentes tratamentos ao longo da incubação

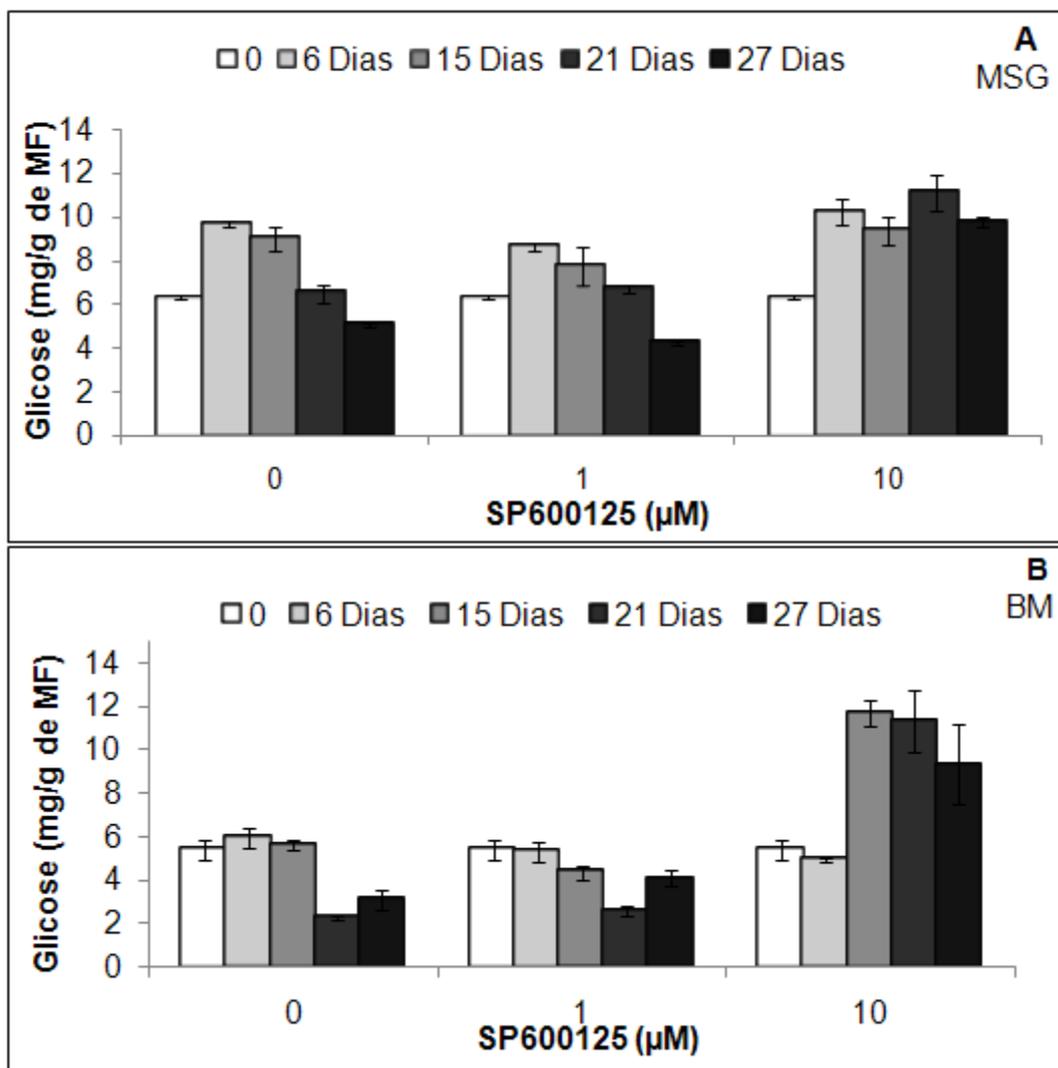


Figura 15. Conteúdo (mg/g de MF) de glicose em culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B) antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 µM do inibidor SP600125 (Média ± desvio padrão, n = 3).

5.3.2 Óxido Nítrico (NO)

Ao comparar os diferentes tratamentos ao longo da incubação, verificou-se alterações no conteúdo de NO, dependente da concentração do inibidor e dos tipos celulares da linhagem celular (Figuras 16 e 17).

Comparando-se os dois tipos celulares das PEMs, verificou-se que as células embriogênicas (Figura 16) possuem maior conteúdo intracelular de NO comparativamente às células susceptor (Figura 17), para as duas linhagens celulares.

Para as células embriogênicas de PEMs da linhagem MSG (Figura 16A), verificou-se que nas concentrações 0 (controle) e 1 μM do inibidor as células apresentaram maior conteúdo de NO no início, antes da incubação, o qual reduziu até o 6º dia durante a fase lag, seguido de aumento até o 15º e 21º, na fase exponencial, e redução na fase estacionária (Figura 16A). Por outro lado, a maior concentração de inibidor resultou também em uma redução mais acentuada de NO até o 6º dia de incubação, na fase lag, seguido de valores similares até o final da incubação.

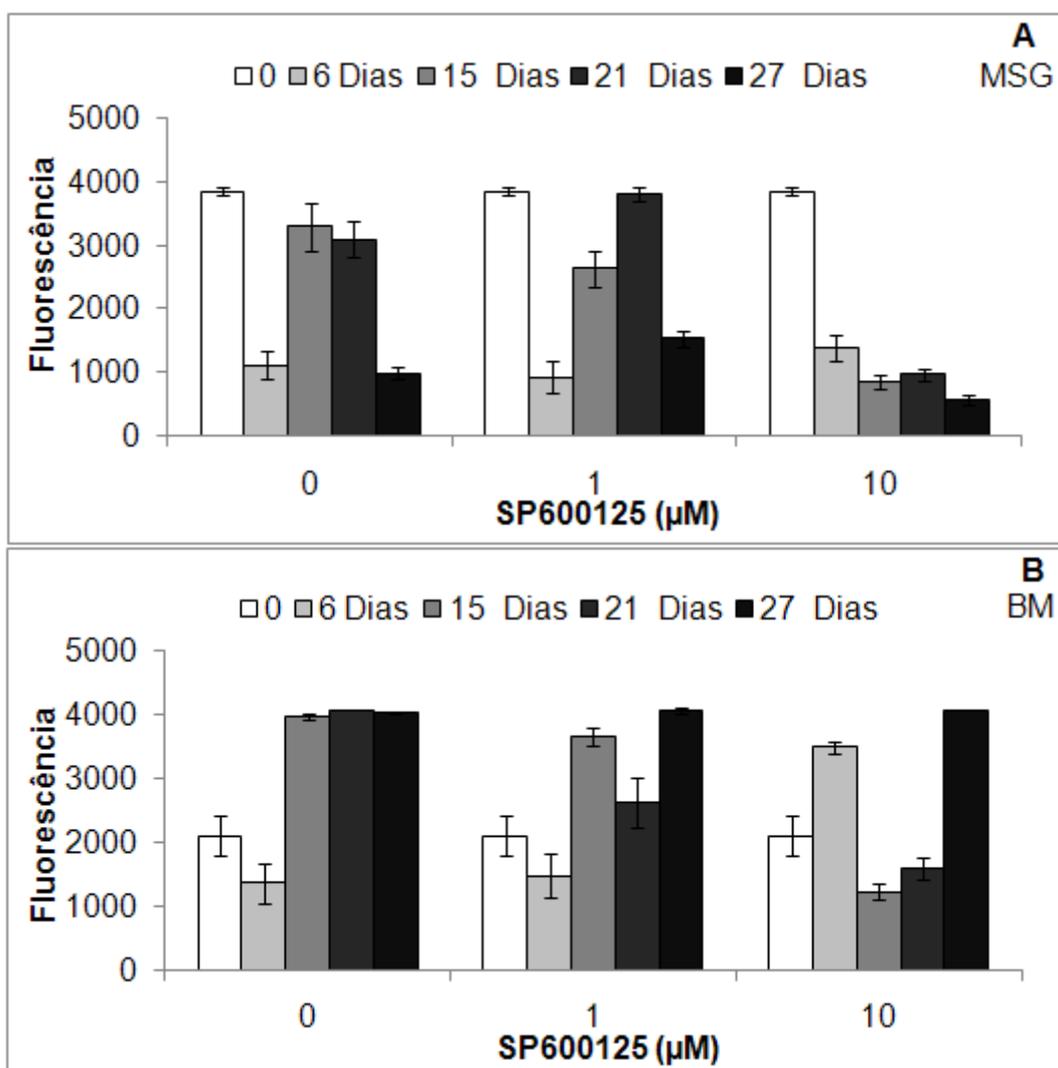


Figura 16. Conteúdo (fluorescência relativa/ μm^2) de NO em células embriogênicas de culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B) antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 μM do inibidor SP600125 (Média \pm desvio padrão, n = 10). Tempo de exposição para obtenção das imagens com fluorescência relativa para as linhagens: MSG 100 ms (A) e BM 1000 ms (B).

As células embriogênicas de PEMs da linhagem BM (Figura 16B) apresentaram perfil diferenciado no conteúdo de NO comparativamente à MSG. Verificou-se pequena redução durante a fase lag, até o 6º dia, seguido de acréscimo no início da fase exponencial (15º dia), e estabilização até o final do cultivo. A maior concentração do inibidor resultou em um aumento de NO na fase lag (6º dia) e redução na fase exponencial (15º ao 21º dia), seguido de acréscimo na fase estacionária.

Nas células do suspensor (Figura 17) das PEMs, cujo conteúdo de NO

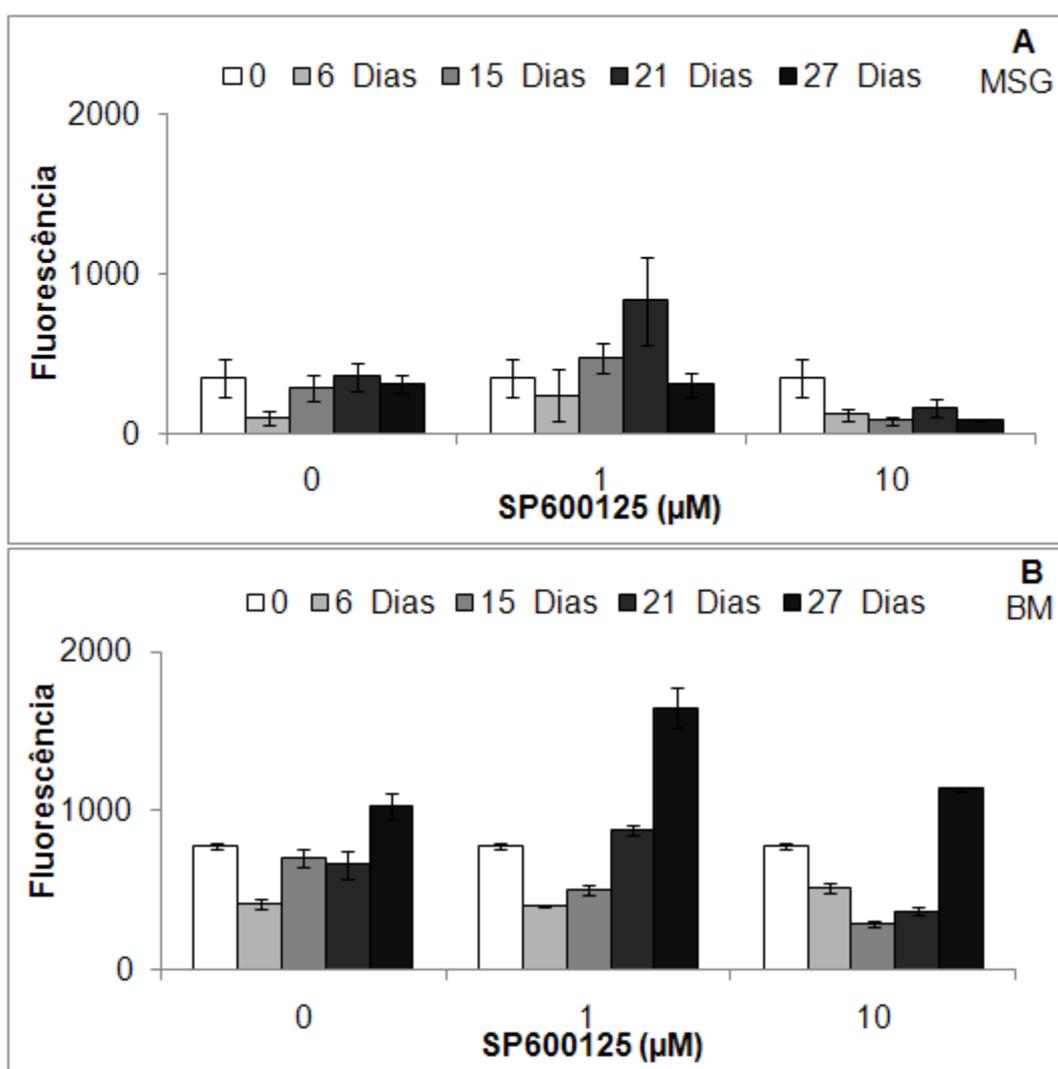


Figura 17. Conteúdo (fluorescência relativa/ μm^2) de NO em células do suspensor de culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B) antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação nas concentrações 0, 1 e 10 μM do inibidor SP600125. Tempo de exposição para obtenção das imagens com fluorescência relativa para as linhagens: MSG 100 ms (A) e BM 1000 ms (B). (Média \pm desvio padrão, n = 10).

foi menor para as duas linhagens comparativamente às células embriogênicas, verificou-se diferenças acentuadas ao comparar as linhagens celulares e os diferentes tratamentos ao longo da incubação. Células suspensores da linhagem MSG (Figura 17A) apresentam menor conteúdo de NO comparativamente às da linhagem BM (Figura 17B).

Para a linhagem MSG, as células suspensores incubadas nos tratamentos controle e 1 μM do inibidor apresentaram redução nos níveis de NO no 6º dia de incubação, na fase lag, seguido de acréscimo até o 21º dia, sendo mais acentuado para o tratamento com 1 μM do inibidor, e redução na fase estacionária. Com a maior concentração (10 μM) do inibidor (Figura 17A) ocorreu uma resposta similar ao observado para as células embriogênicas (Figura 16A) na mesma condição, com uma redução acentuada no início da incubação, mantendo valores similares até o final do cultivo.

As células suspensor da linhagem BM (Figura 17B) incubadas no tratamento controle e 1 μM de inibidor apresentaram decréscimo na fase lag, seguido acréscimo até a fase estacionária, onde observou-se a maior concentração de NO. A maior concentração de inibidor também apresentou um perfil similar ao dos tratamentos controle e 1 μM do inibidor durante a incubação (Figura 17B).

5.3.3 Poliaminas

Os conteúdos de PAs livres totais foram analisados para as duas linhagens celulares BM (Figura 18) e MSG (Figura 19) nos três tratamentos (0, 1 e 10 μM). Na linhagem BM o conteúdo das PAs se manteve semelhante para os tratamentos com 0 e 1 μM (Figura 18A) do inibidor, apresentando um aumento na fase exponencial (15º dia) seguido de decréscimo até o final da incubação. No tratamento com 10 μM (Figura 18A) o conteúdo total de PAs apresentou um decréscimo na fase exponencial e manteve este conteúdo até o final da incubação.

O conteúdo de PAs livres totais presentes no meio de cultura aumentou gradativamente a partir do 15º dia no tratamento sem o inibidor (Figura 18B). No tratamento com 1 μM do inibidor ocorreu um pico elevado de PAs no meio de cultura durante a fase lag (6º dia), seguido de um padrão semelhante ao encontrado no meio isento do inibidor até o final da incubação (Figura 18B). No

tratamento com a maior concentração do inibidor (Figura 18B) as PAs foram encontradas em menor quantidade no meio de cultura comparativamente aos demais tratamentos (Figura 18B) e apresentaram aumento a partir do 6º dia de incubação.

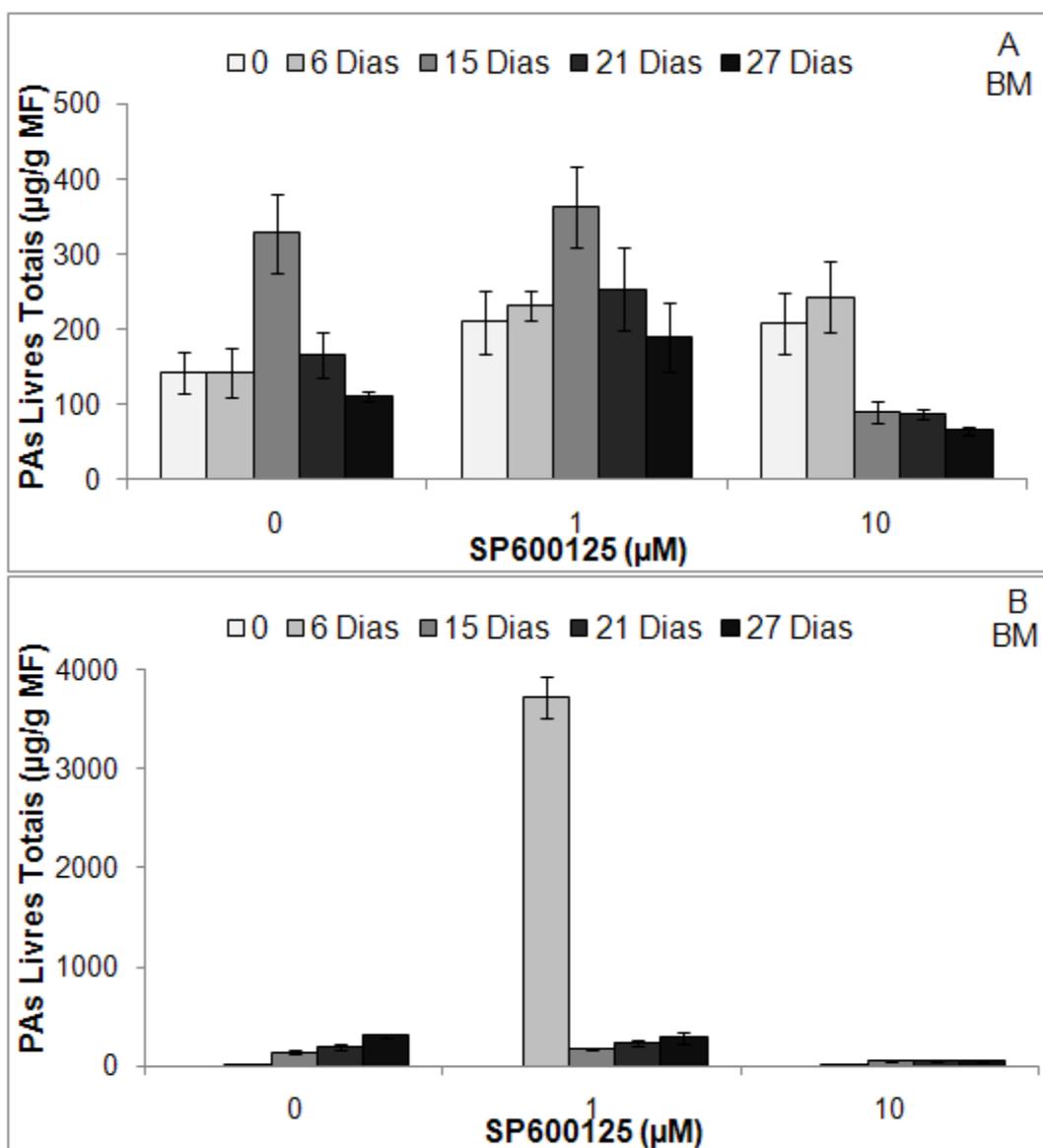


Figura 18. Conteúdo (µg/g MF) de PAs livres totais em culturas celulares (A) e meio de cultura (B) da linhagem BM de *A. angustifolia* incubadas com 0, 1 e 10 µM do inibidor SP600125 antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação (Média ± desvio padrão, n = 3).

Para a linhagem MSG, o conteúdo de PAs livres totais presente nas células variou de acordo com o tratamento utilizado. Nas células sem o inibidor

(Figura 19A), o nível de PAs apresentou uma pequena oscilação ao longo da incubação, com um pequeno aumento no final da fase exponencial (21º dia). Nas células com 1 µM do inibidor (Figura 19A) o conteúdo de PAs livres totais diminuiu no início da fase exponencial (15º dia), seguido de aumento no final da fase exponencial, no 21º dia de incubação. No tratamento com a maior concentração do inibidor (Figura 19A), o conteúdo de PAs livres totais apresentou uma redução acentuada a partir da fase lag (6º dia) e se manteve em níveis inferiores aos dos observados nos demais tratamentos ao longo da incubação.

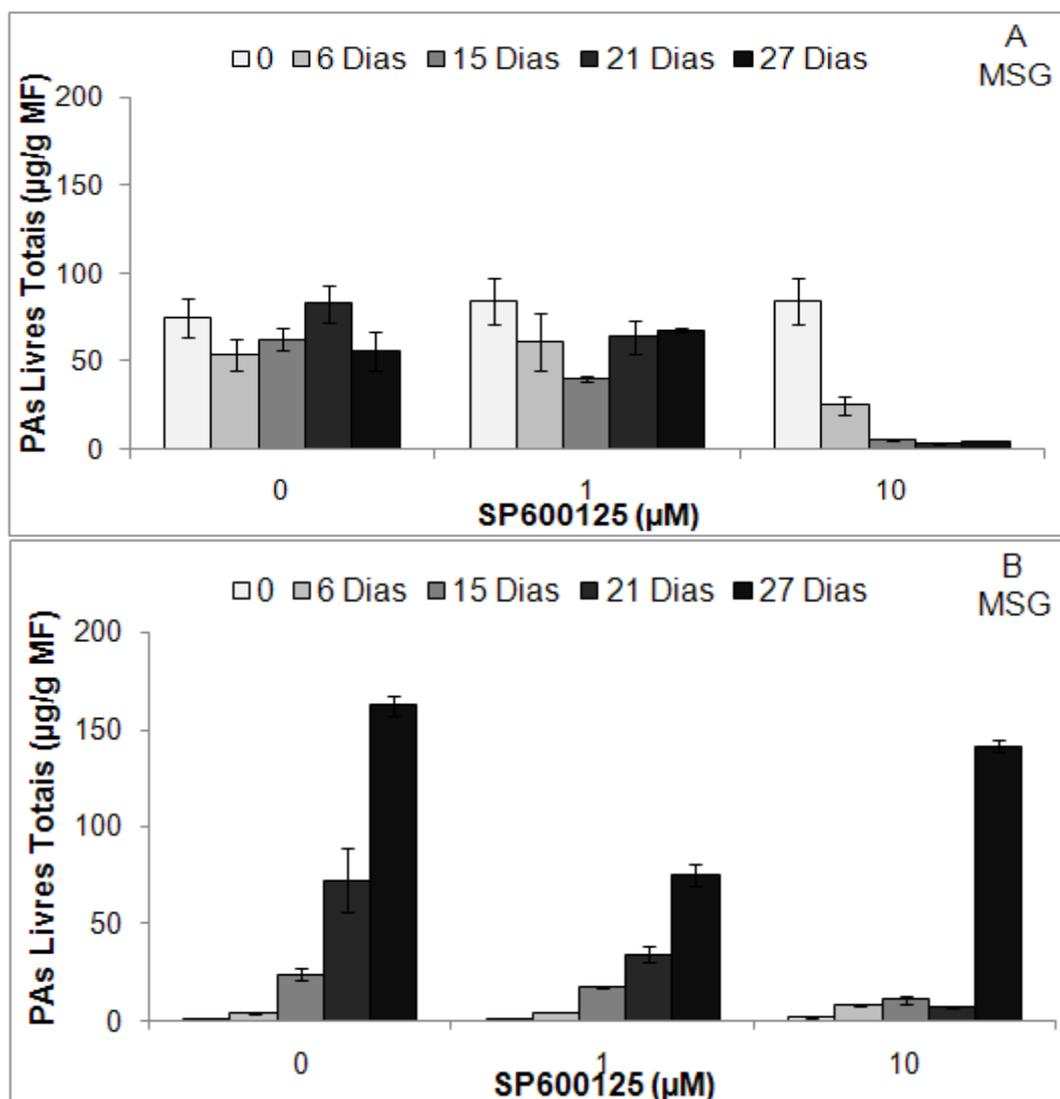


Figura 19. Conteúdo (µg/g de MF) de PAs livres totais em culturas celulares (A) e meio de cultura (B) da linhagem MSG de *A. angustifolia* incubadas com 0, 1 e 10 µM do inibidor SP600125 antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação (Média ± desvio padrão, n = 3).

As PAs livres totais presentes no meio de cultura apresentou um padrão similar ao longo da incubação, com aumento gradativo a partir da fase exponencial (15^o dia) para os tratamentos com 0 e com 1 μ M do inibidor (Figura 19B), sendo o conteúdo inferior no tratamento com 1 μ M. No tratamento com 10 μ M (Figura 19B) do inibidor o conteúdo de PAs livres totais presente no meio de cultura foi maior no final da incubação. Além disso, neste tratamento, o conteúdo de PAs livres totais foi maior que o conteúdo presentes na células.

Comparando o conteúdo de PAs livres totais entre as linhagens, verificou-se que na linhagem BM o conteúdo de PAs nas células (Figura 18A) são superiores aos encontrados na linhagem MSG (Figura 19A). No meio de cultura, a linhagem BM também apresenta níveis de PAs livres totais superiores na maioria dos tratamentos (Figuras 18B e 19B), exceto, na fase estacionária (27^o dia) para o tratamento com 10 μ M do inibidor (Figuras 18B e 19B).

Ao analisar o conteúdo endógeno de PAs individualmente nas culturas celulares e no meio de cultura das duas linhagens MSG (Figura 20) e BM (Figura 21), verificou-se que os diferentes tratamentos resultaram em alterações no conteúdo endógeno das PAs.

As culturas embriogênicas da linhagem MSG apresentaram um conteúdo de PAs totais diferenciado de acordo com o tratamento (Figura 19). Comparando-se as diferentes PAs, verificou-se maiores concentrações para Put, seguido de Spd e Spm. Para Put, foi observado um perfil similar para os tratamentos controle e 1 μ M (Figuras 20A e 20B), o qual foi diferente para a maior concentração do inibidor (Figura 20C).

No tratamento com 0 μ M (Figura 20A) da linhagem MSG, o conteúdo de Put reduziu durante a fase lag, seguido de acréscimo até o final da fase exponencial (21^o dia), diminuindo na fase estacionária. Similarmente, no tratamento com 1 μ M do inibidor (Figura 20B), verificou-se uma redução até início da fase exponencial (15^o dia), seguido de aumento até a estacionária. Na maior concentração do inibidor, o conteúdo de Put foi reduzido acentuadamente até o 6^o dia, na fase lag, apresentando valores baixos até o final da incubação (Figura 20C).

O conteúdo de Spd e Spm no controle (Figura 20A) e com 1 μM (Figura 20B) apresentou oscilações menores comparativamente a Put, com valores similares ao longo da incubação, sugerindo que a Put é a PA que apresenta maior influencia sobre o crescimento celular. No tratamento com a maior concentração do inibidor (Figura 20C), por outro lado, observou-se um decréscimo acentuado no conteúdo de Spd e Spm durante o período de incubação.

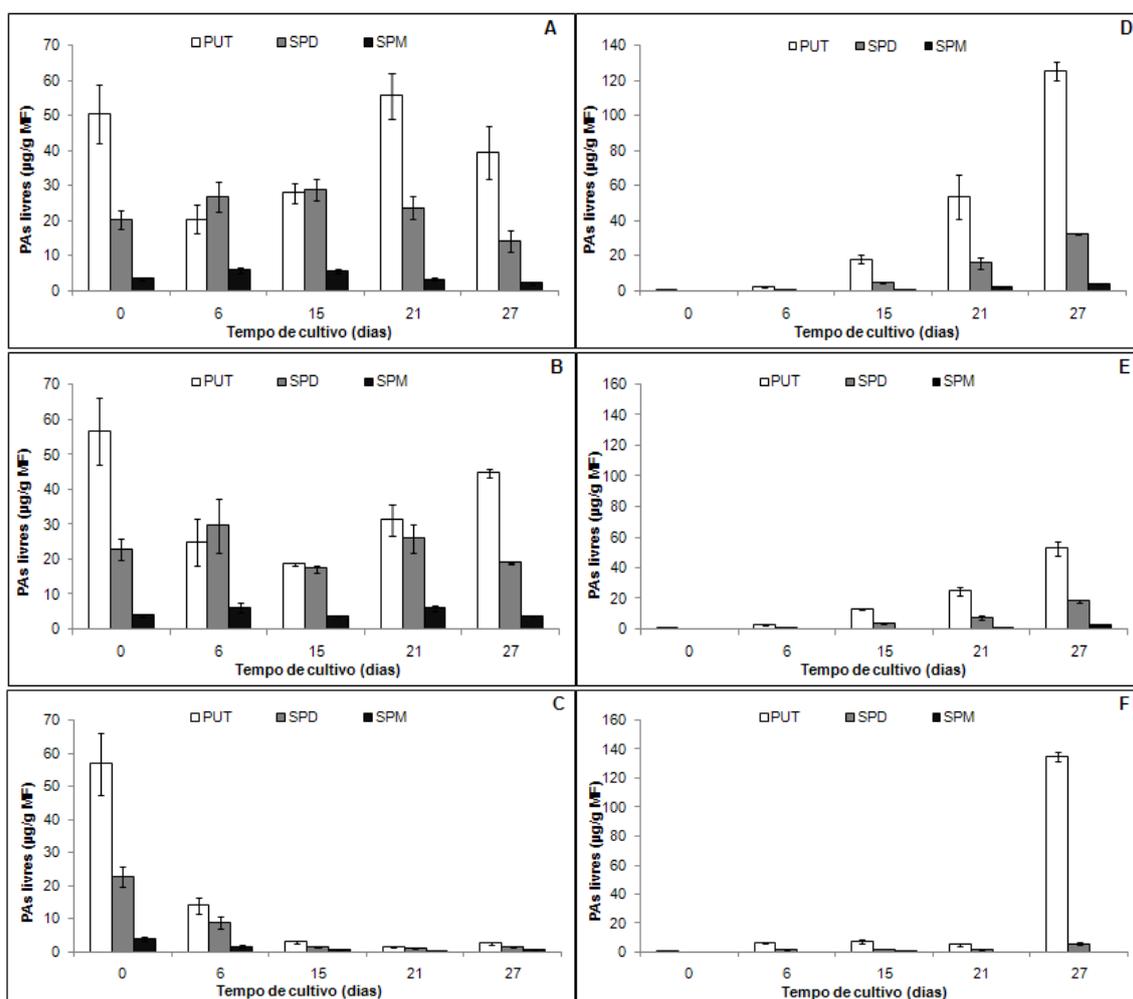


Figura 20. Conteúdo de PAs em culturas celulares (A, B e C) e meio de cultura (D, E e F) da linhagem MSG de *A. angustifolia* incubadas com 0 (A e D); 1 (B e E) e 10 (C e F) μM do inibidor SP600125 antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação (Média \pm desvio padrão, n = 3).

Analisando-se o conteúdo das PAs no meio de cultura das culturas celulares da linhagem MSG verificou-se um aumento gradativo no conteúdo

das três PAs a partir do 6^o dia de incubação, na fase lag, com maiores valores na fase estacionária para Put, seguido de Spd e Spm (Figuras 20D, 20E e 20F). No tratamento com a maior concentração do inibidor este acréscimo foi acentuado somente na fase estacionária, com maior conteúdo para Put (Figura 20F). Estes resultados mostram um acúmulo de PAs no final da incubação, durante a fase estacionária destas culturas celulares, as quais podem ter sido liberadas das células durante a incubação.

Nas culturas celulares da linhagem BM, verificou-se também maiores concentrações para Put, seguido de Spd e Spm nos três tratamentos testados (Figuras 21A, 21B e 21C).

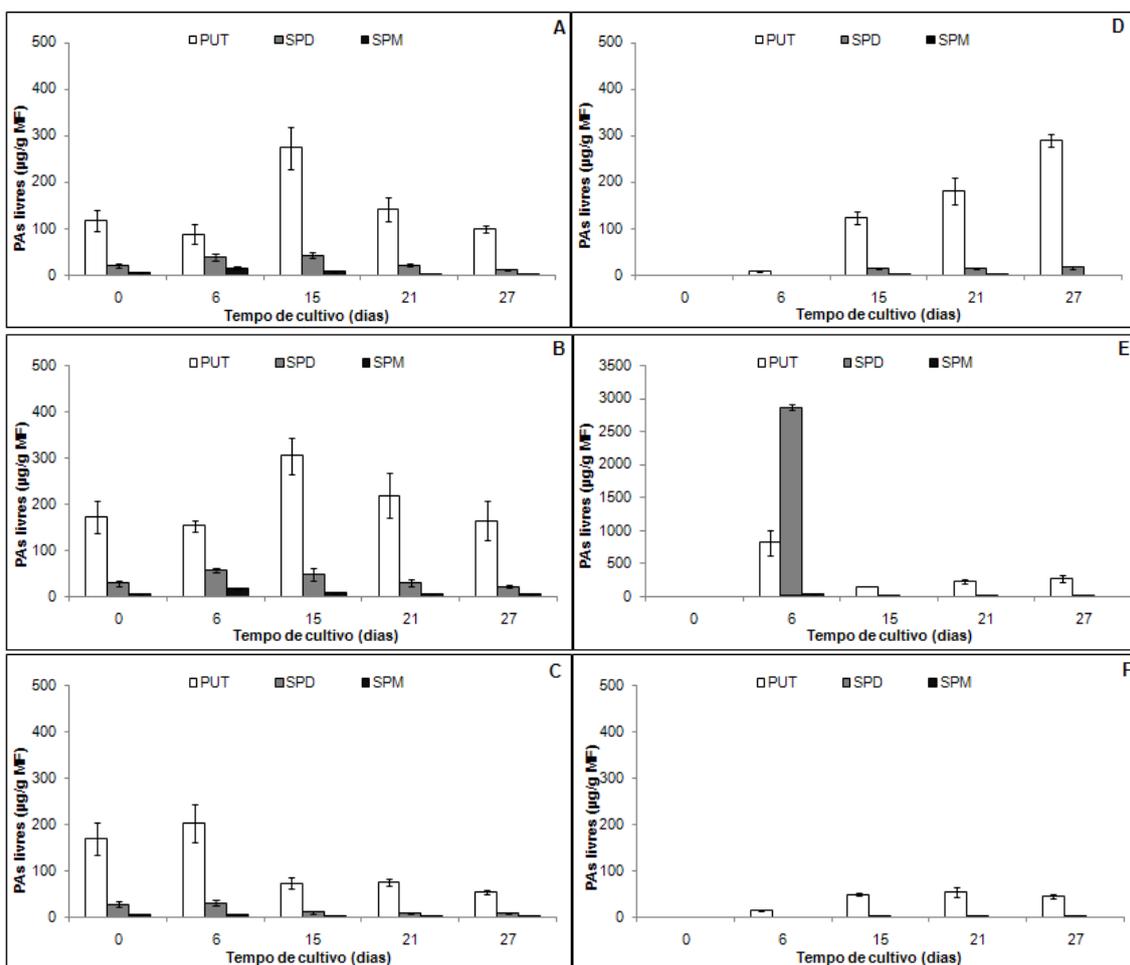


Figura 21. Conteúdo de PAs em culturas celulares (A, B e C) e meio de cultura (D, E e F) da linhagem BM de *A. angustifolia* incubadas com 0 (A e D); 1 (B e E) e 10 (C e F) μM do inibidor SP600125 antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação (Média ± desvio padrão, n = 3).

Nos tratamentos controle (Figura 21A) e 1 μM de inibidor (Figura 21B), o conteúdo das PAs Put e Spd aumentou até o 15º dia, no início da fase exponencial, seguido de decréscimo até o final da incubação, enquanto os níveis de Spm foram observados em menores concentrações durante todo o período. No tratamento com a maior concentração do inibidor (Figura 21C), verificou-se um decréscimo no conteúdo das três PAs analisadas a partir do 6º dia, na fase lag, até o final da incubação.

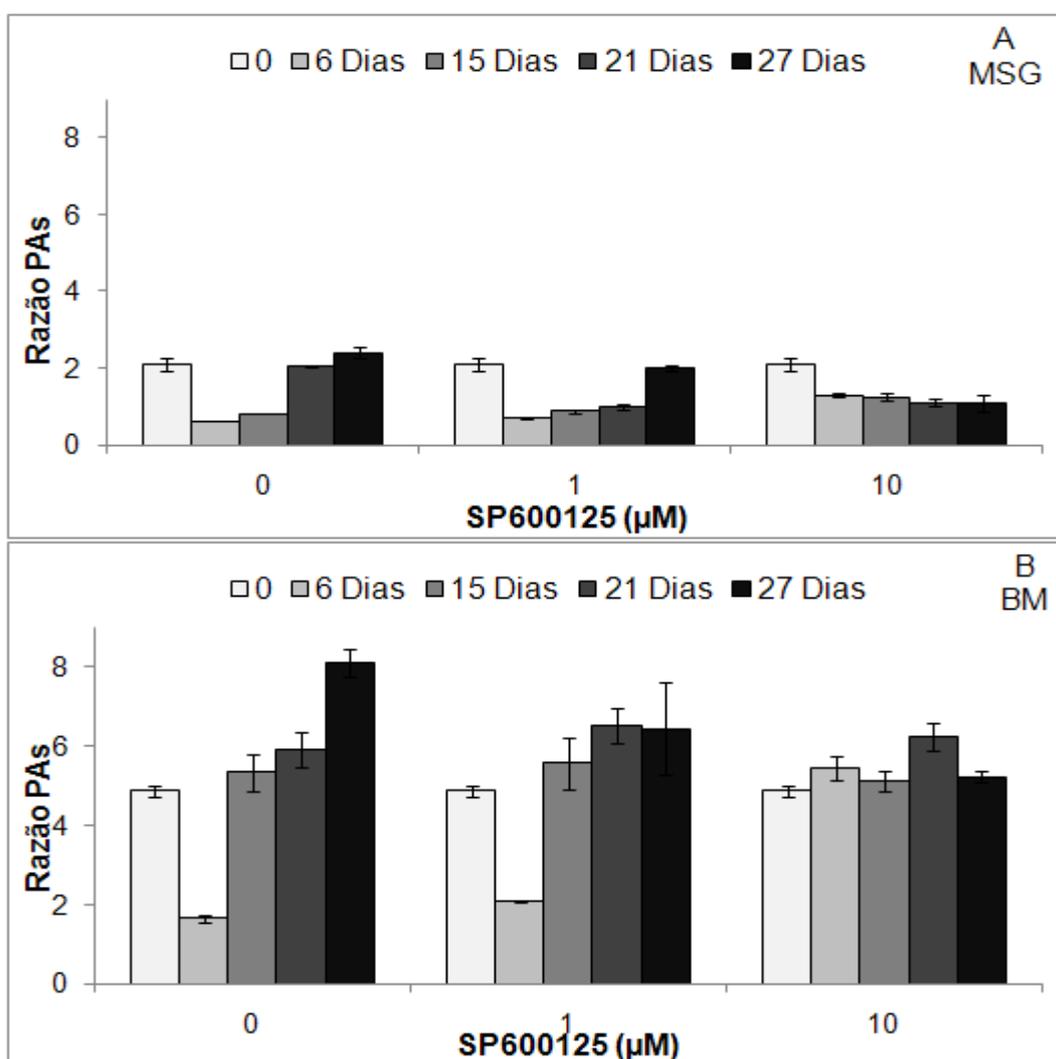


Figura 22. Razão entre as PAs [Put/(Spd+Spm)] em culturas celulares de *A. angustifolia* das linhagens MSG (A) e BM (B) incubadas com 0, 1 e 10 μM do inibidor SP600125 antes (0) e após 6, 15, 21 e 27 dias de incubação (Média \pm desvio padrão, n = 3).

Analisando-se o conteúdo das PAs presentes no meio de cultura da linhagem BM, verificou-se para o controle (Figura 21D) um aumento gradativo no conteúdo de Put a partir do 15º dia de incubação, no início da fase exponencial, sendo Put a PA predominante. Spd foi observada a partir do 6º dia, na fase lag, mantendo concentrações similares ao longo da incubação, enquanto Spm não foi verificada no meio de cultura.

Por outro lado, a presença do inibidor nas concentrações de 1 (Figura 20E) e 10 µM (Figura 20F) resultou na presença de Put e Spd a partir do 6º dia, na fase lag, aumentando o conteúdo até o final da incubação. Verificou-se que os valores foram similares para as duas concentrações, sendo que Put e Spd foram maiores no tratamento com 1 µM no 6º dia de incubação, sendo Put a PA observada em maior concentração no meio de cultura. Pode-se observar que a adição do inibidor reduziu o conteúdo de PAs no meio de cultura, não ocorrendo, provavelmente, a liberação destas PAs pelas células da linhagem BM para o meio de incubação.

A razão entre as PAs Put/(Spd+Spm) não foi afetada significativamente através do tratamento com o inibidor para nenhuma das duas linhagens (Figura 22), observando-se que para cada linhagem, MSG ou BM, a razão entre as PAs apresentou valores semelhantes tanto para o controle quanto para as duas concentrações do inibidor utilizadas.

Porém, quando comparadas as linhagens entre si verificou-se que a razão entre as PAs na linhagem BM (Figura 22B) se manteve superior a linhagem MSG (Figura 22A) ao longo do cultivo independente do tratamento.

6 DISCUSSÃO

Para as análises deste estudo foram utilizadas duas linhagens de culturas celulares de *A. angustifolia*, BM e MSG. De acordo com estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa e colaboradores, estas duas linhagens possuem potencial diferenciado para maturação. Andrade (2010) mostrou que, quando submetidas à maturação, a linhagem BM apresenta característica não-embriogênica, não ocorrendo a evolução das PEMs para estádios de desenvolvimento globular do embrião somático, enquanto a MSG apresenta potencial embriogênico.

A embriogênese somática em coníferas envolve a execução de uma sequência de eventos visando estimular o desenvolvimento de embriões somáticos em plantas, incluindo a indução de culturas celulares, multiplicação de PEMs, maturação dos embriões somáticos e germinação (Pullman *et al.*, 2003). Neste processo, as etapas de indução/multiplicação e maturação são cruciais neste processo. Na indução e multiplicação objetiva-se obter culturas que apresentem potencial embriogênico, o que para uma grande maioria de espécies depende da adição de compostos que promovem a divisão celular, como a auxina 2,4-D. Por outro lado, na maturação e germinação, a retirada do promotor da divisão celular (auxinas) e a transferência para meio de cultura com promotores de maturação levam a uma redução na divisão celular e uma diferenciação do embrião somático.

Em *A. angustifolia*, um dos obstáculos para a obtenção da embriogênese somática na produção de plantas é a diferença entre as linhagens celulares quanto ao grau de sucesso em desenvolver embriões somáticos. A regulação dos eventos de desenvolvimento da embriogênese podem ser elucidados ao nível metabólico utilizando estudos do perfil metabólico de compostos importantes (Hosp *et al.*, 2007), como carboidratos, PAs e NO. Em coníferas, diferentes capacidades de desenvolvimento da embriogênese somática entre as linhagens celulares de *Pinus taeda* foram explicados com o uso de modelo baseado em dados combinados do perfil metabólico, estado fisiológico e capacidade embriogênica das diferentes linhagens (Robinson *et al.*, 2009). Alguns estudos já demonstraram que linhagens celulares com diferenças no desenvolvimento de embriões somáticos apresentam secreção diferencial de proteínas durante o desenvolvimento de embriões, incluindo ainda a presença de proteínas arabinogalactanas (Egersdotter e Von Arnold, 1995; Samaj *et al.*, 2009), carboidratos, aminoácidos e outros metabólitos (Businge *et al.*, 2012).

Neste sentido, a comparação entre as linhagens celulares associadas ao controle do ciclo celular pode ser utilizada em estudos fundamentais sobre o metabolismo que regula o desenvolvimento dos embriões somáticos nesta espécie. Desta forma, no presente trabalho estudou-se como o controle do ciclo celular afeta o crescimento, morfologia e o conteúdo endógeno de PAs, NO e carboidratos em duas linhagens celulares de *A. angustifolia*, com diferentes capacidades para o desenvolvimento de embriogênese somática.

Verificou-se que o inibidor SP600125 na concentração de 10 μM inibiu o crescimento das culturas celulares de ambas as linhagens de *A. angustifolia*, enquanto a concentração de 1 μM não apresentou inibição do crescimento, com crescimento similar ao controle (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10). Estes resultados sugerem que a maior concentração atuou na inibição do ciclo de divisão celular, possivelmente, sobre homólogo da proteína Mps1, conforme demonstrado para AtMps1, em *A. thaliana* (De Oliveira *et al.*, 2012). Este inibidor atua na inibição da proteína Mps1 em animais (Chu *et al.*, 2008), competindo pelo sítio de ligação do ATP e desta forma impede a atividade quinase desta proteína (Chu *et al.*, 2008; De Oliveira *et al.*, 2012). Em plantas, foi descrita pela primeira vez o efeito deste inibidor sobre a inibição no crescimento de raízes em *A. thaliana* (De Oliveira *et al.*, 2012). Estes autores mostraram que este inibidor atua na inibição do crescimento de raízes, em concentrações 0,01, 0,1 e 5 μM , sendo que a concentração de 5 μM foi totalmente inibitória e concentrações entre 0,01 e 0,1 μM apresentaram efeito inibitório revertido com o tratamento das plantas utilizando Ácido Indol-3-acético (AIA). Estes autores sugerem que AtMps1 pode ser um regulador na sinalização de AIA para a formação de raízes secundárias em *A. thaliana*, e que Mps1 pode ser um componente universal da maquinaria de verificação da montagem do fuso mitótico entre linhagens distantes de eucariotos. Embora tenha sido descrito para espécies de angiosperma, esta proteína ainda não foi evidenciada em gimnosperma. O sistema de embriogênese somática em *A. angustifolia* já vem sendo utilizado como modelo para a elucidação de eventos ocorridos no desenvolvimento celular e pode ser utilizado para demonstrar o papel desta proteína neste processo morfogênético.

A inibição da atividade da Mps1 compromete a transição da fase G2 para a fase M do ciclo de divisão celular e impede sua finalização (Chu *et al.*, 2008; De Oliveira *et al.*, 2012). Embora, neste trabalho, tenham sido identificadas as fases da curva de crescimento por VCS das duas linhagens de *A. angustifolia*, não é conhecido em que fase do ciclo celular encontram-se as culturas celulares nestas diferentes fases da curva de crescimento. Neste sentido, a realização de estudos futuros visando conhecer as fases do ciclo celular nestas linhagens, nos diferentes tratamentos com o inibidor, é fundamental para entender como o inibidor está atuando nesta espécie.

A curva de crescimento por VCS é utilizada para analisar o crescimento em culturas em suspensão celular desta espécie (Silveira *et al.*, 2006; Osti *et al.*, 2010). O perfil de crescimento apresentado na análise por VCS para as duas linhagens no presente trabalho é semelhante ao obtido em meio LP por Astarita e Guerra (1998) e em meio BM por Silveira *et al.* (2006) e Osti *et al.* (2010), para *A. angustifolia*, identificando-se as diferentes fases da curva de crescimento para o controle e 1 μM do inibidor (Figura 6), enquanto para a maior concentração não houve crescimento das culturas, não tendo sido identificadas estas fases.

Além de interferir na evolução da curva de crescimento, verificou-se no presente estudo que a maior concentração do inibidor (10 μM) afetou a morfologia das culturas celulares em especial da linhagem MSG (Figura 11), apresentando PEMs menores comparativamente às concentrações controle e 1 μM . As PEMs de *A. angustifolia* apresentam dois tipos celulares: células embriogênicas que darão origem ao embrião propriamente dito, e células suspensores, com importante papel de fornecer nutrientes às células embriogênicas durante o desenvolvimento do embrião (Silveira *et al.*, 2006). Durante a maturação das culturas embriogênicas ocorre uma redução no número de células suspensores e a diferenciação do embrião somático a partir das células embriogênicas (Andrade, 2010). Em *Piceaglauca* foi verificado uma redução no número de células suspensores após quatro semanas de exposição com ABA (Businge *et al.*, 2012) e a eliminação destas células ocorre via morte celular programada (Bozhkov *et al.*, 2005). Neste sentido, pode-se sugerir que a maior concentração do inibidor na linhagem MSG resultou também em uma redução da morfologia das PEMs, que poderia simular o processo que ocorre durante a maturação de culturas embriogênicas, induzida por promotores como ABA, PEG e maltose.

Relacionando os resultados de crescimento por VCS e MF/MS, e morfologia celular das PEMs, observa-se diferenças entre estes parâmetros comparando-se as duas linhagens. PEMs de culturas celulares da linhagem BM são menores e apresentam maior crescimento que as células da linhagem MSG. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Andrade (2010), que também verificou estas características para as duas culturas celulares em *A. angustifolia*, sugerindo que estas diferenças estão associadas a capacidade

para desenvolver embriões somáticos, denominando assim linhagem MSG como embriogênica, enquanto a BM é não-embriogênica.

Vários compostos possuem papel fundamental durante o desenvolvimento da embriogênese somática, como carboidratos, NO e PAs. Estudos já foram realizados relacionando a fonte de carboidratos para a indução de culturas celulares (Lipavská e Konrádová, 2004) e nas fases do desenvolvimento dos embriões em meios de cultura de maturação para diversos sistemas vegetais como *Citrus Clementina* e *C. sinensis* (Kayim e Koc, 2006), *Acca sellowiana* (Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009), *Paspalum scorbiculatum* (Ceasar e Ignacimuthu, 2010). Em linhagens celulares com diferentes graus no potencial embriogênico de coníferas também foi descrito diferenças no nível metabólico de alguns compostos, incluindo carboidratos (Businge *et al.*, 2012). Entretanto, ainda não é conhecido o metabolismo endógeno destes carboidratos em linhagens celulares de *A. angustifolia* durante a multiplicação, bem como, quando submetidas à inibição da divisão celular. Analisou-se os níveis endógenos de carboidratos em ambas as linhagens celulares, MSG e BM, visando verificar o efeito do inibidor sobre o metabolismo destes compostos. Dentre os carboidratos analisados, identificou-se a presença de sacarose, frutose e glicose (Figuras 13, 14 e 15), cujo perfil foi afetado pelos tratamentos e pelas linhagens celulares.

O conteúdo de sacarose aumentou durante a fase lag (até o 6º dia) (Figura 13), sugerindo a incorporação deste carboidrato a partir do meio de cultura para as duas linhagens nos tratamentos controle e 1 µM do inibidor. Após o 6º dia de incubação, verificou-se uma redução no conteúdo deste carboidrato nas fases exponencial e estacionária de crescimento, mostrando que após ter sido incorporado, o mesmo foi utilizado para o metabolismo celular durante o crescimento das culturas celulares nestas linhagens. A sacarose, considerada o principal produto da fotossíntese, está envolvida em diversos eventos do desenvolvimento celular, sendo a melhor forma para a translocação de carbono e o principal substrato para o metabolismo (Farrar *et al.*, 2000). Adicionalmente, estudos tem mostrado que a sacarose possui também um importante papel na sinalização e regulação da embriogênese somática. Em *Abies cephalonica* a adição de sacarose ao meio de maturação aumentou em torno de 66% a taxa de conversão de células embriogênicas em

embriões somáticos (Krajnáková *et al.*, 2009). Além disso, este carboidrato pode atuar como fator de regulação da maturação de embriões somáticos de *Picea mariana* e *Picea glauca* através de sua ação como sinal para a síntese de proteínas de armazenamento (Iraqi e Tremblay, 2001). Em culturas celulares de *P. taeda*, a presença de sacarose endógena foi relacionada com a capacidade de desenvolvimento de embriões maduros normais (Robinson *et al.*, 2009). A sacarose também está envolvida em processos que controlam o ciclo celular, estudos com *A.thaliana* demonstraram que a presença deste carboidrato induz a expressão de ciclinas tipo D (CycD2 e CycD3) que atuam na fase G1/S do ciclo de divisão celular (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Neste sentido, pode-se supor que a incorporação de sacarose durante a fase lag é fundamental para sinalizar a indução da divisão celular na fase exponencial de crescimento, atuando possivelmente na transição da fase G1/S em culturas celulares de *A. angustifolia* mantidas no controle e 1 μ M. Verificou-se que a inibição da divisão celular no tratamento com 10 μ M de inibidor resultou num decréscimo acentuado nos níveis de sacarose para a linhagem MSG, enquanto para a linhagem BM, houve uma incorporação nos 6 primeiros dias, seguido de decréscimo (Figura 13). Este decréscimo no conteúdo de sacarose pode ter resultado no acúmulo de frutose e glicose (figuras 14 e 15), produtos da quebra da sacarose, neste tratamento para as duas linhagens estudadas de *A. angustifolia*. Nas plantas, frutose e glicose endógenas podem ser derivadas a partir da hidrólise da sacarose, o que ocorre em reações catalisadas pelas enzimas invertases como a β -fructofuranosidase ou sacarose sintase (Sturm, 1999). Em culturas celulares embriogênicas de *Picea mariana* foi constatado que o acúmulo de sacarose estimulou a ativação de enzimas invertases, tanto no interior das células quanto liberadas no meio de cultura, e conseqüentemente ocorreu um aumento nos conteúdos de frutose e glicose (Iraqi *et al.*, 2005). Em culturas celulares de *Taxus brevifolia* (Wickremesinhe e Arteca, 1994) e de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) (Fim, 2009). A hidrólise de sacarose também foi associada à disponibilidade de glicose e frutose. De modo geral, a glicose é apontada como um regulador chave em vários processos, incluindo o desenvolvimento de raiz e caule e crescimento da parte aérea, floração; respostas ao estresse e senescência (Moore *et al.*, 2003). Embora estas funções estejam descritas, sua participação na embriogênese

ainda não está esclarecida. Pouco se sabe sobre a atuação de outras hexoses, como por exemplo a frutose, no desenvolvimento vegetal. Estudos relataram que a presença de elevados níveis de frutose, antes da maturação de culturas embriogênicas, estão associados com a formação de embriões somáticos anormais em linhagens celulares que não apresentam competência para a embriogênese em *P. glauca* (Businge *et al.*, 2012).

No presente trabalho, os níveis de frutose (Figura 14) e glicose (Figura 15) apresentaram um perfil similar durante o período de incubação para os tratamentos controle e 1 μM do inibidor para as linhagens celulares utilizadas, com tendência em redução do conteúdo ao final da incubação. Em estudos utilizando culturas celulares de cana-de-açúcar foi observado que nas culturas celulares embriogênicas os conteúdos de frutose e glicose variam de forma semelhante entre si ao longo do cultivo (Fim, 2009). Um padrão similar foi também observado em análises realizadas com *Acca sellowiana* (Pescador *et al.*, 2008) e em sementes de *P. taeda* (Pullman e Buchanan, 2008). Em *A. sellowiana*, os autores observaram que na embriogênese somática os níveis de frutose e glicose diminuem similarmente ao longo da incubação. Em sementes de *P. taeda* foi demonstrado que apesar dos teores de glicose serem inferiores ao de frutose, a variação de seus conteúdos foram semelhantes. Entretanto, no presente trabalho o tratamento que inibiu o crescimento celular (10 μM) resultou num acréscimo do conteúdo destes carboidratos (frutose e glicose) durante a incubação, sendo mais acentuado para a linhagem BM. Este resultado sugere que a inibição da divisão celular pode resultar num acúmulo destes compostos, o qual pode ser devido ao baixo metabolismo destas células. Estudos mostram que estes açúcares podem ser armazenados quando não utilizados em processos metabólicos das células (Taber *et al.*, 1998; Lipavská e Konrádová, 2004). Além disso, o acúmulo observado em frutose e glicose nas linhagens celulares de *A. angustifolia* pode ser decorrente da degradação de sacarose por invertases (Iraqi *et al.*, 2005), cujas concentrações deste carboidrato foram menores no tratamento com 10 μM do inibidor comparativamente com o controle e 1 μM , em que se observou maior conteúdo de glicose e frutose (Figuras 13 a 15).

Comparando-se as duas linhagens, os maiores níveis de frutose e glicose observados nas células da linhagem MSG em relação à linhagem BM

podem estar relacionados ao potencial embriogênico da linhagem MSG. Este resultado está baseado nas observações de Nieves e colaboradores (2003). Estes autores demonstraram que, em calos embriogênicos de cana-de-açúcar (*Saccharum sp. var CP-5243*), o conteúdo de glicose e frutose era superior em relação aos calos não embriogênicos. O metabolismo de carboidratos em várias linhagens com diferença na competência para o desenvolvimento de embriões somáticos também foi analisado em *P. abies* (Businge *et al.*, 2012). Nesta espécie, a linhagem celular que originava o maior número de embriões normais, sendo assim classificada como competente para maturação, apresentava níveis superiores de sacarose endógena. Ao contrário, a formação de embriões anormais foi associada com altos níveis de frutose endógena durante diferenciação do embrião (Businge *et al.*, 2012).

Para elucidar melhor o metabolismo de carboidratos durante o controle do ciclo celular nas linhagens em estudo seria importante uma análise do conteúdo destes compostos no meio de cultura. Esta análise permitiria correlacionar a incorporação e ou degradação de compostos que possam ter ocorrido do meio de cultura e culturas celulares ao longo da incubação. Neste sentido, estudos futuros devem ser realizados para verificar o perfil de carboidratos no meio de cultura ao longo do cultivo nestes diferentes tratamentos, nas linhagens celulares estudadas.

O metabolismo de NO também tem sido correlacionado com vários processos morfogênicos, incluindo a embriogênese somática (Silveira *et al.*, 2006; Osti *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012) e o controle da divisão celular durante este processo (Otvos *et al.*, 2005). O NO é uma molécula bioativa que atua como um mensageiro intra e intercelular para induzir vários processos em plantas, incluindo a germinação, indução da morte celular e resposta a estresses bióticos e abióticos, bem como a regulação de estômatos e da fotossíntese (Kuznetsov *et al.*, 2006; Besson-Bard *et al.*, 2008). O NO também participa da regulação do ciclo de divisão celular, ele atua mediando a indução do gene da ciclina CYCD3;1 e a repressão do inibidor do gene da quinase dependente de ciclina (CDK) KRP2, no início da formação dos primórdios de raízes laterais em *Solanum lycopersicum* (Correa-Aragunde *et al.*, 2006). Em protoplastos de alfafa (*Medicago sativa*) foi demonstrado que o NO atua na ativação do ciclo celular aumentando a quantidade e a atividade de CDKs

associadas a transição G1/S do ciclo celular (Otvos *et al.*, 2005). No presente trabalho, verificou-se que o conteúdo endógeno de NO é afetado pela inibição do ciclo celular, sendo este efeito mais acentuado com a maior concentração do inibidor (10 μ M) (Figuras 16 e 17). Verificou-se uma redução no conteúdo de NO a partir do 6º dia comparativamente com os demais tratamentos. Esta redução nos níveis de NO pode ser responsável pelo não crescimento das culturas neste tratamento, uma vez que este composto é importante para a sinalização da divisão celular, promovendo o crescimento em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, conforme demonstrado por Osti *et al.* (2010). Estes autores mostraram que a adição de NO promove um maior crescimento das culturas, sugerindo que o NO pode estar associado na regulação do ciclo celular ativando a produção de ciclinas importantes para a progressão do ciclo celular, conforme demonstrado por Correa-Aragunde *et al.* (2006). Em estudos realizados com células de protoplastos de alfafa (*Medicago sativa*) foi observado que o NO estimula a ativação da divisão celular e a formação de células embriogênicas na presença de auxinas, confirmado pela expressão do gene SERK “Somatic Embryogenesis Receptor Kinase” um marcador da capacidade embriogênica nesta espécie (Osti *et al.*, 2010). Estes autores observaram que ao adicionar no meio de cultura um inibidor da síntese de NO, a entrada das células no ciclo de divisão foi bloqueada, porém não impedia a progressão do ciclo celular nas células que já haviam iniciado o processo, indicando assim que o NO é necessário para que as células entrem em divisão (Otvos *et al.*, 2005). Neste trabalho, a promoção, pelo uso de doador de NO, e inibição, pelo uso de inibidor da síntese de NO, da ativação do ciclo celular foi correlacionado com a quantidade e a atividade de quinases dependente de ciclina (CDK) associadas à transição G1/S do ciclo celular. O efeito inibitório do L-NMMA (L-NG-monomethyl-L-arginine) pode ser revertido pela aplicação de doador de NO, indicando que o decréscimo na atividade da CDK mediado pelo L-NMMA é dependente de NO.

Na linhagem MSG o conteúdo endógeno de NO apresentou um aumento a partir do 15º dia (fase exponencial) nas células embriogênicas e do suspensor (Figuras 16A e 17A). Este aumento pode estar relacionado com a indução da divisão celular que ocorre na fase exponencial de crescimento nesta linhagem. Esta hipótese está baseada em estudos anteriores realizados

com esta espécie, onde foi demonstrado que o NO atua como um sinal para o crescimento em culturas celulares de *A. angustifolia* mantidas em suspensão (Osti *et al.*, 2010). Estes autores verificaram que a adição de doadores de NO ao meio de cultura promoveu um acréscimo no crescimento das culturas, observando maior crescimento no final da fase exponencial, sugerindo um estímulo da divisão celular.

Foi observado, no presente trabalho, para ambas as linhagens, um maior conteúdo de NO nas células embriogênicas comparativamente as do suspensor. Este resultado está de acordo com o observado para esta espécie em estudos anteriores (Silveira *et al.*, 2006; Osti *et al.*, 2010). Estes autores sugerem que a presença de NO pode ser responsável pela manutenção da polaridade das PEMs para a formação do embrião em *A. angustifolia*.

Comparando o conteúdo de NO entre as linhagens podemos perceber que a linhagem MSG apresenta o conteúdo de NO muito superior aqueles apresentados pela linhagem BM em todas as fases do crescimento, este fato pode indicar que a capacidade de multiplicação relacionada ao NO pode influenciar a competência das culturas celulares em *A. angustifolia*. A quantidade de NO em culturas embriogênicas desta espécie foi associado ao metabolismo de PAs (Silveira *et al.*, 2006). Estes autores verificaram que a adição de Spd e Spm ao meio de cultura diminuem o conteúdo de NO, enquanto a Put aumenta o conteúdo de NO intracelular, e conseqüentemente, estimula o crescimento das culturas embriogênicas em *A. angustifolia*.

As PAs são compostos alifáticos de baixo peso molecular, carregados positivamente, facilitando a sua interação com macromoléculas como DNA e RNA, fosfolipídios, componentes da parede celular e proteínas (Baron e Stasolla, 2008). Apesar de serem encontradas nas células vegetais em níveis mais elevados do que os hormônios, atualmente as PAs são consideradas como tipos de reguladores de crescimento ou mensageiros secundários em vários processos, incluindo formação de raízes (Watson *et al.*, 1998), iniciação floral (Panicot *et al.*, 2002), senescência (Bais e Ravishankar 2002), respostas aos estresses abióticos e bióticos (Kuznetsov *et al.*, 2006), assim como no controle da divisão celular (Maki *et al.*, 1991), no metabolismo de NO (Silveira *et al.*, 2006) e na embriogênese somática (Silveira *et al.*, 2006; Santa-Catarina *et al.*, 2007).

A concentração total e as razões entre PAs individuais variam dependendo da espécie, órgão e tecido vegetal e, também, do estágio de desenvolvimento (Kuznetsov *et al.*, 2006). No presente trabalho a PA predominante para as duas linhagens em todos os tratamentos foi a Put, seguida de Spd e Spm (Figuras 18 e 19). Em estudos realizados com culturas celulares desta espécie também foi verificado o mesmo padrão quando as PAs foram comparadas (Silveira *et al.*, 2006; Steiner *et al.*, 2007), e este padrão favorece a divisão celular nesta espécie sendo característico durante a etapa de multiplicação (Steiner *et al.*, 2005). Estes estudos sugerem o importante papel da Put para a ativação da divisão celular, estimulando o crescimento das culturas celulares em *A. angustifolia*, enquanto as PAs Spd e Spm estariam relacionadas com a diferenciação celular e maturação das PEMs (Silveira *et al.*, 2006).

A Put também foi relacionada com a progressão do ciclo celular em estudos com *Catharantus roseus* (Maki *et al.*, 1991). Estes autores mostraram, com o uso de inibidores da biossíntese de Put, que a proliferação celular foi interrompida e as células se encontraram estacionadas na transição da fase G1/S. Os autores ainda sugeriram a possibilidade de que a Put atue também na transição entre as fases G2/M, indicando que esta PA pode desempenhar papéis mais importantes na ativação e progressão do ciclo celular comparativamente às outras PAs. Nos resultados obtidos no presente estudo foi verificado para ambas as linhagens nos tratamentos com 0 e 1 μM do inibidor um aumento no conteúdo de Put durante as fases exponenciais, enquanto os níveis de Spd e Spm permaneceram constantes ao longo da incubação (Figuras 19 e 20). Este resultado sugere a atuação da Put na divisão das culturas celulares em *A. angustifolia*, promovendo a transição das fases do ciclo celular. Em contrapartida, nas culturas celulares com 10 μM do inibidor ocorreu um decréscimo no conteúdo de todas as PAs (Figuras 19 e 20) associado ao decréscimo do crescimento em destas culturas (Figuras 6, 7 e 8). A diminuição acentuada e contínua das PAs, principalmente da Put, pode estar associada ao fato das culturas celulares com maiores concentrações do inibidor não apresentarem divisão celular, não ocorrendo o estímulo da ativação e progressão do ciclo celular devido a ausência de Put neste tratamento.

Vários estudos mostram que a razão de PAs [Put/(Spd+Spm)] parece ser mais importante para a competência embriogênica do que os seus níveis absolutos (Shoeb *et al.*, 2001). Verificou-se no presente estudo que as diferentes concentrações do inibidor não alteraram a razão entre as PAs, cujos valores foram similares entre os tratamentos dentro de cada linhagem celular em *A. angustifolia* (Figura 21). Entretanto, comparando esta razão entre as duas linhagens utilizadas (MSG e BM), verificou-se que esta razão é maior nas células da linhagem BM (não embriogênica) quando comparada com a linhagem MSG (com capacidade embriogênica). Este resultado está de acordo com os encontrados em culturas de cana-de-açúcar em que, as culturas embriogênicas possuem uma razão menor entre estas PAs do que as culturas não embriogênicas (Macedo, 2010). O autor relaciona a incapacidade de reduzir o conteúdo de Put com a perda da competência na fase de maturação das culturas (Macedo, 2010). Quando comparado o conteúdo de PAs totais (Figura 18) entre as linhagens, observou-se para todos os tratamentos conteúdos superiores na linhagem BM comparativamente à linhagem MSG. Adicionalmente, este resultado associado ao maior conteúdo de Put (Figura 19) na linhagem BM pode ter resultado no maior crescimento das células nesta linhagem comparativamente à linhagem MSG (Figura 6). Em estudos realizados em culturas de calos de cana-de-açúcar, os níveis de PAs totais foi superior em culturas não embriogênicas comparativamente às embriogênicas (Fim, 2012). As PAs, além de estarem presentes na forma livre, podem se conjugar com pequenas moléculas tais como ácidos cinâmicos e compostos fenólicos (Bouchereau *et al.*, 1999; Kuznetsov *et al.*, 2006). Trabalhos indicam que a presença e a interconversão de formas livres e conjugadas de PAs contribuem para o desenvolvimento e crescimento do vegetal (Biondi *et al.*, 2001). No presente trabalho foi possível analisar o conteúdo e o tipo das PAs presentes no meio de cultura ao longo da incubação nos diferentes tratamentos (Figuras 19 e 20), verificando-se que ocorre uma liberação de PAs das células para o meio de incubação. Esta liberação aumenta no final da incubação para os tratamentos da linhagem MSG ou mantém níveis similares como na linhagem BM, verificando-se em alguns casos que os níveis de PAs liberadas no meio de cultura foi superior aos encontrados no interior das células (Figuras 19D, 19F e 20E). Estes resultados sugerem uma regulação nos níveis de PAs

livres pela liberação destas ou pela sua conjugação reversível com os ácidos fenólicos e ligações covalentes com macromoléculas (Bais e Ravishankar, 2002; Kuznetsov *et al.*, 2006), e podem auxiliar na modulação do crescimento das culturas celulares nas diferentes linhagens em *A. angustifolia*. No entanto, a função da conjugação de PAs na embriogênese somática ainda não está esclarecida, e o seu conteúdo não foi analisado no presente estudo.

No presente estudo foi possível observar que o inibidor SP600125 atua na inibição da divisão celular em concentrações superiores a 10 μM , modulando o crescimento, morfologia e conteúdo endógeno de PAs, carboidratos e NO em linhagens celulares de *A. angustifolia*. Estes estudos forneceram resultados inéditos e importantes sobre o metabolismo destes compostos durante o controle do ciclo celular em culturas celulares com diferentes potenciais para a embriogênese somática, que poderá ser utilizado para melhor entender as fases de multiplicação e maturação das culturas embriogênicas em *A. angustifolia* e outras espécies de interesse.

7 CONCLUSÕES

❖ No presente estudo pode-se concluir que o composto SP600125 na concentração de 10 μ M inibiu a divisão celular, reduzindo o crescimento e a multiplicação das culturas celulares das linhagens BM e MSG mantidas em suspensão, comparativamente ao controle e 1 μ M.

❖ Nas células tratadas com 1 μ M do inibidor não foi possível afirmar se houve a inibição da evolução do ciclo celular, uma vez que o crescimento celular e o perfil de metabólitos analisados foi similar ao controle.

❖ Com a utilização da maior concentração do inibidor (10 μ M) as culturas apresentaram redução no tamanho das células embriogênicas, principalmente na linhagem MSG.

❖ A inibição da divisão celular afetou o metabolismo de carboidratos, PAs e NO nestas linhagens celulares, reduzindo o conteúdo destes compostos.

❖ Comparando-se as duas linhagens celulares, verificou-se diferenças no perfil de metabólitos analisados, no qual a linhagem BM apresentou teores de frutose, glicose e NO inferiores aos encontrados para linhagem MSG, assim como também podemos observar que as células das culturas não embriogênicas possuem tamanho inferior quando comparadas com as células embriogênicas. Por outro lado, o conteúdo de PAs livres endógenas e a razão (Put/Spd+Spm) observados na linhagem BM, não embriogênica, foi superior aos da linhagem embriogênicas (MSG).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2010. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed P. 1053-1114.
- Alcazar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., Tiburcio, A. F. (2010) Polyamines: molecules with functions in plant abiotic stress tolerance. *Plant*, 231: 1237-1249.
- Ambrose, J.C., Li, W.X., Marcus, A., Ma, H., Richard, C. 2005. A minus-end directed kinesin with plus-end tracking protein activity is involved in spindle morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 16:1584–1592.
- Andrade, J.B.R. 2010. Efeito dos agentes de maturação, ABA, PEG e maltose na produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 74p.
- Aquila, M.E.A., Ferreira, A.G. 1984. Germinação de sementes escarificadas de *Araucaria angustifolia* em solo. *Ciência e Cultura*, 36(9):1583-1589.
- Astarita, L.V. 2000. Aspectos bioquímicos e fisiológicos da embriogênese e de culturas celulares embriogênicas de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 112p.
- Astarita, L.V., Guerra, M.P. 1998. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. Induction and maintenance of embryonal-suspensor masses cultures. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 10:113- 118.
- Attree, S.M., Fowke, L.C. Embryogenic of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35:1-35, 1993.
- Attree, S.M., Pomeroy, M.K., Fowke, L.C. 1992. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. *Planta*, 187:395-404
- Bais, H.P., Ravishankar, G.A. 2002. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 69:1–34.
- Balbuena, T.S. 2009. Proteômica do desenvolvimento da semente de *Araucária angustifolia*. Tese de Doutorado, Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 102p.
- Baron, K., Stasolla, C. 2008. The role of polyamines during in vivo and in vitro development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 44:384-395.
- Basso C.M.G. 2010. A Araucária e a paisagem do planalto sul brasileiro. *Revista de Direito Público*, 5 (2):1-11.
- Baud, S., Boutin, J.P., Miquel, M., Lepiniec, L. E Rochat, C. 2002. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:151-160.
- Becwar, M.R. 1989. Maturation, germination, and conversion of norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. *In vitro celular & Developmental Biology – Pant*, 25(6):575-580.

- Benedito, V.A., Mourão Filho, F.A.A., Januzzi, B.M. 2000. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. *Scientia Agricola*, 57:33-38.
- Bennet, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S. , Xu, W. Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A. M., Anderson, D.W. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:13681–13686.
- Besson-Bard, A., Pugin, P., Wendehenne, D. 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 59:21–39.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., Jones, R.L. 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16:332–341.
- Biondi, S., Scaramagli, S., Capitani, F., Altamura, M.M., Torrigiani, P. 2001. Methyljasmonate Upregulates Biosynthetic Gene Expression, Oxidation and Conjugation of Polyamines and Inhibits Shoot Formation in *Tobacco* Thin Layers. *Journal of Experimental Botany*, 52:231–242.
- Biranova, P., Dolezel, J., Draber, P., Heberle-Bors, E., Strnad, M., Bögre, L. 1998. Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinase leads to abnormal spindle formation. *Plant Journal*, 16:697-707.
- Bouchereau, A., Aziz, F., Larher, J., Martin-Tanguy. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent developments. *Plant Science*, 140:103–125.
- Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., Suarez, M.F. 2005. Programmed cell death in plant embryogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 67:135–179.
- BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Diário Oficial da União, Brasília, p.870-872 (Portaria IBAMA 06-N).
- BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 1996. Disposição sobre exportação de produtos da flora. (Portaria IBAMA 83-N).
- Bruni, E., Leopold, A.C. 1992. Pool of water in anhydrobiotic organism: a thermally stimulated depolarization current study. *Biophysical Journal* 63:663-672.
- Businge, E., Brackmann, K., Moritz, T., Egertsdotter, U. 2012. Metabolite profiling reveals clear metabolic changes during somatic embryo development of Norway spruce (*Picea abies*). *Tree Physiology* 32: 232–244.
- Cairney J., Pullman GS. 2007. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New Phytologist*, 176: 511-536.
- Cangahuala-Inocente, G.C., Steiner, N., Maldonado, S., Guerra, M.P. 2009 . Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(3): 217-224.

- Carrier, D.J., Kendall, E.J., Bock, C.A., Cunningham, J.E., Dunstan, D.I. 1999. Water content, lipid deposition, and (+)- abscisic acid content in developing white spruce seeds. *Journal of Experimental Botany*, 50:1359-1364.
- Carvalho, P.E.R. 1994. Espécies florestais brasileira: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília: EMBRAPA-SPI, 640 p.
- Castro, L.M., Filho, F.A.A.M., Mendes, B.M.J., Miyata, L.Y. 2010. Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. *Ciência Rural*, 40 (8):1831-1834.
- Ceasar, S.A., Ignacimuthu, S. 2010. Effects of cytokinins, carbohydrates and amino acids on induction and maturation of somatic embryos in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum* Linn.). *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 102:153-162.
- Chanprame, S., Kuo, T.M., Widholm, J.M. 1998. Soluble carbohydrate content of soybean (*Glycine max* (L.)Merr.: somatic and zygotic embryos during development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 34:64-68.
- Chen, C.B., Adam, M., Li, W.X., Hu, Y., Vielle-Calzada, J.P. 2002. The Arabidopsis ATK1 gene is required for spindle morphogenesis in male meiosis. *Development*, 129:2401–2409.
- Chu, M.L., Chavas, L.M., Douglas, K.T., Evers, P.A., Taberero, L. 2008. Crystal structure of the catalytic domain of the mitotic checkpoint kinase Mps1 in complex with SP600125. *The Journal of Biological Chemistry*, 283:21495–21500.
- Cohen, J.D., Bandurski, R.S. 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology*, 33:403-430.
- Compton, D.A. 2000. Spindle assembly in animal cells. *Annual Review of Biochemistry*, 69:95–114.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Chevalier, c., Lamattina, L. 2006. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 57:581-588.
- Crawford, N.M. 2006. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plant. *Journal of Experimental Botany*, 57:471-478.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review of Plant Physiology* 54:597-599.
- Dawe, R.K. 1998. Meiotic chromosome organization and segregation in plants. *The Annual Review of Plant Biology*, 49:371–395.
- De Oliveira, E.A.G., Romeiro, N.C., Ribeiro, E.S., Santa-Catarina, C., Oliveira, A.E.A.,Silveira, V., Filho, G.A.S., Venancio, T.M., Cruz, M.A.L. 2012. Structural and Functional Characterization of the Protein Kinase Mps1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One*, 7(9):45707
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394:585-588.
- Dewitte, W., Murray, J.A.H. 2003. The plant cell cycle. *The Annual Review of Plant Biology*, 54:235-264.
- Dos Santos, A.L.W., Silveira, V., Steiner, N., Vidor, M., Guerra, M.P. 2002. Somatic embryogenesis in Parana pine (*Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45:97-106.

- Durner, J., Wendehenne, D., Klessing, D. F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 95:10328-10333.
- Egersdotter, U., Von Arnold, S. 1995. Importance of arabinogalactan-proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Physiology*, 93:334–345
- Espindola, L.E., Noin, M., Corbineau, F., Côme, D. 1994. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. *Seed Science Research*, 4:193-201.
- Eveland, A.L., Jackson, D.P. 2012. Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 63 (9): 3367-3377.
- Farrant, J.M., Pammenter, N.W., Berjak, P. 1989. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds - a study on three unrelated species. *Planta*, 178:189-198.
- Farrar, J., Pollock, C., Gallagher, J. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science*. 154:1–11.
- Fernandez, J.H. 2002. Identificação de caracterização de proteínas e genes expresso diferencialmente durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *Araucaria angustifolia* . Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. p.91.
- Filson, P.B., Dawson-Andoh, B.E. 2009. Characterization of sugar from model and enzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detection. *Bioresource Technology*, 100(24):6661-6664.
- Fim, L.G. 2009. Metabolismo de proteínas, aminoácidos e carboidratos associados com a maturação de culturas embriogênicas decana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Do Norte Fluminense – Rio de Janeiro. 85p.
- Fisk, H.A., Winey, M. 2004. Spindle regulation: Mps1 flies into new areas. *Current Biology - Cell*, 14:1058–1060.
- Flinn, B.S., Roberts, D.R., Newton, C.H., Cyr, D.R., Webster, F.B., Taylor, I.E.P. 1993. Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum*, 89:719-730.
- FAO (Food And Agriculture Organization). 1986. *Databook on endangered tree and shrub species and provenances*. Rome: 524p.
- Geigenberger, P., Stitt, M., Fernie, A.R. 2004. Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. *Plant Cell & Environment*, 27:655-673.
- George, E.F., Hall M.A., De Klerk G-J. 2008. Plant propagation by tissue culture. 3^o ed. Dordrecht: Springer, 501p.
- Gibson, S.I. 2003. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signaling network. *Journal of Experimental Botany*, 55:253-264.
- Gifford, E.M., Foster, A.S. 1989. Morphology and Evolution of Vascular Plants. *New York*, N Y W.H. Freeman and Company.
- Guerra, M. P., Silveira, V., Reis, M. S. dos., Schneider, L. 2002. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: Simões, L.

- L. & Lino, C. F. (Orgs). *Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais*. Editora Senac, São Paulo, SP, Brasil, p.85-101.
- Guerra, M. P., Silveira, V., Santos, A. L. W., Astarita, L. V., Nodari, R.O. 2000. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In-Somatic embryogenesis in woody plants, eds. S. Jain, P. Gupta & R. Newton. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, 6:457-478.
- Guerra, M.P., Steiner, N., Mantovani, A., Nodari, R.O., Dos Reis, M.S., Dos Santos, K. L. 2008. Araucária. In: Barbieri RL, Stumpf ERT (Ed.). *Origem e Evolução de Plantas Cultivadas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Araucária; 149-184.
- Gupta, K.J., Fernie A.R., Kaiser, W.M. e Dogen J.T. 2011. On the orining of nitric oxide. *Trends in Plant Science*, 16(3):160-168.
- Gupta, P.K., Pullman, G.S. 1981. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. US patent 5 036-007.
- Haines, R.J., Prakash, N. 1980. Proembryo development and suspensor elongation in *Araucária juss*. *Australian Journal of Botany*, 28:511-522.
- Hosp, J., Tashpulatov, A., Roessner, U. 2007. Transcriptional and metabolic profiles of stress-induced embryogenic tobacco microspores. *Plant Molecular Biology*, 63:137–149.
- Inze, D., De Veylder, L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, 40:77–105.
- Iraqi, D., Le, V.Q., Lamhamedi, M.S., Tremblay, F.M. 2005. Sucrose utilization during somatic embryodevelopment in black spruce: involvement of apoplasmic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the médium. *Journal of Plant Physiology*, 162:115-124.
- Iraqi, D., Tremblay, F.M. 2001. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugar and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany*, 52:2301-2311.
- IUCN, 2012. Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acessado em: 21 de Outubro de 2012.
- Jasperson, S.L., Winey, M. 2004. The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20:1–28.
- Jelluma, N., A.B. Brenkman, N.J. van den Broek, C.W. Cruijssen, M.H. van Osch, S.M. Lens, R.H. Medema, G.J. Kops. 2008. Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell*, 132:233–246.
- Kayim, M. N., Koc, K. 2006. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. *Scientia Horticulturae*, 109:29-34.
- Koch, Z.; Corrêa, M. S. 2002. Araucária: A floresta do Brasil meridional. Curitiba: Olhar Brasileiro. 148 p.
- Krajnáková, J., Häggman, H., Gömöry, D. 2009. Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and

- regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 96:251–262
- Kumar, A., Altabella, T., Taylor, M., Tiburcio, A.F. 1997. Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Science*, 2:124–130.
- Kuznetsov, V.I., N.L. Radyukina, N.I. Shevyakova, 2006. Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53:583-604.
- Lan, W., Cleveland, D.W. 2010. A chemical tool box defines mitotic and interphase roles for Mps1 kinase. *The Journal of Cell Biology*, 190, 21–24.
- Langhansova, L., Konradova, H., Vanek, T. 2004. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. *Plant Cell*, 22:725–730
- Lehninger, D.N., Cox, M.M. 2011. *Princípios de Bioquímica*. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 1274p.
- Leite, P.F., Klein, R.M. 1990. Vegetação. In: IBGE. Geografia do Brasil: Região Sul. Rio de Janeiro, p.113-150.
- Lipavská, H., Svobodová, H., Albrechtová, J. 2000. Annual dynamics of the content of non-structural saccharides in the context of structural development of vegetative buds of Norway spruce. *Journal of Plant Physiology*, 157:365-373.
- Lipavská, H.; Konrádová, H. 2004. Invited review: somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40: 23-30.
- Liu X, Winey M. 2012. The mps1 family of protein kinases. *Annual review of Biochemistry*, 81: 561–585.
- Longhi, S.J. A estrutura de uma floresta natural de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., no sul do Brasil. 1980. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 198 p.
- Lou, H., Obaraokeyo, P., Tamaki, M., Kako, S. 1996. Influence of sucrose concentration on in vitro morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explants. *Journal of Horticultural Science*, 71:497-502.
- Lux, D., Leonardi, S., Muller, J., Wiemken, A., Fluckiger, W. 1997. Effects of ambient ozone concentrations on contents of non-structural carbohydrates in young *Picea abies* and *Fagus sylvatica*. *New Phytologist*, 137:399–409.
- Macedo, A.F. 2010. Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 91p.
- Maki, H., Satoshi, A., Hiroaki, K. 1991. Polyamines and the Cell Cycle of *Catharanthus roseus* Cells in Culture. *Plant Physiology*, 96:1008-1013.
- Marcus, A.I., Li, W., Ma, H., Cyr, R.J. 2003. A kinesin mutant with an atypical bipolar spindle undergoes normal mitosis. *Molecular Biology of the Cell*, 14:1717–1726.
- Mengarda, L.H.G., Pescador, R., Chu, E.P., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2009. Efeito do frio sobre os carboidratos solúveis em culturas embriogênicas de *Acca sellowiana* O. Berg (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 32(20):307-317.

- Merkle, S.A., Dean, J.F.D. 2000. Forest tree technology. *Current Opinion In Biotechnology*, 11:298- 302.
- Minocha, R., Minocha, S.C., Long, S. 2004. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens Sarg.*), *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 40:572–580.
- Mironov, V.V., De Veylder, L., Van Montagu, M., Inze, D. 1999. Cyclin dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *Plant Cell*, 11:509–522.
- Moore TC, Lachmann PJ. 1982. Cyclic AMP reduces and cyclic GMP increases the traffic of lymphocytes through peripheral lymph nodes of sheep in vivo. *Immunology*, 47(3):423–428.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T., Sheen, J. 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300:332–336.
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF. 2010. NO synthesis and signaling in plants: where do we stand? *Physiol Plant*, 138:372–383.
- Narita, I. Y. TS. 2010. Análise do óxido nítrico produzido durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro. São paulo. Dissertação de mestrado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo p.91.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Wilson I. 2008. Nitric oxide evolution and perception. *Journal of Experimental Botany*, 59 (1):25–35.
- Nieves, N., Segura-Nieto, M., Blanco, M.A., Sanchez, M., González, A., González, J.L., Castillo, R. 2003. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*; 39:343-345.
- Ntima, O.O. 1968. The Araucárias. *Fast growing timber tees of the lowland tropics*, n.3. Oxford: Common wealth Forestry Institute, 139 p.
- Nutto, L. 2001. Management of diameter growth of the individual tree of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Ciência Florestal*, 11(2):9-25.
- Osti, R.Z., Andrade, J.B.R., Souza, J.P., Silveira, V., Balbuena, T.S., Guerra, M.P., Franco, D.W., Floh, E.I.S., Santa-Catarina, C. 2010. Nitrosyl thylenediaminetetra-acetate ruthenium(II) complex promotes cellular growth and could be used as nitric oxide donor in plants. *Plant Science*, 178:448-453.
- Otvos, K., Pasternak, T.P., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorjgotov, D., Szücs, A., Bottka, S., Dudits, D., Fehér, A. 2005. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell culturas. *The Plant Journal*, 43: 849-860.
- Panicot, M., Minguet, E.G., Ferrando, A., Alcázar, R., Blázquez, M.A., Carbonell, J., Altabella, T., Koncz, C., Tiburcio, A.F. 2002. A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 14:2539–2551.
- Panza, V., Lainez, V., Maroder, H., Prego, I., Maldonado, S. 2002. Storage reserves and cellular water in nature seeds of *Araucaria angustifolia* . *Botanical Journal of the Linnean Society*, 149:273-281.

- Park, Y.S., Barret, D.J., Bonga, J.M. 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 34:231-239.
- Perez, R.M., Galinan, A.M., Navarro, L., Duran-Vila, N. 1998. Embryogenesis in vitro of several citrus species and cultivars. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73:796-802.
- Pescador, R., Kerbauy, G.B., Kraus, J.E., Ferreira, W.M., Guerra, M.P., Figueiredo- Ribeiro, R.C.L. 2008. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 44:289-299.
- Planchais, S., Glab, N., Inze, D., Bergounioux, C. 2000. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *Febs Letters* 476: 78–83.
- Planchet, E., Kaiser, W.M. 2006. Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *Journal of Experimental Botany*, 57:3043–3055
- Pullman, G.S., Buchanan, M. 2008 Identification and quantitative analysis of stage-specific carbohydrates in loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo and female gametophyte tissues. *Tree Physiology*, 28:985–996.
- Pullman, G.S., Montello, P., Cairney, J., Xu, N., Feng, X. 2003. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. *Plant Science*, 164:955–969.
- Rai, M.K., Shekhawat, N.S. Harish, Gupta, A. K., Phulwaria, M., Ram, k., Jaiswal, U. 2011. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 106:179–190
- Reitz, R.; Klein, R. M.; Reis, A. 1988. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento, 525 p.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M.S., Murray, J.A.H. 2000. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 20:4513–452.
- Robinson, A.R., Dauwe, R., Ukrainetz, N.K., Cullis, I.F., White, R., Mansfield, S.D. 2009. Predicting the regenerative capacity of conifer somatic embryogenic cultures by metabolomics. *Plant Biotechnology Journal*, 7:952–963.
- Rumer, S., Gupta, K.J., Kaiser, W.M. 2009. Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. *Journal of Experimental Botany*, 60:2065–2072
- Samaj, J., Salaj, T., Matúsová, R., Salaj, J., Taká, T., Samajová, O., Volkmann, D. 2008. Arabinogalactan-protein epitope Gal4 is differentially regulated and localized in cell lines of hybrid fir (*Abies alba* x *Abies cephalonica*) with different embryogenic and regeneration potential. *Plant Cell Reports*. 27: 221-229.
- Santa-Catarina, C.; Silveira, V.; Scherer, G.F.E.; Floh, E.I.S. 2007. Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 90(1):93-101.

- Santos, S.C., Costa, W.F., Ribeiro, J.P., Guimarães, D.O., Ferri, P.H., Ferreira, H.D., Seraphin, J.C; 2002. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*, 73: 292-299.
- Schmidt, M., Budirahardja, Y., Klompmaker, R., Medema, R.H. 2005. Ablation of the spindle assembly checkpoint by a compound targeting Mps1. *EMBO Reports*, 6:866–72
- Shoeb, F., Yadav, J.S., Bajaj, S., Rajam, M.V. 2001. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism indifferent genotypes of *Indica rice*. *Plant Science*, 160:1229–1235.
- Silveira, V., Santa-Catarina, C., Tun, N.N., Scherer, G.F.E., Handro, W., Guerra, M.P., Floh, E.I.S. 2006. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. *Plant Science*, 171:91-98.
- Silveira V, Steiner N, Santos ALW, Nodari NO, Guerra MP. 2002. Biotechnology tools in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2(3): 463-470.
- Silveira, V., Floh, E.I.S., Handro, W., Guerra, M.P. 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 69:233-249.
- Solórzano Filho, J. A. 2001. Demografia, fenologia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae), numa população relictual em ampos do Jordão, SP. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Ecologia), Universidade de São Paulo. p. 154.
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E.C., Thorpe, T.A. 2002. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 38:93–105
- Stasolla, C., Yeung, E.C. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 74:15–35
- Steiner, N., Guerra, M.P. 2005. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante a embriogênese zigótica e somática em *Araucaria angustifolia*. M.Sc.dissertação, Departamento de Ciências de Plantas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, pp. 1–129.
- Steiner, N., Santa-Catarina, C., Andrade, J.B.R., Balbuena, T.S., Guerra, M.P., Handro, W., Floh, E.I.S., Silveira, V. 2008. *Araucaria angustifolia* Biotechnology - Review. *Plant Science and Biotechnology*, 2:20-28.
- Steiner, N., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Floh, E.I.S., Guerra, M.P. 2007. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 89:55-62.

- Stohr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W.R., Rockel, P. 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 12:835–41.
- Sturm, A., Tang, G.Q. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science*, 4:401–407.
- Taber, R.P., Zhang, C., Hu, W.S. 1998. Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. *Canadian Journal of Botany*, 76:863–71.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2009. *Fisiologia vegetal*. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed , 848p.
- Tautorus, T.E., Fowke, L.C., Dunstan, D.I. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany*, 69:1873-1899.
- Termignoni, R.R. 2005. Cultura de tecidos vegetais. UFRGS editora, 1:59.
- Tompsett, P. B. 1984. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. *Annals of Applied Biology*, 105:581-586.
- Treat, W. J., Engler, C. R., Soltes, E. J. 1989. Culture of photomixotropic soybean and pine in a modified fermentor using a novel impeller. *Biotechnology and Bioengineering*, 34:1191–1202.
- Tun, N.N., Santa-Catarina, C., Begum.T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E.I.S., Scherer, G. 2006. Polyamines induce rapid biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiology*, 47(3):346-354.
- Vantard, M., Cowling, R., Delichere, C. 2000. Cell cycle regulation of the microtubular cytoskeleton. *Plant Molecular Biology*, 43:691-703.
- Vieira, L.N., Santa-Catarina, C., de Freitas, F.H.P., Dos Santos, A.L., Steinmacher, D.A., Schlogl, P.S., Silveira, V., Steiner, N., Floh, E.I., Guerra, M.P. 2012. Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. *Plant Science*, 195:80-7.
- Voet, D., Voet, J., Patt, C. W. 2000. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: ArtMed, 931 p.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 69:233-249.
- Watson, M.B., Emory, K.K., Platak, R.M., Malmberg, R.L. Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibit altered root growth. *The Plant Journal*, 13:231–239;
- Weber, H., Borisjuk, L. E Wobus, U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science* 2:169-174.
- Whitmore, T. C. 1975. Tropical rain forest of the Ear East. *Oxford: Claredon Press*. England. 282p.
- Wickremesinha, E.R.M., Arteca, R.N. 1994. Taxus cell suspension cultures: optimizing growth and production of taxol. *Journal of Plant Physiology*, 144: 183-188.
- Yamasaki, H. 2005. The NO world for plants: achieving balance in an open system. *Plant Cell Environ.* 28:78–84.

- Yamasaki, H., Cohen, M.F. 2006. NO signal at the crossroads: polyamine-induce nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Science*, 11:522-524.
- Young, C.W. and Hodas, S. 1964. Hydroxyurea: inhibitory effect on DNA metabolism. *Science*. 146(3648):1172–1174.
- Zemojtel, T., Fröhlich, A., Palmieri, M.C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L.S., Wanker, E.E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P. 2006. Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Science*, 11:524–525.