

## Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese *in vitro*.

Floh, Eny Iochevet Segal<sup>1</sup>; Santa-Catarina, Claudete<sup>1</sup>; Silveira, Vanildo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL), Rua do Matão, 277, Butantã, Cx.P.: 11461, CEP: 05422-970. São Paulo-SP. email: enyfloh@usp.br; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia (LBT), Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

### INTRODUÇÃO

A morfogênese nas plantas é consequência da integração dos processos de divisão e diferenciação celular, os quais conduzem a uma estrutura organizada e característica (Handro & Floh, 1990). Tais processos são controlados por uma variedade de sinais internos ou do ambiente, tais como os hormônios e a luz, capazes de modificar o crescimento e o desenvolvimento. Os padrões mais comuns que ocorrem em tecidos cultivados *in vitro* são: a) a neoformação de raízes e gemas caulinares, vegetativas ou florais, através da organogênese, que pode ser ainda direta, ou indireta, a partir de um calo e; b) a formação de embriões somáticos através da embriogênese somática, que também pode ser direta ou indireta.

A embriogênese somática constitui um exemplo da expressão da totipotencialidade, postulada por Haberlandt em 1902, em que as células vegetais possuem a capacidade de regenerar indivíduos completos a partir de uma única célula. A sua utilização como técnica para propagação clonal tem sido tema de diferentes estudos e revisões (Santa-Catarina et al., 2001; Quiroz-Figueroa et al., 2006). Entretanto, a embriogênese constitui um modelo bastante interessante para estudos básicos de fisiologia, biologia celular, bioquímica, genética da diferenciação e morfogênese em vegetais. Estudos utilizando esta abordagem têm sido realizados em especial com abordagens morfológicas e cito-histológicas (Cangahuala-Inocente et al., 2004). Neste aspecto, deve-se destacar que as limitações impostas pela falta de estudos básicos sobre a ontogênese dos embriões zigóticos e embriogênese somática, nos seus aspectos fisiológicos e bioquímicos complementados com a caracterização molecular, torna frequentemente, os protocolos de cultivo *in vitro* bastante empíricos e pouco eficientes.

No presente trabalho serão discutidos alguns aspectos relacionados à utilização de marcadores moleculares estádio-específicos, como estratégia para o estudo dos processos da embriogênese zigótica e somática. Sua identificação e utilização permite uma melhor compreensão dos aspectos básicos destes processos de desenvolvimento, além de, propiciar a possibilidade de otimização de sistemas e protocolos de embriogênese somática para fins aplicados e biotecnológicos.

A embriogênese *in vitro* foi descrita pela primeira vez, independentemente, por Steward et al. (1958) e Reinert (1958) em cenoura. Embora existam relatos para inúmeras espécies, os seus avanços ainda são limitados pela falta da compreensão dos estímulos e condições necessárias para sua indução e controle. A embriogênese somática é um processo onde através da técnica de cultivo *in vitro*, células isoladas ou um pequeno grupo de células somáticas dão origem a embriões (Tautorus et al., 1991), numa seqüência morfogenética que se aproxima aos eventos representativos da embriogênese zigótica. Este processo pode ser dividido em quatro fases: 1) a *indução* em meios de culturas contendo auxinas (mais frequentes) e citocininas (menos frequentes); 2) *multiplicação* em meios contendo auxinas em baixas concentrações; 3) *maturação* em presença de ABA e/ou agentes osmóticos e; 4) *germinação* em meios de cultura isentos de fitoreguladores (Tautorus et al., 1991). As condições para promover a embriogênese somática estão relacionadas com a presença de reguladores de crescimento, estresses osmóticos, alterações de pH, choques térmicos e tratamentos com diferentes substâncias (Guerra et al., 1999) sendo as auxinas referenciadas como essenciais na indução do processo (Fehér et

al., 2002). Além das condições de cultivo, também devem ser considerados como fundamentais, o explante inicial, incluindo o seu genótipo, estágio de desenvolvimento e as condições fisiológicas, como por exemplo, o conteúdo hormonal endógeno do material (Jiménez, 2001). Portanto, o processo da embriogênese pode ser definido como um processo multifatorial e altamente complexo.

Similaridades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, entre os processos de embriogênese somática e embriogênese zigótica foram demonstradas para diferentes sistemas vegetais, incluindo gimnospermas e angiospermas. Uma melhor compreensão dos fatores associados à embriogênese zigótica pode ser buscada na interface entre os modelos de embriogênese somática e embriogênese zigótica. Ambos os processos apresentam os mesmos estádios de desenvolvimento pró-embriônicos e embriônicos incluindo: globular, cordiforme (em dicotiledôneas), torpedo, cotiledonar e maduro (Zimmerman, 1993). As estruturas internas do embrião somático globular e cordiforme são semelhantes aos equivalentes zigóticos. Assim, são evidentes no estágio globular a protoderme e a polaridade, e no estágio cordiforme a simetria bilateral (Guerra et al., 1999). Em *Pinus taeda*, Pullman et al. (2003) demonstraram que além das semelhanças morfológicas, similaridades estão presentes no padrão de aminoácidos nos diferentes estádios da embriogênese. Mais recentemente, Winkelmann et al. (2006) utilizando *Cyclamen persicum*, através de análises proteômicas comparativas, demonstraram similaridades nos dois processos de desenvolvimento. As principais diferenças entre os embriões somáticos e zigóticos relacionam-se com o fato dos embriões somáticos se desenvolvem livres de correlações físicas, fisiológicas e genéticas, as quais ocorrem durante o desenvolvimento de um embrião zigótico (Zimmerman, 1993). Adicionalmente, as células embriogênicas, *in vitro*, são passíveis de manipulação pela grande maioria de técnicas celulares e moleculares, em contraste com as células gaméticas e o zigoto, que estão embebidos no tecido materno. Uma particularidade dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (Guerra et al., 1999).

## INDUÇÃO PARA A EMBRIOGÊNESE

Em condições *in vitro*, a embriogênese somática ocorre em explantes cujas células são determinadas, ou pré-embriogênicas, ou então, o processo se inicia com uma fase inicial onde células se desdiferenciam, tornam-se competentes, e são determinadas para a embriogênese. Estes processos envolvem mecanismos complexos de reativação celular, divisão e reprogramação do metabolismo e desenvolvimento (Fehér et al., 2003). O termo “células embriogênicas” frequentemente é utilizado para aquelas células que tenham completado a sua transição do estado somático para o estado embriogênico. Nesta situação nenhum outro estímulo, por exemplo, a aplicação de reguladores de crescimento, é necessária para a produção de embriões somáticos. Aquelas células em um estágio intermediário, ou seja, que necessitam de algum estímulo exógeno para tornarem-se embriogênicas são ditas como “competentes para a embriogênese” (Guerra et al., 1999).

Os processos moleculares que governam a competência e a indução para a embriogênese em células vegetais ainda não estão totalmente esclarecidos (Mordhost et al., 1997). Sem dúvida estes processos envolvem a reprogramação da expressão gênica, que resultam em alterações morfológicas, bioquímicas e metabólicas nas células. Trabalhos recentes têm sido realizados objetivando a obtenção de marcadores moleculares para a detecção e/ou promoção da competência embriogênica. A identificação e expressão destes genes marcadores são, na sua maioria, utilizados para a identificação populações celulares competentes para a embriogênese.

Um dos primeiros genes descritos como envolvidos na expressão da competência celular foi o “Somatic Embryogenesis Receptor Kinase” (*DcSERK*) (Schmidt et al., 1997), em cultura de tecidos de *Daucus carota*. A expressão do gene *SERK* tem sido utilizada como um marcador, dentro de uma população das células embriogênicas competentes e não competentes (Santa-Catarina et al., 2004). Esta situação também foi identificada para outros sistemas como: *Arabidopsis* (*AtSERK1*) (Hecht et al., 2001), *Dactylis glomerata* (*DgSERK*)

(Somleva et al., 2000) e *Medicago trunculata* (*MtSERK1*) (Nolan et al., 2003). Saliencia-se, entretanto, que a expressão destes homólogos não é específica para marcar células competentes para formar embriões, mas está também envolvida no processo que confere a competência embriogênica, podendo ser um componente da via de sinalização da embriogênese especialmente durante os estádios iniciais de desenvolvimento (Ikeda et al., 2006). As células competentes podem conter um receptor inativo, que pode ser ativado pela presença de algum fator que aciona o programa genético da embriogênese (Fehér et al., 2003; Nolan et al., 2003). Agregados celulares de *O. catharinensis* cultivados, com a competência à embriogênese, foram associados à expressão do gene *SERK*, e com perfis específicos de poliaminas (PAs) e aminoácidos associados a síntese de PAs (Santa-Catarina et al., 2004). Ficou evidenciado que, para este sistema é possível a utilização da expressão do gene *SERK* como um marcador para o reconhecimento das células competentes.

A influência das auxinas exógenas, em especial o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), na indução da embriogênese somática está bem documentada (Dudits et al., 1995). Foi sugerido que o 2,4-D atua indiretamente através de um aumento nos níveis endógenos do AIA e alterando o metabolismo das auxinas. Fehér et al. (2003) propuseram que o 2,4-D, quando acima de uma determinada concentração, possui um duplo efeito nas culturas, como uma auxina (diretamente ou através do metabolismo endógeno) e como um agente de estresse. A ativação simultânea das respostas ao estresse e aos sinais auxina/ABA (ácido abscísico) podem ser um evento chave na adaptação celular, causando reprogramações genéticas, metabólicas e fisiológicas, que resultam na competência embriogênica das células somáticas. No sistema de agregados de *O. catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2004) ficou demonstrada a indução da expressão do gene *SERK* por auxinas, mais especificamente o 2,4-D. Assim, em culturas onde o 2,4-D foi adicionado ao meio de cultura, foram identificadas populações celulares competentes e não competentes para embriogênese, em um mesmo calo. Naquelas em que o regulador de crescimento estava ausente populações de células competentes não foram observadas (Santa-Catarina et al., 2004). A existência, em um mesmo calo, de populações celulares competentes e não competentes, parece ser um requisito para a aquisição da competência embriogênica. As células não competentes produziram e secretaram moléculas para o meio de cultura, como as quitinases, as arabinoglucanases, e proteínas, que seriam identificadas por outras células que alterariam o seu padrão e expressariam a sua competência em desenvolver-se em embriões (Hecht et al., 2001). Indutores não hormonais, incluindo altas concentrações de sacarose e estressores osmóticos, metal pesado e alta temperatura, também podem ser utilizados para promover a transição do estágio somático para o embriogênico (Fehér et al., 2003). Neste sentido, a adição de sorbitol ao meio de cultura WPM, pode ter sido efetivo na aquisição da competência para a embriogênese somática em agregados celulares de *O. catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2004).

Em diversas coníferas, os padrões protéicos vêm sendo utilizados como marcadores da competência das culturas embriogênicas, (Kormuták & Vooková, 1997). Em agregados celulares de *O. catharinensis*, mantidos em diferentes meios de cultura e com diferentes graus de competência para a embriogênese, constatado pela expressão do gene *SERK* (Santa-Catarina et al., 2004), foram identificadas proteínas diferencialmente expressas com maior expressão nos agregados celulares considerados competentes (Moraes et al., 2006; Moraes, 2006). Possivelmente estas proteínas sejam candidatas a marcadores moleculares da competência da embriogênese somática nesta espécie.

## DESENVOLVIMENTO DA EMBRIOGÊNESE

Vários fatores interferem no processo de embriogênese quando do estabelecimento da estrutura bipolar, que contém o ápice caulinar e radicular, conhecida como eixo embrionário. Este processo é resultado de um complexo controle espacial e temporal, onde vários hormônios atuam na regulação da expressão de múltiplos genes. Estudos envolvendo a expressão gênica nesta fase inicial da embriogênese, têm sido realizados, utilizando-se

mutantes de *Arabidopsis* (Willemsen & Scheres, 2004). Exemplos podem ser obtidos para os genes *CLAVATA1* (*CLV1*), *PLETHORA* (*PLT*), *WOX* (*WUSCHEL* related homeobox) e *PIN* (Friml *et al.*, 2003; Willemsen & Scheres, 2004; Haecker *et al.*, 2004).

Diferentes pesquisas revelam que os hormônios vegetais apresentam variações estádio-específicas, podendo ser utilizados marcadores moleculares durante o processo de embriogênese. Dentre os vários hormônios vegetais, o AIA (ácido indol-3-acético) é um dos principais fatores relacionados com o estabelecimento do eixo ápice-base, e com a simetria bilateral do embrião (Kong *et al.*, 1997; Friml *et al.*, 2003). Durante a embriogênese zigótica em várias espécies de arbóreas, como *A. angustifolia* (Astarita *et al.*, 2003a) e *O. catharinensis* (Santa-Catarina *et al.*, 2006), conteúdos maiores de AIA foram observados nos estádios iniciais, seguido por um decréscimo contínuo até o final do desenvolvimento embrionário, quando da diferenciação dos cotilédones e desenvolvimento da semente. A interface e similaridades, nos processos de embriogênese zigótica e somática, em relação aos conteúdos de AIA, foram observadas em *O. catharinensis*, onde embriões somáticos também apresentaram maiores níveis de AIA nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário somático (Santa-Catarina *et al.*, 2006). Esta variação nos teores de AIA é uma característica das sementes em desenvolvimento, cujos valores máximos ocorrem durante o crescimento, no início da embriogênese, seguida pela redução em sementes maduras (Bewley & Black, 1994). Em outras espécies, como *Pinus taeda*, um aumento crescente no conteúdo de AIA pode ocorrer do estádio globular ao cotiledonar, decrescendo no estádio maduro (Silveira *et al.*, 2004a).

Nas sementes de várias gimnospermas e angiospermas, os conteúdos endógenos de ABA seguem padrões de variação bem conhecidos. Assim, o conteúdo de ABA é baixo durante as fases iniciais da embriogênese, aumentando durante o crescimento do embrião, e decrescendo nas fases finais de desenvolvimento embrionário (Stasolla & Yeung, 2003). Este panorama foi observado durante o desenvolvimento de sementes de *A. angustifolia* (Silveira *et al.*, 2007) e *P. taeda* (Silveira *et al.*, 2004a). Entretanto, em sementes de *O. catharinensis* (Santa-Catarina *et al.*, 2006), um decréscimo nos níveis de ABA no estádio maduro não foi observado sugerindo uma possível relação com recalcitrância e dormência. Nos embriões maduros e desidratados há indícios, em muitas espécies, do acúmulo de ABA impondo um estado de dormência, pelo menos por um curto período de tempo durante a maturação, sendo que a quebra desta dormência estaria relacionada com uma mudança nos níveis endógenos de ABA e de GAs (giberelinas) (Bewley & Black, 1994). A compreensão destes fatores, atuantes na embriogênese zigótica têm sido fundamentais para a otimização, em especial na manipulação dos meios de cultura, do processo de embriogênese somática em arbóreas. Maior ênfase tem sido dada para os reguladores de crescimento, como o ABA e o ajuste osmótico, durante a etapa de maturação. Observou-se que para coníferas que, um aumento na qualidade e quantidade de embriões somáticos, pode ser obtido ao adicionar-se ao meio de cultura ABA e PEG (polietilenoglicol) (Guerra *et al.*, 2000). Em *O. catharinensis*, uma angiosperma, esta a combinação também se mostrou eficiente para a maturação dos embriões somáticos (Dias *et al.*, 2007a). Simulando a desidratação observada na embriogênese zigótica, para a maturação dos embriões somáticos, pode-se recorrer à desidratação e reidratação, e como consequência alterações nos níveis de ABA e etileno destes embriões somáticos (Stasolla & Yeung, 2003).

Como resposta à ação do ABA, e ao estresse osmótico, que ocorrem no embrião maduro, foram identificadas as proteínas tipo desidrinas e tipo LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Campalans *et al.*, 2000). Estas proteínas têm sido utilizadas como marcadores estádio-específicas do processo de embriogênese em diferentes sistemas. A utilização de proteínas, como marcadores para embriogênese somática e zigótica, têm sido descrita para várias espécies (Misra, 1995), tentando relacionar os estádios embriogênicos com alterações nos perfis protéicos. Estudos iniciais na área de análise proteômica foram realizados para os diferentes estádios da embriogênese de *O. catharinensis* e *A. angustifolia* (Dias *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2007b; Silveira *et al.*, 2007; Moraes, 2006). Estudos proteômicos iniciais também estão sendo desenvolvidos durante a embriogênese somática nestas espécies. Em *A. angustifolia*, culturas embriogênicas submetidas à maturação com

PEG, ABA e maltose apresentaram diferenças no padrão de proteínas diferencialmente expressas, onde o tratamento com PEG apresentou maior número de polipeptídeos e o ABA o menor, enquanto a maltose apresentou maior porcentagem de polipeptídeos de alto peso molecular (Andrade et al., 2007). Nos embriões somáticos de *O. catharinensis* obteve-se a identificação de proteínas diferencialmente expressas, a germina e quitinase, as quais possuem papel importante nos processos de desenvolvimento vegetal (Moraes, 2006). A germina apresentou maior expressão nos estádios globular e cotiledonar, enquanto a quitinase foi nos estádios cotiledonar inicial e maduro (Moraes, 2006). Estes estudos proteômicos comparativos entre a embriogênese somática e zigótica além de fundamentais para o entendimento destes processos, são importantes para o monitoramento e otimização da embriogênese somática nestas espécies, podendo as proteínas serem utilizadas como marcadores moleculares dos diferentes estádios de desenvolvimento.

As PAs, atualmente consideradas como reguladores de crescimento por diferentes pesquisadores, atuam em vários processos de desenvolvimento interferindo na biossíntese de macromoléculas, divisão e diferenciação celular, organogênese e embriogênese. Estas substâncias têm sido relacionadas com estresses ambientais, tais como deficiências minerais, estresse osmótico e salino (Kakkar et al., 2000). As principais PAs encontradas nas plantas superiores são a Put (putrescina), a Spd (espermidina) e a Spm (espermina), protonadas em pH fisiológico, podendo ocorrer na forma livre ou conjugada com ácidos fenólicos e moléculas de baixo peso molecular (Fehér et al., 2003). As PAs estão relacionadas com a regulação da embriogênese somática e zigótica (Kong et al., 1998), podendo ser utilizadas como marcadores bioquímicos durante esses processos (Shoeb et al., 2001; Bais & Havishankar, 2002; Astarita et al., 2003b; Silveira et al., 2004a,b; Santa-Catarina et al., 2006; Steiner et al., 2007). Em *Allium cepa*, a adição de Put associada com a Spd promove a indução de embriões somáticos, enquanto que a presença, apenas de Spd estimula a maturação e a conversão de embriões em plantas (Martínez et al., 2000). Em *Daucus carota* a Spm estimula a formação de embriões somáticos (Takeda et al., 2002). Baixas concentrações de ABA e de Put, e níveis elevados de Spd foram associadas às altas taxas de conversões de embriões somáticos em *Quercus petraea* (Cvikrová et al., 1999). Shoeb et al. (2001), propuseram que não apenas o conteúdo de PAs mas também a relação Put/Spd, constituem importantes biomarcadores da capacidade regenerativa em plantas. Adicionalmente, a interação das PAs com diferentes reguladores de crescimento vem sendo estudada (Steiner et al., 2007). Segundo Andersen et al. (1998), o aumento nos níveis de PAs nos tecidos cultivados *in vitro* causaria a redução nas concentrações de etileno e a promoção da morfogênese. Em coníferas, estudos indicam que as PAs estão envolvidas no estabelecimento da competência dos tecidos em responder à indução da embriogênese somática (Silveira et al., 2004b, 2006). Na embriogênese zigótica, foi sugerido que a Put possui importância fundamental no início da embriogênese, quando a taxa de divisão celular é alta. Altos conteúdos de Spd e/ou Spm são essenciais do meio ao final do desenvolvimento do embrião, quando o crescimento é principalmente devido ao alongamento celular (Santa-Catarina et al., 2006; Astarita et al., 2003b).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso e altamente difusível, que tem sido descrito como um mensageiro intra e intercelular, podendo participar de vários processos em plantas (Neill et al., 2003). Nos vegetais, estudos apontam o NO como uma molécula sinalizadora nos mecanismos de defesa, nas respostas ao estresse abiótico, e na regulação do crescimento, diferenciação e desenvolvimento vegetal como a germinação, senescência, expansão celular e morte celular programada (Durner & Klessig, 1999; Santa-Catarina et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que o NO pode estimular a ativação da divisão celular e a formação de células embriogênicas em células de protoplastos de alfafa, na presença de auxina (Ötvos et al., 2005).

Em células animais foi demonstrada a interação em PAs e o NO (Hillary & Pegg, 2003), visto que a Arg é um precursor comum para ambas substâncias. Trabalhos recentes mostraram que as PAs, especialmente a Spm, estão relacionadas com a biossíntese de NO em plântulas de *Arabidopsis* (Tun & Santa-Catarina et al., 2006), culturas celulares de tabaco, embriões somáticos de *O. catharinensis* (Santa-Catarina et al., 2007) e culturas

embriogênicas de *A. angustifolia* (Silveira et al., 2006). Nestas últimas, verificou-se que as PAs Spd e Spm reduzem o crescimento celular, promovem a evolução morfológica das culturas embriogênicas concomitantemente a redução na síntese de NO. Por outro lado, a Put não reduz o crescimento, não promove a evolução morfológica e aumenta a síntese de NO nestas culturas embriogênicas (Silveira et al., 2006). Estes resultados sugerem uma possível correlação entre a produção de NO, induzida ou não pelas PAs, e o processo de embriogênese. A Put e o NO estariam relacionados com a divisão celular, enquanto a Spd e Spm estariam envolvidas na via de diferenciação com a progressão da evolução morfogenética das culturas embriogênicas. Trabalhos recentes comprovaram esta hipótese observando-se um aumento na divisão celular das células embriogênicas em *A. angustifolia* quando tratadas com doadores de NO (dados não publicados). Estudos realizados por Silveira et al. (2006) também evidenciaram que as células embriogênicas de *A. angustifolia* acumulam mais NO do que as células alongadas do suspensor, sugerindo que as células embriogênicas podem ter uma fisiologia distinta em relação à biossíntese de NO. Na embriogênese somática em *O. catharinensis* também foi verificado o efeito das PAs no crescimento, evolução morfogenética e nos níveis endógenos de NO (Santa-Catarina et al., 2007). Embriões somáticos desta espécie apresentaram uma redução no crescimento, maior evolução morfogenética e maiores níveis NO quando cultivados em meio contendo Spd e Spm, enquanto a Put apresentou resultados contrários. Os resultados obtidos para estas espécies sugerem que o NO pode ser utilizado como um marcador molecular em diferentes fases do desenvolvimento da embriogênese somática, permitindo realizar estudos básicos no controle da morfogênese *in vitro*.

A utilização de marcadores bioquímicos como as PAs e hormônios vegetais, em conjunto com marcadores e moleculares, como as proteínas, NO e expressão de genes marcadores, podem representar uma importante estratégia para a otimização e controle dos processos morfogenéticos *in vitro*. Adicionalmente, o uso destes marcadores, podem ser cruciais para estudos básicos em biologia celular, bioquímica e fisiologia vegetal utilizando sistemas de cultura de tecidos de plantas. Esta estratégia pode ser importante para a viabilização da cultura de tecidos na propagação de genótipos superiores e conservação de germoplasma, assim como sua utilização como ferramenta complementar em programas de melhoramento genético, que utilizam técnicas biotecnológicas, como a transformação genética, para aumentar o ganho genético.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, S.I.; BASTOLA, D.R.; MINOCHA, S.C. Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. **Plant Physiology**, v.116, p.299-307, 1998.

ANDRADE, J.B. DA R.; DIAS, L.L.C.; BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; SILVEIRA, V. Análise proteômica comparativa durante a maturação de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. In: **3. Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos Vegetais**, Goiânia, GO, 2007.

ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidases associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). **Plant Growth Regulation**, v. 39, p.113-118, 2003a.

ASTARITA, L.V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 163-168, 2003b.

BAIS, H.P.; HAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 1-34, 2002.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. p. 445.

CAMPALANS, A.; PAGÈS, M.; MESSEGUER, R. Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 449-457, 2000.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 224, p. 33-40, 2004.

CVIKROVÁ, M.; BINAROVÁ, P.; CENKLOVÁ, V.; EDER, J.; MACHÁCKOVÁ, I. Reinitiation of cell division and polyamine and aromatic monoamine levels in alfafa explants during the induction of somatic embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 330-337, 1999.

DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.S. Conteúdo endógeno de AIA, ABA, poliaminas e aminoácidos na maturação de embriões somáticos de *Ocotea catharinensis*. In: **3. Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas**, Goiânia, GO, 2007a.

DIAS, L.L.C.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; FLOH, E.I.S. Comparative analysis of the two-dimensional gel electrophoresis patterns during seed development in *Ocotea catharinensis*. **Proteomics** (submetido). 2007b.

DIAS, L.L.C.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S. Análise proteômica comparativa durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *Ocotea catharinensis*. In: **8. Congresso e Exposição Internacional Sobre Florestas-Forest 2006**; Cuiabá. CD-ROM da..., Cuiabá, MT, 2006.

DURNER, J.; KLESSIG, D.F. Nitric oxide as a signal in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 369-374, 1999.

DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKÓ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 267-308.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; ÖTVÖS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, v. 57, p. 5-12, 2002.

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

FRIML, J.; VIETEN, A.; SAUER, M.; WEIJERS, D.; SCHWARZ, H. Efflux-dependent auxin gradients establish the apicalbasal axis of *Arabidopsis*. **Nature**, v. 426, n. 6963, p. 147-53, 2003.

GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; SANTOS, A.L.W.; ASTARITA, L.V.; NODARI, R.O. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze., In: S.M. Jain, P.K. Gupta; R.J. Newton (eds.), **Somatic embryogenesis in woody plants**, v. 6, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000. p. 457-478.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas, In: A.C. TORRES, L.S. CALDAS; J.A. BUSO (eds.), **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 2, Embrapa, Brasília, 1999. p. 533-568

HAECKER, A.; GROSS-HARDT, R.; GELGES, B.; SARKAR, A.; BREUNINGER, H.; HERRMANN, M.; LAUX, T. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 131, p. 657-668, 2004.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**, ABCTP/EMPRAPA-CNPH, Brasília, 1990. p. 203-212.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J-P.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.L.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S.C. The *Arabidopsis* **SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1** gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, v.127, p. 803–816, 2001.

HILLARY, R.A.; PEGG, A.E. Decarboxylase involved in polyamine biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1647, p. 161-166, 2003.

IKEDA, Y.; BANNO, H.; NIU, Q-W.; HOWELL, S.H.; CHUA, N-H. 2006. The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in *Arabidopsis* regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. **Plant Cell Physiology**, v. 47, n. 11, p. 1443–1456, 2006.

JIMÉNEZ, V.M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2 p.196-223, 2001.

KAKKAR, R.K.; NAGAR, P.K.; AHUJA, P.S.; RAI, V.K. Polyamines and plant morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 43, p. 1-11, 2000.

KONG, L.; ATTREE, S.M.; FOWKE, L.C. Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 23-30, 1997.

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

KORMUTÁK, A.; VOOKOVÁ, B. Biochemical variation between non-embryogenic and embryogenic calli of silver fir. **Biologia Plantarum**, v. 39, p.125-130, 1997.

MARTÍNEZ, L.E.; AGÜERO, C.B.; LÓPEZ, M.E.; GALMARINI, C.R. Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. **Plant Science**, v. 156, p. 221-226, 2000.

MISRA, S. Molecular analysis of zygotic and somatic conifer embryos. In: S.M. Jain, P.K. Gupta; R.J. Newton, (Eds.) **Somatic embryogenesis in woody plants**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 3, p. 119-142, 1995.

MORAES, F. M. DE S. **Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauracea)**. Dissertação de Mestrado. Brasília: Universidade de Brasília, 90 p., 2006.

MORAES, F. M. DE S.; SOUSA, M. V.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; RICART, C. A. O. Two-dimensional electrophoresis analysis of *Ocotea catharinensis* during somatic embryogenesis and embryogenic competence acquisition. In: XXXV Reunião Anual da SBBq. Águas de Lindóia. **Anais da...** v. 1, p. 3-19, 2006.

MORDHOST, A.P.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. Plant embryogenesis. **Critical Review in Plant Science**, v. 16, p. 535-576, 1997.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Nitric oxide signalling in plants. **New Physiology**, v. 159, p. 11-35, 2003.

NOLAN, K.E.; IRWANTO, R.R.; ROSE, R.J. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago trunculata* root-forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, v. 133, p. 218-230, 2003.

ÖTVOS, K.; PASTERNAK, T.P.; MISKOLCZI, P.; DOMOKI, M.; DORJGOTOV, D.; SZUCS, A.; BOTTKA, S.; DUDITS, D.; FEHER, A. 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 cultures. **The Plant Journal**, v. 43, p. 849–860, 2005.

PULLMAN, G.S.; JOHNSON, S.; PETER, G.; CAIRNEY, J.; XU, N. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. **Plant Cell Report**, v. 21, p.747-758, 2003.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, F.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p.285–301, 2006.

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, v. 45, p. 344-345, 1958.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH, E.I.S. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p.53-61, 2004.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S.C.; PEDROTTI, E.L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 4, p. 501-510, 2001.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; VIANA, A.M.; MARANHÃO, M.E.E.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. **Plant Growth Regulation**, v. 49, p. 237:247, 2006.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; SCHERER, G.F.E.; FLOH, E.I.S. Polyamine and nitric oxide levels correlate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, (aceito para publicação), 2007.

SCHMIDT, E.D.L.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v. 124, p. 2049–2062, 1997.

SHOEB, F.; YADAV, J.S.; BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Science**, v. 160, p. 1229-1235, 2001.

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

SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regulation**, v. 44, n. 2, p.147-156, 2004a.

SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; GUERRA, M.P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic

suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 53-60, 2004b.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; MORAES, F.M.S.; RICART, C.A.O.; SOUSA, M.V.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Endogenous abscisic acid levels and comparative proteome during seed development of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Biologia Plantarum**, (no prelo), 2007.

SOMLEVA, M.N.; SCHMIDT, E.D.L.; DE VRIES, S.C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. **Plant Cell Report**, v. 19, p. 718-726, 2000.

STASOLLA, C.; YEUNG, E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 15-35, 2003.

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

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

TAKEDA, T.; HAYAKAWA, F.; OE, K.; MATSUOKA, K. Effect of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 21-28, 2002.

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

TUN, N.N.; SANTA-CATARINA, C.; BEGUM, T.; SILVEIRA, V.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; SCHERER, G.F.E. Polyamine induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) release in *Arabidopsis* seedlings. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 3, p. 346-354, 2006.

WILLEMSSEN, V.; SCHERES, B. Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. **Annals Review Genetics**, v. 38, p. 587-614, 2004.

WINKELMANN, T.; HEINTZ, D.; VAN DORSSELAER, A.; SEREK, M.; BRAUN, H.P. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos and endosperm tissue of *cyclamen persicum* - ISHS Acta Horticulturae 714: **XXII International Eucarpia Symposium**, Section Ornamentals, Breeding for Beauty, 2006.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

PALAVRAS CHAVES:

Marcadores moleculares, morfogênese, biotecnologia.