

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVELYN LOPES DOS SANTOS

TEMPERATURA NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM  
*Pinus taeda* E *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* e AZACITIDINA PARA  
REAQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA

CURITIBA

2022

EVELYN LOPES DOS SANTOS

TEMPERATURA NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM  
*Pinus taeda* E *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* e AZACITIDINA PARA  
REAQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bessalhôk Filho

Coorientadora: Dra. Juliana Degenhardt Goldbach

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Santos, Evelyn Lopes dos

Temperatura na indução da embriogênese somática em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* e Azacitidina para reaquisição de competência embriogênica./ Evelyn Lopes dos Santos. – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bespalhok Filho

Coorientadora: Dra. Juliana Degenhardt Goldbach

1. Biotecnologia. 2. Conífera. 3. Metilação de DNA. I. Bespalhok Filho, João Carlos. II. Goldbach, Juliana Degenhardt. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de EVELYN LOPES DOS SANTOS intitulada: TEMPERATURA NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus taeda* E *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* e AZACITIDINA PARA REAQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA, sob orientação do Prof. Dr. JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 09 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

10/03/2022 07:57:38.0

JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

10/03/2022 09:34:58.0

JULIANA DEGENHARDT

Avaliador Externo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA)

Assinatura Eletrônica

10/03/2022 19:24:04.0

NEUSA STEINER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

DEDICO

*Aos pés de Deus, com amor.*

*Aos meus amigos e mestres espirituais.*

*Aos meus pais, fortalezas e fontes de inspiração.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai Gerson e à minha mãe Enedina por serem pessoas inspiradoras e estarem comigo nos caminhos que escolho trilhar. Bem como ao meu irmão Drumon, vocês são fundamentais na minha vida.

À Dr.<sup>a</sup> Juliana Degenhardt-Goldbach pela orientação nesse trabalho, por contribuir com o meu crescimento profissional e pela generosidade e paciência demonstradas em muitos momentos.

Ao Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> João Carlos Bepalhok Filho e aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação Agronomia – Produção Vegetal, Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Arthur Arrobas Martins Barroso e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida Cassilha Zawadneak, por possibilitarem que esse trabalho fosse realizado da melhor forma em um momento difícil para todos.

Ao Dr.<sup>o</sup> Fabrício Augusto Hansel pela disposição e paciência para me guiar no trabalho com a metabolômica.

À Marianne, Janaína, Simone, Fabrícia, Laudiane e ao João Arthur por terem me apoiado de inúmeras formas, auxiliando no transporte até a Embrapa e acompanhando momentos de alegrias e desafios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de desenvolvimento acadêmico.

À Embrapa Florestas, pela estrutura cedida para o desenvolvimento da pesquisa.

À Deus, em todas as suas formas, por estar comigo.

## RESUMO

A embriogênese somática é uma técnica de clonagem de alta eficiência, na qual, a partir de qualquer tecido vegetal e sob condições adequadas, ocorre um processo de desdiferenciação e rediferenciação celular com a consequente formação de embriões somáticos. Dentre os gargalos da técnica, observa-se que ao permanecerem em proliferação por mais de dez repicagens as massas pró-embriogênicas (MPEs) apresentam perda de competência embriogênica (CE), que pode estar relacionada a processos epigenéticos. Além disso, devido a baixa taxa de indução de massas pró-embriogênicas (MPEs) a partir de megagametófitos imaturos observada para as coníferas, os protocolos ainda necessitam de ajustes, podendo a temperatura ser um fator determinante. Como objetivos deste trabalho são elencados: avaliar o efeito (i) da temperatura e do genótipo na embriogênese somática em *Pinus taeda* (Pt) e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (PExPCH); e (ii) do agente hipometilante azacitidina (5-azaC) na reaquisição da CE nas linhagens ECL02 e ECL05 do híbrido PExPCH. Para o experimento (i), megagametófitos de 5 genótipos de Pt foram submetidos às temperaturas 15°C, 23°C e 28°C e ainda a choque térmico de 60°C por 5 min seguido de incubação a 23°C. Após 10 semanas no escuro, foram avaliados quanto a taxa de indução de MPEs e oxidação, além da proliferação por sete semanas. Em (ii), MPEs permaneceram em subcultivo por 17 meses, 500 mg dessas foram expostas ao 5-azaC nas concentrações de 50 e 150 µM por 10 dias em meio de cultura ou cultivadas em meio controle desprovido de 5-azaC em quadruplicata para cada concentração. As coletas foram realizadas durante o experimento no terceiro e décimo dia, na sequência se procederam as análises de citoquímica com carmim acético e azul de Evans, assim como, para ECL05, metabolômica via CG-EM. Em ambos os experimentos, as MPEs seguiram para análise de expressão dos genes relacionados à totipotência *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* (*SERK1*) e *Leafy Cotyledon 1* (*LEC1*) via RT-qPCR. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Como resultado de (i), observou-se que a indução de MPEs não foi afetada pelas temperaturas aplicadas. O efeito do genótipo foi significativo ( $p < 0,01$ ) na indução e os níveis de expressão de *SERK1* e *LEC1* aumentaram expressivamente nos tratamentos a 28°C e 60°C. No segundo experimento (ii), a reaquisição da CE em ECL05 foi identificada após exposição ao agente 5-azaC na concentração 150 µM em todas as análises. Neste caso, foi observado o aumento de células embriogênicas, de metabólitos relacionados a CE e da expressão dos genes de interesse. Quanto a ECL02, na análise citoquímica não foi observado o aumento de células embriogênicas com a exposição ao 5-azaC e a análise de expressão gênica confirmou esse resultado. Desse modo, foi possível a seleção de genótipos com maior potencial embriogênico. Os resultados obtidos para a linhagem ECL05 sugerem que o agente 5-azaC pode ser efetivo na reaquisição da CE.

**Palavras-chave:** Biotecnologia. Coníferas. Metilação do DNA. Potencial embriogênico.

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a highly efficient cloning technique, in which, from any plant tissue and under suitable conditions, a process of cell dedifferentiation and redifferentiation occurs, with the formation of somatic embryos. Among the bottlenecks of the technique, loss of embryogenic competence (EC) is observed when pro-embryogenic masses (MPEs) remain in proliferation medium for more than ten subcultures, which may be related to epigenetic processes. Furthermore, due to the low induction rate observed for conifers, the protocols still need to be adjusted, and temperature may have a decisive influence. The objectives of this work were: to evaluate the effect (i) of temperature and genotype on somatic embryogenesis in *Pinus taeda* (Pt) and *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (PEXPCH); and (ii) of the hypomethylating agent 5-azacytidine (5-azaC) in the CE reacquisition for the ECL02 and ECL05 lines of the PEXPCH hybrid. For experiment (i), megagametophytes from 5 Pt genotypes were subjected to temperatures of 15°C, 23°C and 28°C and heat shock at 60°C for 5 min followed by incubation at 23°C. After 10 weeks in the dark, the initiation rate of MPEs and oxidation were evaluated, in addition to proliferation for seven weeks. In (ii), MPEs remained in subculture for 17 months, and then 500 mg of these were exposed for 10 days to 5-azaC added to the culture medium at 50 and 150 µM as well as a control without 5-azaC, in quadruplicate for each concentration. After the third and tenth day samples were collected and submitted to cytochemical analyzes with acetic carmine and Evan's blue, as well as, for ECL05, metabolomic analyses via CG-EM. In both experiments (i and ii), the expression analysis of genes related to *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* (*SERK1*) and *Leafy Cotyledon 1* (*LEC1*) were carried out via RT-qPCR. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ). As a result of (i), it was observed that the induction of somatic embryogenesis was not affected by the temperature. The effect of genotype was significant ( $P < 0.01$ ) on induction rate and the expression levels of *SERK1* and *LEC1* increased significantly in treatments at 28°C and 60°C. In the second experiment (ii), the reacquisition of EC in ECL05 was observed after exposure to the agent 5-azaC at a concentration of 150 µM in all analyses, where an increase in embryogenic cells, EC-related metabolites and expression of the genes of interest were observed. For ECL02, the cytochemical analysis did not show an increase in embryogenic cells with exposure to 5-azaC and the gene expression analysis confirmed this result. Thus, it was possible to select families with higher embryogenic potential. The results observed for ECL05 suggest that 5-azaC can be effective in the reacquisition of EC for PEXPCH.

**Keywords:** Biotechnology. Conifers. DNA methylation. Embryogenic potential.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Estádios morfológicos da embriogênese zigótica e somática em gimnospermas. Adaptado de Smertenko e Bozhkov (2014). .....19
- FIGURA 2 – Esquema da metodologia empregada no experimento efeito da temperatura e do genótipo na indução da embriogênese somática em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*. .....33
- FIGURA 3 – Esquema da metodologia empregada no segundo experimento de massas pró-embriogênicas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* submetidas ao agente hipometilante azacitidina (5-azaC), com posterior análises citoquímica, metabolômica e de expressão gênica .....37
- FIGURA 4 – Avaliações realizadas nos genótipos de *Pinus taeda* (ADAM 18, 05, 15 FSCE, 28 KLB Mar) e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (ESJA36). A) Taxa de massa por genótipo. Taxa de oxidação de explantes por B) genótipo e C) temperatura após 10 semanas de exposição. Médias identificadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Fisher (DMS) a 5% de significância.....45
- FIGURA 5 – Níveis de expressão gênica relativa dos genes A) SERK1 E b) LEC1 no genótipo ADAM 18, em relação aos tratamentos térmicos. ....47
- FIGURA 6 – Análise citoquímica de massas embriogênicas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, linhagem ECL02, coradas com carmim acético e azul de Evans após exposição ao agente hipometilante azacitidina (0 µM, 50 µM e 150 µM) sendo coletadas em dois tempos a partir do início do experimento, no terceiro e décimo dia. As imagens foram capturadas com câmera de aparelho celular acoplada em estereomicroscópio modelo SMZ-161 (Motic) com aumento 0,75. Barras de escala: A - F 100 µm. ....50
- FIGURA 7 – Análise citoquímica de massas embriogênicas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* linhagem ECL05, coradas com carmim acético e azul de Evans após exposição ao agente hipometilante azacitidina (0 µM, 50 µM e 150 µM) sendo coletadas em dois tempos a partir do início do experimento, no terceiro e décimo dia. As imagens

- foram capturadas com câmera de aparelho celular acoplada em estereomicroscópio modelo SMZ-161 (Motic) com aumento 0,75. Barras de escala: A - F 100  $\mu$ m.....51
- FIGURA 8 – Pró-embrião identificado em massa pró-embriogênica de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* linhagem ECL02 após exposição à azacitidina (150  $\mu$ M – coleta no 10º dia). Estruturas coradas com: carmim acético – células embriogênicas (seta vermelha, sobreposição dessa estrutura nos dois pró-embriões na imagem) e azul de Evans – células do suspensor (seta azul). Imagem capturada com câmera de aparelho celular acoplada em microscópio óptico (Coleman) com objetiva de 10x. Barra de escala: 100 $\mu$ m.....52
- FIGURA 9 – Nível de píxeis para vermelho e azul obtido a partir análise de RGB nas imagens da análise citoquímica pelo software ImageJ, de acordo com as coletas e concentrações para as linhagens de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* A) ECL02 e B) ECL05.....53
- FIGURA 10 – Taxa de crescimento de massas pró-embriogênicas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, linhagem ECL02, de acordo com a concentração do agente hipometilante azacitidina e as coletas durante o experimento .....54
- FIGURA 11 – Níveis de expressão gênica relativa dos genes A) SERK1 e B) LEC1 em *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, linhagem ECL02, em relação às concentrações de azacitidina e coletas realizadas durante o experimento .....55
- FIGURA 12 – Níveis de expressão gênica relativa do gene A) SERK1 E B) LEC1 em *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, linhagem ECL05, em relação às concentrações de azacitidina e coletas realizadas durante o experimento. ....56
- FIGURA 13 – Scores dos dois primeiros componentes principais do conjunto de amostras de calos de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* linhagem ECL05, expostos a diferentes concentrações de azacitidina. ME= massa pró-embriogênica jovem; A0\_C1: massa a 0  $\mu$ M coleta no 3º dia, A0\_C3= massa a 0  $\mu$ M coleta no 10º dia; A5\_C1= massa a 50

	μM coleta no 3º dia, A5_C3= massa a 50 μM coleta no 10º dia; A15_C1= massa a 150 μM coleta no 3º dia.....	59
FIGURA 14 – Grupo 1. Variação da concentração de A) frutose, B) glicose, C) sacarose e D) razão entre sacarose e hexoses em massa pró-embriogênica jovem (MPE) de <i>Pinus elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> em função das concentrações de azacitidina. ....		61
FIGURA 15 – Grupo 2. Variação da concentração de A) alanina, B) ácido glutâmico, C) valina, D) serina e E) glutamina em MPEs de <i>Pinus elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> em função da concentração de azacitidina. ....		63
FIGURA 16 – Grupo 3. Variação da concentração de A) ácido cítrico e B) ácido succínico em MPEs de <i>Pinus elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> sem função da concentração de azacitidina.....		65
FIGURA 17 – Variação da concentração de putrescina em MPEs de <i>Pinus elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> em função da concentração de azacitidina.....		66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Genes para análise de expressão por RT-qPCR.....	41
TABELA 2 – Linhagens celulares embriogênicas (ECL) formadas após experimento efeito da temperatura e do genótipo na indução da embriogênese somática em <i>Pinus taeda</i> (genótipo ADAM 18) e <i>Pinus elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> (genótipo ESJA 36). ....	46
TABELA 3 – Número de pró-embriões nas massas pró-embriogênicas de <i>Pinus elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> , de acordo com a linhagem, o tratamento pela concentração de azacitidina e as coletas durante o experimento.....	54
TABELA 4 – Compostos identificados em massas de <i>Pinus elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> submetidas a diferentes concentrações de azacitidina e coletadas em dois tempos diferentes com uma massa pró-embriogênica jovem.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

5-azaC	- Azacitidina
BOD	- Demanda bioquímica de oxigênio
cDNA	- DNA complementar
CE	- Competência Embriogênica
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CIA	- Clorofórmio:álcool isoamílico
CTAB	- Brometo de Cetrimônio
DEPC	- Dietilpirocarbonato
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
ECL	- Linhagem de massa pró-embriogênica
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
ES	- Embriogênese somática
<i>LEC1</i>	- Leafy Cotyledon 1
MDF	- Fibras de Média Densidade
MDP	- Partículas de Média densidade
mLV	- Meio Litvay modificado
MPE	- Massa pró-embriogênica
MSTFA	- N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
OSB	- Painéis de tiras de madeira orientadas
PAs	- Poliaminas
PCA	- Análise de componentes principais
PCR	- Reação da cadeia da polimerase
pH	- Potencial hidrogeniônico
PIB	- Produto interno bruto
Put	- Putrescina
RNA	- Ácido ribonucleico
RPM	- Rotação por minuto
<i>SERK1</i>	- <i>Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1</i>
TCA	- Ácido tricarbóxico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO SETOR.....	17
2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	18
2.2.1 Aspectos genéticos e epigenéticos da embriogênese somática .....	20
2.2.2 Efeito da azacitidina na reaquisição de competência embriogênica .....	23
2.2.3 Efeito da temperatura na indução na embriogênese somática.....	25
2.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E METABOLÔMICA .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 LOCAL DE PESQUISA .....	30
3.2 EFEITO DA TEMPERATURA E DO GENÓTIPO NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>PINUS TAEDA</i> E <i>PINUS ELLIOTTII</i> X <i>P. CARIBAEA</i> VAR. <i>HONDURENSIS</i> .....	30
3.2.1 Material vegetal .....	30
3.2.2 Aplicação do estresse térmico.....	31
3.2.3 Subcultivo e coleta das massas pró-embriogênicas.....	32
3.3 EFEITO DA AZACITIDINA NA REAQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA EM LINHAGENS DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> X <i>P. CARIBAEA</i> VAR. <i>HONDURENSIS</i> .....	34
3.3.1 Material Vegetal .....	34
3.3.2 Aplicação do agente azacitidina .....	34
3.4 ANÁLISE CITOQUÍMICA DAS LINHAGENS EMBRIOGÊNICAS .....	38
3.5 ANÁLISE METABOLÔMICA POR CG-EM.....	38
3.5.1 Reagentes .....	38
3.5.2 Extração .....	38
3.5.3 Derivatização.....	39
3.5.4 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa .....	39
3.5.5 Tratamento pós-análise e análise estatística .....	40
3.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>SERK1</i> E <i>LEC1</i> POR RT-QPCR .....	40
3.6.1 Desenho e seleção de primers.....	40
3.6.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	41
3.6.3 Análises de expressão gênica.....	42
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>

4.1 EFEITO DA TEMPERATURA E DO GENÓTIPO NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>PINUS TAEDA</i> E <i>PINUS ELLIOTTII</i> X <i>P. CARIBAEA</i> VAR. <i>HONDURENSIS</i> .....	44
4.1.1 Efeito da temperatura e do genótipo .....	44
4.1.2 Formação de linhagens por genótipo .....	46
4.1.3 Análise de expressão dos genes <i>SERK1</i> e <i>LEC1</i> em resposta a temperatura	46
4.2 EFEITO DA AZACITIDINA NA REAQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA NA ES DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> X <i>P. CARIBAEA</i> VAR. <i>HONDURENSIS</i> .....	48
4.2.1 Primeiro experimento - análise citoquímica .....	48
4.2.2 Segundo experimento - análises citoquímica e do crescimento das massas pró-embriogênicas .....	48
4.2.3 Análise de expressão dos genes <i>SERK1</i> e <i>LEC1</i> em resposta ao agente azacitidina .....	54
4.2.4 Análise metabolômica de massas pró-embriogênicas tratadas com azacitidina .....	57
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
5.1 EFEITO DA TEMPERATURA E DO GENÓTIPO NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>PINUS TAEDA</i> E <i>PINUS ELLIOTTII</i> X <i>P. CARIBAEA</i> VAR. <i>HONDURENSIS</i> .....	67
5.1.1 Avaliação de explantes e formação de linhagens por genótipo .....	67
5.1.2 Análise de expressão dos genes <i>SERK1</i> e <i>LEC1</i> em resposta a temperatura	68
5.2 EFEITO DA AZACITIDINA NA REAQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA NA ES DE <i>PINUS ELLIOTTII</i> X <i>P. CARIBAEA</i> VAR. <i>HONDURENSIS</i> .....	69
5.2.1 Análises citoquímica e de crescimento das massas pró-embriogênicas .....	69
5.2.2 Análise de expressão dos genes <i>SERK1</i> e <i>LEC1</i> em resposta ao agente azacitidina .....	71
5.2.3 Análise metabolômica de massas pró-embriogênicas tratadas com azacitidina .....	73
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva brasileira de base florestal plantada possui atividade econômica complexa com elevada demanda internacional. Constitui um ramo com diversificados produtos, segmentos e aplicações industriais com destaque para as madeiras de *Pinus* e *Eucalyptus*. Dentre as espécies de *Pinus* cultivadas estão *P. taeda* e *P. elliottii* utilizadas para fins industriais, representando 74% da área de floresta plantada no Paraná. Assim como, visando o reflorestamento, emprega-se *P. caribaea* var. *hondurensis* (APRE, 2018, 2020; IBÁ, 2020).

Dentre as atividades econômicas no Brasil, duas grandes áreas contemplam a cadeia produtiva de árvores plantadas: a agropecuária, com representatividade dentro do setor de 4,4% em 2020. E a indústria da transformação a qual fabrica produtos de madeira, produzindo celulose, papel e produtos de papel. A participação total das exportações destes produtos foi de 4,8% no mesmo ano, apesar do comércio internacional ter sofrido um grande impacto devido a pandemia causada pelo vírus COVID-19. No cenário mundial, o Brasil é o maior exportador de celulose e apresenta um expressivo crescimento na exportação na última década (IBÁ, 2021).

O melhoramento genético em coníferas possibilita a elaboração de variedades resistentes a doenças (YANG *et al.*, 2020), a seca (MATALLANA-RAMIREZ *et al.*, 2021) e auxilia na recuperação de florestas (SONG *et al.*, 2020). Possibilitando que este seja otimizado, a embriogênese somática (ES) reduz o tempo de produção pela rápida propagação dos vegetais em comparação aos métodos tradicionais. Sendo realizada com sucesso, os genótipos de elite são selecionados para a implementação da silvicultura clonal em larga escala (LI & DUNGEY, 2018; SONG *et al.*, 2020; WALTHER *et al.*, 2022).

A ES é o processo no qual o embrião se desenvolve a partir de um tecido vegetativo ou reprodutivo e sob condições apropriadas este é convertido em uma planta inteira e funcional (ELHITI, 2013; GUAN *et al.*, 2016; PULLMAN, 2018). Dentre as coníferas, as condições físicas e químicas são fatores que demandam atenção central nos estudos com a ES (GUAN *et al.*, 2016; PULLMAN, 2018). A temperatura é indicada como determinante nessa fase do desenvolvimento. Pela utilização da temperatura como fator de estresse na fase de indução da ES, é possível gerar um efeito de “memória” pelo mecanismo epigenético nomeado

*priming effect* (LÄMKE & BÄURLE, 2017; SOW *et al.*, 2018; TRONTIN *et al.*, 2021).

Em diversas espécies, contudo, observa-se uma relação progressiva da perda de competência embriogênica (CE) em linhagens celulares embriogênicas com o aumento de subcultivos em mais de dez meses (BRETON *et al.*, 2006; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2007, 2009). A CE é associada a baixos níveis de metilação do DNA e relatos indicam que esta pode ser readquirida por meio de agentes epigenéticos como a 5-azacitidina (5-azaC; OSORIO-MONTALVO *et al.*, 2018).

A investigação da ES após exposição a diferentes regimes de temperatura e sob ação do agente hipometilante 5-azaC se faz necessária, visto que há uma lacuna na literatura no que se refere a aspectos em nível celular e molecular. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos: (i) elucidar os efeitos da aplicação de diferentes regimes térmicos e do genótipo na indução de massas pró-embriogênicas (MPEs) de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*; e (ii) compreender os efeitos da aplicação de 5-azaC na proliferação de MPEs de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* visando reaquisição da CE.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO SETOR

O segmento brasileiro de silvicultura utiliza majoritariamente espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, sendo mundialmente conhecido por sua alta produtividade. As condições edafoclimáticas promissoras favoreceram principalmente as regiões Sul e Sudeste, onde se localizam atualmente importantes polos industriais e a infraestrutura logística necessária, totalizando 69,21% das áreas de florestas plantadas no Brasil (APRE, 2020; IBÁ, 2020).

Constituindo um ramo com diversificados produtos, segmentos e aplicações industriais, essa cadeia produtiva possui atividade econômica complexa. Essa fornece toras para os segmentos industriais de papel e celulose; compensados (MDF, MDP e OSB); madeira serrada - para fabricação de móveis; energia – uso da biomassa residual na geração de vapor e energia; produtos com maior valor agregado como portas, janelas, molduras e papéis especiais. Neste caso a madeira de *Pinus* é valorizada por ser de fibra longa, conferindo maior resistência física e possuindo melhor absorção de tintas, visando a impressão gráfica (EMBRAPA, 2014; APRE, 2018, 2020).

O sucesso do setor levou a significativos avanços na pesquisa em melhoramento e no desenvolvimento de técnicas silviculturais, tanto por universidades, quanto pelas iniciativas pública e privada. Assim, o investimento na inovação em produtos e processos desde a matéria-prima até a gestão de resíduos se apresenta relevante, possibilitando a ampliação do mercado para além dos produtos já consolidados (APRE, 2020; IBÁ, 2020).

Os produtos brasileiros de base florestal têm grande demanda internacional, tendo como principais destinos Estados Unidos e China com 59,4% do valor total exportado, seguido de Países Baixos 8,7% e Itália 8,6% (APRE, 2020). Em relação aos indicadores econômicos, no ano de 2019 o setor de árvores plantadas teve participação de 1,2% no PIB total brasileiro e saldo de US\$10,3 bilhões na balança comercial (IBÁ, 2020).

O aquecimento global também é uma pauta importante. De acordo com Pérez-Oliver *et al.* (2021), este será desafiador para espécies florestais e as coníferas podem estar entre as que serão mais afetadas devendo se ajustar a climas mais quentes. Com a importância deste setor, novas tecnologias devem ser desenvolvidas e aplicadas para ampliar os conhecimentos sobre as espécies, assim como, aprimorar as cadeias produtivas.

A combinação das tecnologias de embriogênese somática e criopreservação de germoplasma a longo prazo são citadas por Klimaszewska *et al.* (2011) por oferecem vantagens relevantes para a produtividade florestal por meio da silvicultura clonal. Li e Dungey (2018) indicam que o uso combinado de ferramentas de implantação, como enxerto de copa e embriogênese, juntamente à seleção genômica aceleram a entrega de ganho genético à floresta possibilitando melhorias em um prazo reduzido.

## 2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Entre as fanerógamas a dupla fertilização resulta no estabelecimento do zigoto unicelular e do endosperma, o desenvolvimento subsequente desse zigoto até a formação de um embrião é nomeado embriogênese (HAND *et al.*, 2016). A embriogênese também pode ocorrer sem que haja a fertilização, sendo a embriogênese somática uma das possibilidades de formação de embriões assexuados *in vivo* ou *in vitro* (SMERTENKO & BOZHKOV *et al.*, 2013; HAND *et al.*, 2016).

O termo embriogênese somática (ES) aponta a similaridade morfológica dessa via de regeneração vegetativa para com a embriogênese zigótica (WINKELMANN, 2016). A fascinante via da ES foi descrita em cenoura por Reinert (1958) pela primeira vez há mais de 60 anos e ocorre a partir de estruturas bipolares derivadas de uma ou algumas células de origem somática (PULLMAN, 2018).

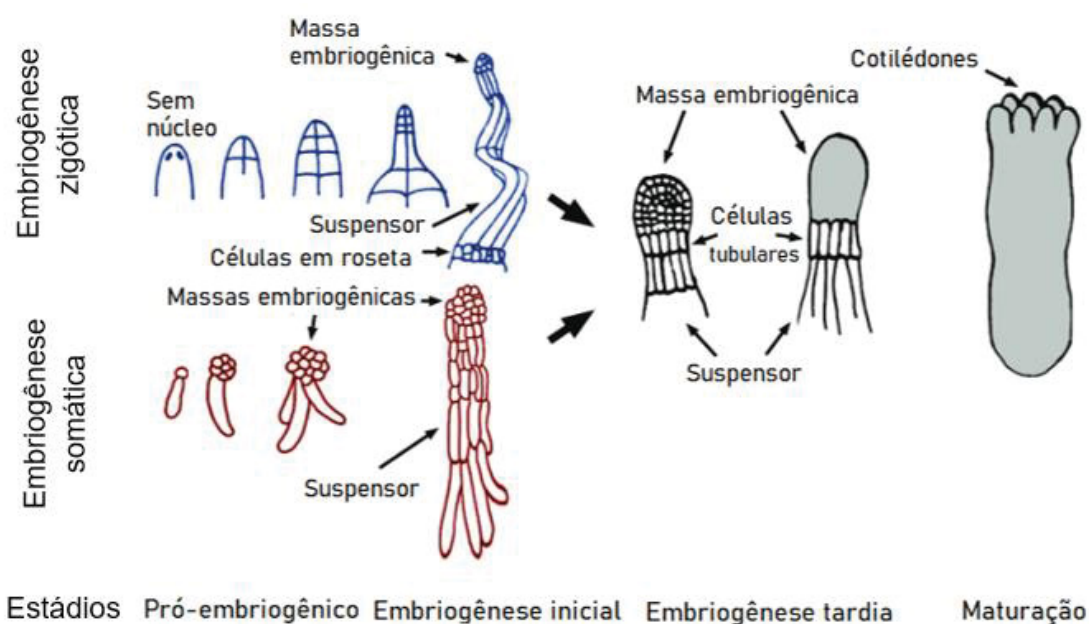
É definido ES como um processo no qual o embrião se desenvolve de maneira assexuada a partir de um tecido vegetativo ou reprodutivo, ou seja, uma célula vegetal pode se desdiferenciar em uma célula-tronco embrionária

totipotente e, sob condições apropriadas, originar um embrião que se desenvolve em uma planta inteira e funcional. In vitro as células somáticas adquirem a competência embriogênica como resultado de estímulos químicos e físicos impostos durante o processo de desdiferenciação (ELHITI *et al.*, 2013; GUAN *et al.*, 2016; PULLMAN, 2018).

Em coníferas, a ES in vitro ocorre por meio de quatro etapas: (i) iniciação ou indução, (ii) multiplicação ou proliferação, (iii) maturação de massas pró-embriogênicas em embriões somáticos e (iv) conversão destes em plântulas (PULLMAN, 2018). Sendo possível criopreservar as células nas etapas de proliferação de massas pró-embriogênicas ou de embriões maduros, visando o armazenamento das culturas (PULLMAN, 2018).

Devido às embriogêneses zigótica e somática compartilharem elevada similaridade em muitos estágios do desenvolvimento (Figura 1), a ES se tornou um sistema modelo importante para estudar a embriogênese em nível molecular, celular e tecidual. As vantagens práticas da ES estão em possibilitar a redução do tempo de produção para plantas de alto valor comercial, facilitar a aplicação da engenharia genética e a produção comercial de híbridos (WILLEMSSEN & SCHERES, 2004; PULLMAN, 2018).

**Figura 1.** Estádios morfológicos da embriogênese somática em gimnospermas (Piceacea). Adaptado de Smertenko e Bozhkov (2014).



Em *Pinus spp.* os protocolos para a fase de indução na ES estão relativamente mais avançados, contudo, a maturação de massas pró-embriogênicas em embriões somáticos cotiledonares normais apresenta desafios recorrentes (MONTALBÁN *et al.*, 2016; WINKELMANN, 2016). São apresentados problemas como baixa produção de embriões em *P. pinea* e *P. kasiya*, assim como, a morfologia anormal desses ou o não desenvolvimento da raiz (LIN *et al.*, 2002; BRETON *et al.*, 2005; YILDIRIM *et al.*, 2006; CHOUDHURY *et al.*, 2008; CARNEROS *et al.*, 2009).

As condições físicas e químicas são fatores que demandam atenção central nos estudos com a ES com coníferas. Sendo assim devem ser realizados estudos para analisar o efeito das condições de cultivo em espécies de *Pinus*. Apesar dos desafios, é esperado que a ES desempenhe um importante papel no futuro para auxiliar a silvicultura clonal, a sustentabilidade e a uniformidade dos plantios comerciais (MONTALBÁN *et al.*, 2016; PULLMAN, 2018).

### 2.2.1 Aspectos genéticos e epigenéticos da embriogênese somática

O termo indução de células embriogênicas pode ser utilizado para se referir a todos os eventos de reprogramação de uma célula diferenciada. Porém, recentemente essa etapa foi dividida em fases, sendo estas: desdiferenciação, aquisição de totipotência e comprometimento em células embriogênicas (SMERTENKO & BOZHKOVA, 2014; WINKELMANN, 2016).

Sendo pré-requisito para obter competência embriogênica, a desdiferenciação das células somáticas resulta em reprogramação genética, perda do destino celular e mudança para células meristemáticas (totipotentes). Essa etapa é de decorrência multifatorial, porém é discutido que estresses devido a ferimento, separação do tecido circundante, condições de cultura *in vitro* e presença de auxina possuem um papel central na desdiferenciação (FÉHER *et al.*, 2003; WINKELMANN, 2016).

Quanto à aquisição de totipotência, 25 genes candidatos foram associados à expressão da totipotência celular (ELHITI *et al.*, 2013). Estes autores identificaram funções destes genes durante a transcrição, transdução de

sinal, modificações pós-traducionais, respostas a hormônios vegetais, reparo e metilação do DNA e, pela primeira vez, fosforilação de proteínas e sinalização do ácido salicílico. Neste mesmo estudo também foi verificado que o comprometimento em células embriogênicas possui envolvimento de genes para transdução de sinal, organização de microtúbulos, metilação do DNA, regulação da transcrição, apoptose e sinalização mediada por hormônios vegetais. A identificação dessas informações por Elhiti e colaboradores foi realizada através de abordagem bioinformática utilizando o banco de dados de interconexões CCSB (Center of Cancer Systems Biology) e *Arabidopsis thaliana* como modelo vegetal.

Comparado com *A. thaliana*, o entendimento do mecanismo molecular que regula a ES em espécies florestais é laborioso em razão do grande tamanho dos genomas (BIROL *et al.*, 2013; NYSTEDT *et al.*, 2013; NEALE *et al.*, 2014; ZIMIN *et al.*, 2017). Com isso, a identificação de genes chave durante a ES nessas espécies é valiosa para orientar a descoberta da rede regulatória em espécies florestais. Doze genes relacionados à ES foram apresentados por Elhiti *et al.* (2013), dentre esses os mais conhecidos estão nas fases de (i) diferenciação celular: *PRC1* - *polycomb repressive complex 1*; (ii) expressão de totipotência: *SERK1* - *somatic embryogenesis receptor-like kinase 1*, *LEC1* - *leafy cotyledon 1*, *WUS* - *wuschel*; e (iii) comprometimento em células embriogênicas: *CDKA* - *cyclin-dependent kinase A*.

Em literatura é recorrente a citação da família de genes *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE* (*SERK*) como codificadora para enzimas quinases, as quais são altamente conservadas e regulam respostas celulares e fisiológicas pela fosforilação de diferentes substratos (HE *et al.*, 2018). A busca por genes marcadores indicando a transição de células somáticas para células embriogênicas resultou na identificação de *SERK*, tendo a primeira observação da sua expressão transitória sido realizada por Schmidt *et al.* (1997) em uma cultura embriogênica derivada do explante de hipocótilo de *Daucus carota*.

A expressão de homólogos de *SERK* em células embriogênicas de coníferas foi relatada em *Araucaria angustifolia* (STEINER *et al.*, 2012), *Pinus radiata* (BRAVO *et al.*, 2017), *Picea glauca* (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2011) e

*Picea balfouriana*, e foi sugerido o uso de *SERK* como marcador molecular putativo dos estádios iniciais da ES (LI *et al.*, 2014).

Dentre os genes citados, foram identificados em *A. thaliana* alguns tipos que codificam para fatores de transcrição realizando regulação positiva na ES. O primeiro é *LEAFY COTYLEDON (LEC)* - *AtLEC1* e *AtLEC2*. Apresentando a relevância desse para o processo, estudos apontaram que a expressão ectópica (i.e., expressão anormal) de *AtLEC1* é suficiente para induzir a embriogênese somática a partir de células vegetativas (LOTAN *et al.*, 1998; GAJ *et al.*, 2005). Assim como, indicam que *AtLEC1* atua como regulador central na determinação do destino celular e em diversas vias de sinalização como as de expressão em resposta a estresses abióticos tanto na embriogênese zigótica quanto somática (BRAYBROOK & HARADA, 2008; JUNKER *et al.*, 2012; RADOEVA & WEIJERS, 2014; HUANG *et al.*, 2015). As funções de *AtLEC2* estão relacionadas à regulação da ES por meio da repressão da expressão do gene *Gibberellin3-beta-dioxygenase2 (AtGA3ox2)* e ao estímulo da via da auxina através da regulação positiva de genes relacionados à sua biossíntese (CURABA *et al.*, 2004; BRAYBROOK *et al.*, 2006; STONE *et al.*, 2008; GUAN *et al.*, 2016).

Em coníferas há relatos da expressão de homólogos de *LEC* analisados por Uddenberg *et al.* (2011) após tratamento com o inibidor de histona desacetilase em *Pinus sylvestris* e *Picea abies* sugerindo uma possível ligação entre a estrutura da cromatina e a expressão de genes relacionados à embriogênese. Também são relatados estudos em *Pinus contorta* (PARK *et al.*, 2010), *Picea glauca* (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2011) e *Araucaria angustifolia* (SCHLÖGL *et al.*, 2012).

A segunda classe de fatores de transcrição com regulação positiva inclui *AGAMOUS-like 15 (AtAGL15)*. Foi demonstrado que sua superexpressão ectópica aumentou a taxa de iniciação de ES a partir de meristema apical aéreo de *Arabidopsis* (HECK *et al.*, 1995; HARDING *et al.*, 2003). *BABYBOOM (AtBBM)* se enquadra no terceiro tipo, induzindo a formação de massas embriogênicas a partir de folhas e cotilédones por meio de sua expressão ectópica (BOUTILIER *et al.*, 2002). E o quarto tipo de fatores de transcrição é constituído por uma família de genes nomeada *WUSCHEL-related homeobox (WOX)*, atuando na ES pela ativação de genes *AtLEC* (ZUO *et al.*, 2002; WANG

*et al.*, 2009). Dessa família, o *AtWUS* opera na padronização embriogênica e na manutenção de células totipotentes, sendo sugerido que *AtWUS* possui funções especializadas em variadas fases do desenvolvimento nos vegetais (GALLOIS *et al.*, 2004; SU *et al.*, 2009; GUAN *et al.*, 2016).

Por outro lado, muitos repressores atuam na embriogênese somática, dentre esses estão as proteínas B3 VP1 / ABI3-LIKE (*AtVAL*) as quais podem suprimir a transcrição de genes embrionários por processos epigenéticos via ubiquitinação da histona H2A (*H2Aub*) pelo recrutamento do complexo repressivo Polycomb 1 (*AtPRC1*); bem como, manter a repressão por trimetilação na lisina 27 da histona H3 (*H3K27me3*) mediada por *AtPRC2* (YANG *et al.*, 2013 GUAN *et al.*, 2016).

Esses complexos repressivos também desempenham um papel crítico na transição do estado embriogênico à pós-embriogênico via supressão da expressão de genes *AtLEC* (CHEN *et al.*, 2010; BOUYER *et al.*, 2011); na prevenção de desdiferenciação de células somáticas maduras em raízes de *A. thaliana* por parte de *AtPRC2*. Foi identificado que mutantes ectópicos de *AtPRC2* produzem calos e embriões somáticos espontaneamente em cultura de tecidos (CHANVIVATTANA *et al.*, 2004). Assim como, há estudos indicando que quando a repressão epigenética por *AtPRC2* é removida, as células totalmente diferenciadas também podem se desdiferenciar e produzir embriões somáticos (IKEUCHI *et al.*, 2015; GUAN *et al.*, 2016). Dessa forma, o uso de agentes que possibilitam a modulação do epigenoma vem sendo investigado para a otimização de gargalos na técnica de ES.

### 2.2.2 Efeito da azacitidina na reaquisição de competência embriogênica

O termo epigenética se refere a variações na expressão gênica, as quais são independentes da mudança da sequência do DNA. Dessa forma, os processos de metilação do DNA e das modificações das proteínas histonas na cromatina controlam a programação genética de um organismo por impossibilitar o acesso de fatores e da maquinaria de transcrição pela compactação da cromatina (CHENG, 2014; DE-LA-PEÑA *et al.*, 2015; KUMAR & STADEN, 2017).

Metilação do DNA se refere à adição de um grupamento metil na posição 5' do anel de pirimidina (5mC) em resíduos de citosina, i.e., em citidinas, no DNA. Em diversos organismos essa ocorre nas ilhas CpG (citosina adjacente a guanina); contudo, nas plantas, também é encontrada em sequências de bases CG e CHG e das sequências de nucleotídeos CHH sendo considerada mais complexa nos vegetais (H = Adedina, Timina ou Citosina; DE-LA-PEÑA *et al.*, 2015; KUMAR & STADEN, 2017).

Os mecanismos epigenéticos, a expressão gênica e os padrões metabólicos são orquestrados por diferentes condições endógenas e exógenas ao explante, podendo alterar a natureza deste (OSORIO-MONTALVO *et al.*, 2018). Pela compreensão de como esses mecanismos influenciam a aquisição do destino celular é possível otimizar gargalos na técnica de ES.

Durante a proliferação celular em espécies florestais são observadas massas pró-embriogênicas (MPEs), nas quais as células que possuem a competência embriogênica apresentam dois grupos celulares distintos: células somáticas, caracterizadas por serem isodiamétricas, globulares e agrupadas, e células do suspensor, as quais são alongadas por decorrerem da primeira divisão celular assimétrica durante a ES (WINKELMANN, 2016). Contudo, é observada uma relação progressiva da perda de competência embriogênica em linhagens celulares embriogênicas e a taxa de maturação decrescente com o aumento de subcultivos em mais de dez meses (BRETON *et al.*, 2006; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2007, 2009).

Indicando a associação da elevada competência embriogênica com baixos níveis de metilação do DNA, Osorio-Montalvo *et al.* (2018) discorrem sobre o uso do agente hipometilante azacitidina como um promotor de mudanças epigenéticas visando a obtenção do melhor potencial dos protocolos de ES.

Os resíduos de citosina são altamente metilados em plantas desenvolvidas. Sendo a azacitidina (5-azaC) um análogo à citidina, essa é incorporada aleatoriamente ao DNA durante a replicação impedindo a metilação em vastas extensões da dupla fita devido a presença do nitrogênio na posição 5' do anel de pirimidina, tendo como resultado a alteração da expressão gênica (JONES & TAYLOR, 1980; TAYLOR & JONES, 1982; OSORIO-MONTALVO *et*

*al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2021). Com esse potencial de redução da metilação global do DNA, estudos vêm investigando o uso do agente 5-azaC na recuperação de competência embriogênica em diversas espécies (FRAGA *et al.*, 2012; PÉREZ *et al.*, 2015; SOLÍS *et al.*, 2015; PILA QUINGA *et al.*, 2017; BETEKHTIN *et al.*, 2018; REE *et al.*, 2020).

Estudos com diferentes tratamentos de 5-azaC com a família *Pinaceae*, indicam que, na maturação, se obteve as maiores quantidades de embriões de *Pinus pinaster* nas concentrações de 10 e 15  $\mu\text{M}$ , porém o crescimento das MPEs foi inversamente proporcional ao aumento da concentração do agente (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2009). Observou-se também uma redução significativa na taxa de crescimento e na competência embriogênica no híbrido *Larix x euroleis* (TEYSSIER *et al.*, 2014). Considerando os resultados antagônicos, mais estudos devem ser realizados para esclarecer os processos relacionados ao uso do agente em espécies florestais.

### 2.2.3 Efeito da temperatura na indução na embriogênese somática

Sendo os vegetais organismos sésseis, esses desenvolveram um elevado potencial de adaptação às condições ambientais. É possível visualizar a aplicação desse nas árvores florestais pela apresentação do grande porte e vida longa destas, com populações contínuas e ciclos de vida complexos (LASCoux *et al.*, 2016). Para a adaptação ao novo ambiente e facilitando mudanças evolutivas a curto prazo, considera-se a plasticidade fenotípica (i.e., mudanças no fenótipo induzidas pelo ambiente) um dos principais fatores envolvidos no processo de adaptação (NICOTRA *et al.*, 2010; TRONTIN *et al.*, 2021).

Apesar dos mecanismos envolvidos na plasticidade fenotípica não serem amplamente conhecidos, acredita-se que sejam englobados fatores genéticos e epigenéticos. No entanto, os polimorfismos genéticos já identificados respondem por uma pequena parte na variação fenotípica observada, sendo assim, evidências para a rápida evolução adaptativa demandam determinantes adicionais (MAHER, 2008; PLOMION *et al.*, 2016; SOW *et al.*, 2018; TRONTIN *et al.*, 2021). Com ênfase no fator epigenético, é sugerido por Sow *et al.* (2018)

que esse tenha um papel determinante na resposta à variação ambiental em espécies florestais.

Ao sofrer um período de estresse, como hídrico ou de temperatura, a planta pode desenvolver uma “memória” pelo efeito de preparação (*priming effect*) devido a mecanismos epigenéticos, a qual pode se estender às gerações posteriores (LÄMKE & BÄURLE, 2017; SOW *et al.*, 2018; TRONTIN *et al.*, 2021). Quando relacionado à embriogênese somática, é possível que a aplicação de diferentes regimes de temperaturas na fase de indução possa invocar esta memória, permitindo que as plantas obtidas sejam mais resistentes a estresses abióticos.

Estudos com diferentes espécies florestais vêm sendo realizados. Em *Pinus radiata* o objetivo foi avaliar se o efeito de diferentes tratamentos térmicos (30°C por 4 semanas seguido de mais 4 a 23°C; 50°C por 5 min, seguido de 8 semanas a 23°C; e tratamento controle 23°C por 8 semanas) durante a indução poderia levar a respostas tardias como tolerância ao estresse hídrico em mudas somáticas após regeneração. Os resultados encontrados por Castander-Olarieta *et al.* (2020a) indicaram que o regime de temperatura aplicado retardou os efeitos negativos gerados em condições de seca após a conversão em plantas.

Maiores taxas de maturação de embriões somáticos foram observadas em *Pinus halepensis* Mill. após tratamento a 60°C por 5 min, quando comparadas ao controle a 23°C (PEREIRA *et al.*, 2020). Assim como, em *Picea abies* se constatou que a memória da exposição à temperatura é mantida e regula a formação dos botões e aclimação ao frio (YAKOVLEV *et al.*, 2010, 2012 e 2016), além de possuir a capacidade de modular o tempo de crescimento e a fenologia do botão floral (KVAALEN & JOHNSEN 2008, CARNEROS *et al.*, 2017; TRONTIN *et al.*, 2021).

Esse armazenamento de informações, transmitido dos estágios iniciais da embriogênese somática às plantas regeneradas, pode envolver a transdução de sinal entre o equilíbrio hormonal e a remodelação da estrutura da cromatina levando a alteração na expressão gênica (TRONTIN *et al.*, 2021). Essa “memória epigenética” pode ter importância ecológica futuramente por promover uma resposta, com possível efeito geracional, ao estresse gerado por mudanças climáticas que vêm se tornando mais recorrentes (LÄMKE & BÄURLE, 2017; TRONTIN *et al.*, 2021).

É estimado que atualmente as atividades humanas causaram um aumento no aquecimento global em cerca de  $1,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2$  acima dos níveis pré-industriais, alcançando níveis acima da média global anual em muitas regiões e sendo duas a três vezes maior no Ártico. Entre 2030 e 2052 é estimado que o aquecimento global atinja  $1,5^{\circ}\text{C}$  caso continue neste ritmo acelerado (IPCC, 2018). O declínio florestal em condições de estresse térmico levando à seca foi identificado em várias regiões do mundo (ALLEN *et al.*, 2010).

A epigenética é uma chave importante na adaptação e plasticidade vegetal (SAEZ-LAGUNA *et al.*, 2014; SOW *et al.*, 2018; TRONTIN *et al.*, 2021), a aplicação da possibilidade de “memória epigenética” pela exposição a fatores abióticos estressantes abre um leque de novas alternativas na expressão de características induzíveis e esses mecanismos representam uma fonte rápida para enfrentar tais questões globais (PLOMION *et al.*, 2016; TRONTIN *et al.*, 2021).

### 2.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E METABOLÔMICA

Por ser uma técnica sensível e robusta, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é considerada como o padrão ouro para analisar a expressão gênica. Essa realiza a mensuração da emissão de fluorescência associando à síntese de um amplicon ao longo dos ciclos da reação possibilitando que um fragmento de DNA alvo específico seja quantificado (MORGANTE & BLAWID, 2016). No entanto, essa é nomeada RT-qPCR quando o objetivo é a quantificação do cDNA (i.e., DNA complementar ao RNA mensageiro), tendo como base o processo de transcrição reversa (RT; MORGANTE & BLAWID, 2016).

Há dois métodos básicos para a quantificação gênica: (i) a quantificação absoluta, utilizada na determinação da quantidade exata de uma única sequência alvo - e.g., carga viral ou número de cópias; (ii) quantificação relativa, a qual compara os níveis de expressão de duas sequências (e.g., gene alvo de interesse e gene alvo de referência) em uma amostra teste e outra amostra de referência, expressando a razão desses alvos como resultado (TELLMANN & GEULEN, 2006; MORGANTE & BLAWID, 2016).

Para a comparação que ocorre na quantificação relativa, além do gene de interesse, é necessário um gene de referência que apresente expressão constitutiva (*housekeeping gene*), ou seja, que mantenha constante a sua expressão em todas as condições testadas (TELLMANN & GEULEN, 2006). Como essa permite facilmente a compreensão do comportamento da expressão gênica em duas ou mais condições, é a melhor técnica para determinação dos níveis de expressão de um gene de interesse (TELLMANN & GEULEN, 2006; UDDENBERG *et al.*, 2011; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2011; SCHLÖGL *et al.*, 2012; BRAVO *et al.*, 2017; GRZYBKOWSKA *et al.*, 2018; ARRILLAGA *et al.*, 2019; OSORIO-MONTALVO *et al.*, 2020).

Agregando valor para a compreensão da resposta tecidual em condições abióticas estressantes, os dados gerados pela metabolômica podem trazer informações ricas sobre o estado bioquímico da planta, elucidando as respostas fisiológicas às condições as quais o material vegetal foi exposto (FIEHN *et al.*, 2000; ROESSNER *et al.*, 2001a, b; SUMNER *et al.*, 2003; ROBINSON *et al.*, 2009). E devido aos metabólitos serem produtos da maquinaria celular, a metabolômica é considerada por Trontin *et al.* (2016) como o estudo que resulta nas informações mais funcionais dentre as “ômicas”.

Usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) em plantas, o metaboloma ou perfil metabólico é obtido com alta resolução, boa sensibilidade e repetibilidade (TRONTIN *et al.*, 2016; CANUTO *et al.*, 2018). Essa técnica combina a informação de tempo de retenção e o padrão de fragmentação gerado por meio da ionização por elétrons, possuindo alta credibilidade na identificação dos metabólitos (CANUTO *et al.*, 2018).

Apesar de poucos autores estudarem a ES utilizando a metabolômica, houve sucesso na aplicação dessa por Businge *et al.* (2013) na identificação de processos metabólicos regulando a ES em *Picea abies*. Realizando a comparação de perfis metabólicos de embriões somáticos normais vs. aberrantes, dentre os resultados, identificaram que o principal carboidrato utilizado pelas de linhagens normais na proliferação é a sacarose, enquanto para os fenótipos anormais houve preferência pela frutose.

Observou-se um resultado semelhante com *Picea glauca*, tendo o uso preponderante de sacarose e glicose pelas células nas fases de proliferação e maturação (DOWLATABADI *et al.*, 2009). Neste estudo, a presença de

aminoácidos de cadeia ramificada e da glutamina sugere a síntese e regulação de proteínas, transporte de nitrogênio e assimilação de amônio. Já os teores de prolina, serina e arabitol podem ser indicadores de estresse na proliferação para linhagens de *Pinus taeda* (ROBINSON *et al.*, 2009).

Em um estudo detalhado, Awada e colaboradores (2019) apresentaram os níveis superacumulados e subacumulados dos metabólitos em calos embriogênicos e não embriogênicos em *Coffea arabica* por meio de CG-EM. Neste foram constatados metabólitos pertencentes ao ciclo do TCA; a classe dos polióis; as vias metabólicas do açúcar, dos aminoácidos, dos ácidos graxos e do ascorbato e aldarato. Neste estudo possíveis marcadores metabólicos para a competência embriogênica foram sugeridos: os metabólitos do ciclo do TCA, assim como, o ácido abscísico, maltose, mio-inositol, prolina e zeatina.

Os possíveis marcadores do destino celular associados às principais fases de desenvolvimento na ES, foram apresentados nesse mesmo estudo de Awada *et al.* (2019). Entretanto, de forma discordante dos estudos anteriores, visualizou-se o desligamento das vias metabólicas relacionadas à hidrólise de açúcares na expressão máxima da totipotência. Com isso, fazem-se necessários mais estudos para uma melhor compreensão sobre vias metabólicas utilizadas na embriogênese somática em diferentes espécies e sob fatores estressantes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE PESQUISA

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Cultura de Tecidos e Transformação, Biologia Molecular e de Tecnologia de Produtos Não Madeiráveis da Embrapa Florestas (Colombo, PR).

#### 3.2 EFEITO DA TEMPERATURA E DO GENÓTIPO NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus taeda* E *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*

##### 3.2.1 Material vegetal

Cones imaturos de *Pinus taeda* dos genótipos ADAM 18, 05, 15 FSCE e 28 KLB Mar cedidos pela empresa FRP, localizada no município de Caçador (SC), foram coletados em área dessa localizada no município de Ponte Alta do Norte (SC) em dezembro de 2020. Após a coleta, o material foi embalado em papel Kraft e encaminhado ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação, sendo armazenado em geladeira ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ) até a extração das sementes e o início dos procedimentos.

A assepsia dos cones se deu com a abertura desses, em seguida, as sementes foram levadas para a cabine de fluxo laminar onde foram desinfestadas por imersão em etanol 70% por 50 segundos, imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% por 40 minutos, imersão em tiofanato metílico (*Cercobin 700 WP*) 1,5% por 30 minutos, e finalmente tríplice lavagem em água deionizada e autoclavada.

Após a assepsia e com auxílio de pinça e bisturi, os megagametófitos foram extraídos e introduzidos em placas de Petri (92 x 16 mm) contendo meio de cultura mL<sub>V</sub>, composto por sais e vitaminas do meio mL<sub>V</sub>, suplementado com glutamina (500 mg.L<sup>-1</sup>), caseína hidrolisada (1 g.L<sup>-1</sup>), sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>), Gelrite™ (4 g.L<sup>-1</sup>), 4,5 μM de 6-benzilamino purina (BAP) e 9 μM de ácido diclorofenóxiacético (2,4-D), conforme o protocolo adotado por Nunes *et al.* (2017). O meio teve seu pH ajustado em 5,8 e foi autoclavado a 121°C e 1 atm

de pressão, por 15 minutos. O material foi incubado no escuro em BOD a  $23 \pm 2$  °C.

Além do *Pinus taeda*, foram utilizados megagametófitos do genótipo ESJA36 do híbrido *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, obtidos a partir de cones de uma família pertencente ao Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Florestas. Este material foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação (Embrapa Florestas - PR).

### 3.2.2 Aplicação do estresse térmico

Megagametófitos de *Pinus taeda* (genótipos ADAM 18, 05, 15 FSCE e 28 KLB Mar) e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (genótipo ESJA36), após 1 a 4 semanas da introdução destes aos meios de indução, foram mantidos nas mesmas placas de Petri e submetidos às temperaturas de 15, 23 (controle) e 28°C em estufas de tipo BOD ou ainda submetidos a choque térmico de 60°C por 5 min em estufa pré-aquecida e imediatamente transferidos para BOD (23°C). Todos os tratamentos permaneceram no escuro nas respectivas temperaturas por 10 semanas (Figura 2).

Contudo, do 58º ao 63º dia, os genótipos 05, 15 FSCE, 28 KLB Mar e ESJA36 na temperatura de 28°C permaneceram sob iluminação. Neste mesmo tratamento térmico, a genótipo ADAM 18 permaneceu a 23°C no escuro do 58º ao 62º dia.

O delineamento foi inteiramente casualizado, cada tratamento conteve as seguintes repetições: a 15°C, genótipo ADAM 18 - 4 repetições com 9 explantes em média; genótipo ADAM 18 – 7 repetições com 9 explantes em média; ESJA36 – 3 repetições e 8 explantes em média; 05 – 2 repetições com 10 explantes; 15 FSCE – 3 repetições com 7 explantes em média; 28 KLB Mar – 5 repetições com 10 explantes. A 23°C, genótipo ADAM 18 - 5 repetições com 10 explantes em média; genótipo ADAM 18 – 6 repetições com 10 explantes em média; ESJA36 – 4 repetições e 10 explantes em média; 05 – 3 repetições com 10 explantes; 15 FSCE – 3 repetições com 9 explantes em média; 28 KLB Mar – 5 repetições com 10 explantes. A 28°C, genótipo ADAM 18 - 6 repetições com 10 explantes em média; genótipo ADAM 18 – 6 repetições com 10 explantes em média; ESJA36 – 4 repetições e 10 explantes em média; 05 – 3 repetições com

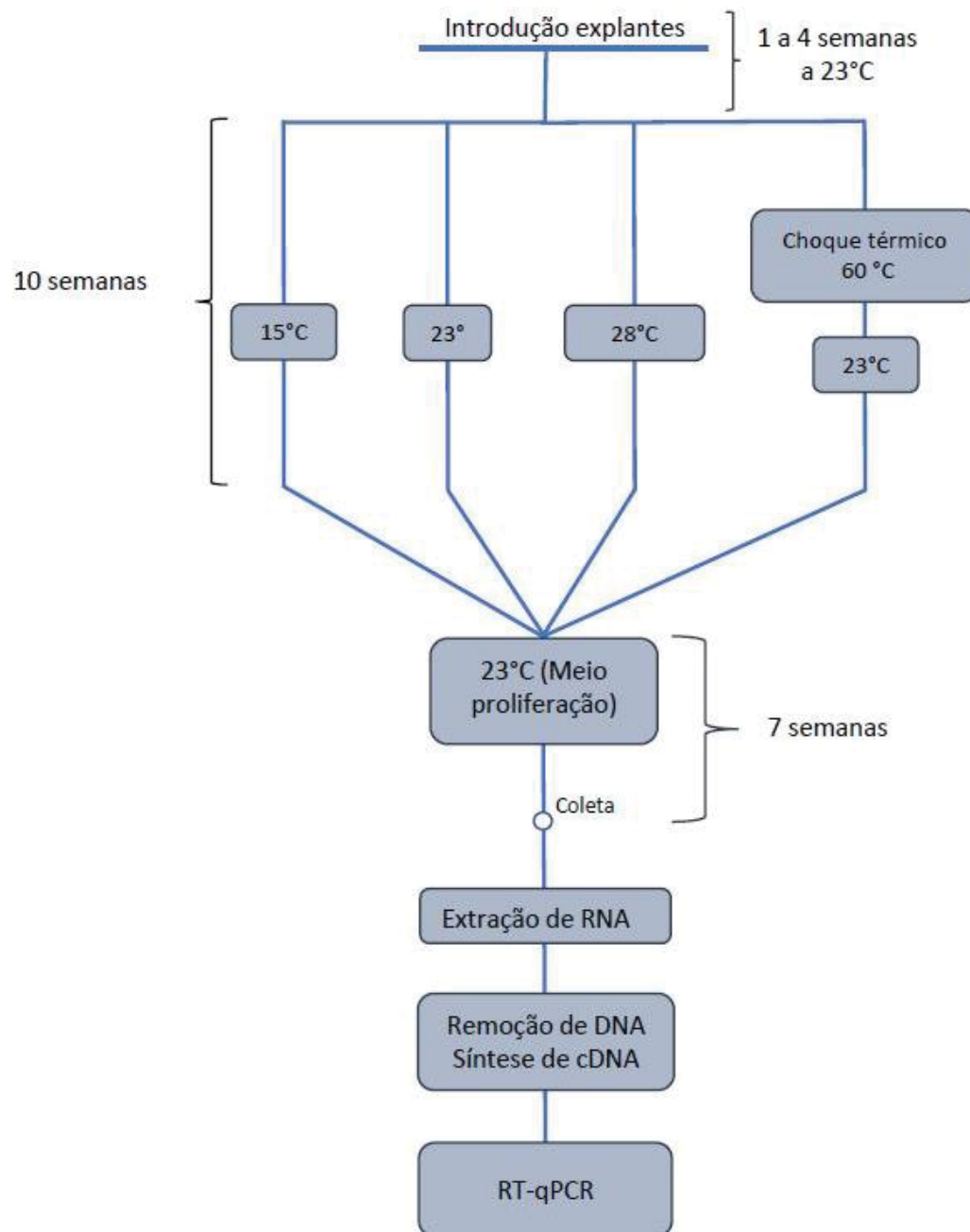
10 explantes; 15 FSCE – 3 repetições com 9 explantes em média; 28 KLB Mar – 4 repetições com 9 explantes em média. E a 60°C, genótipo ADAM 18 - 6 repetições com 9 explantes em média; genótipo ADAM 18 – 6 repetições com 10 explantes em média; ESJA36 – 4 repetições e 10 explantes em média; 05 – 3 repetições com 8 explantes; 15 FSCE – 3 repetições com 5 explantes em média; 28 KLB Mar – 4 repetições com 10 explantes em média.

Ao fim do experimento os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas (MPEs), contabilizando os explantes que apresentaram essas sobre o total, e oxidação, observando MPEs que indicavam mudança na coloração de amarelo claro para escuro sobre o total. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene), ao teste não paramétrico (Kruskal-Wallis) e as médias foram comparadas pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher usando o programa SPSS (versão 2.0).

### 3.2.3 Subcultivo e coleta das massas pró-embriogênicas

Após as 10 semanas sob estresse térmico, foi realizado o subcultivo das MPEs a cada três semanas por sete semanas. Esse foi realizado com auxílio de pinça e bisturi esterilizados, em cabine de fluxo laminar utilizando placas de Petri com o mesmo meio mLV descrito no tópico 3.2.1, sendo mantidas no escuro em estufas de tipo BOD ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Ao final deste, as MPEs ( $600 \pm 20$  mg) foram transferidas com auxílio de pinça para tubos Eppendorf de 2 mL e armazenadas em ultrafreezer ( $- 80^\circ\text{C}$ ) até a extração de RNA das amostras.

**Figura 2.** Esquema da metodologia empregada no experimento efeito da temperatura e do genótipo na indução da embriogênese somática em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*.



### 3.3 EFEITO DA AZACITIDINA NA REAQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA EM LINHAGENS DE *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*

#### 3.3.1 Material Vegetal

Para este experimento, foram utilizadas linhagens de massas pró-embriogênicas (ECL, do inglês *embryogenic cell lines*) obtidas a partir de cones imaturos de uma família do híbrido *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* pertencente ao Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Florestas. Os cones foram coletados em janeiro de 2021. As MPEs foram induzidas a partir de megagametófitos de acordo com o protocolo de Nunes *et al.* (2017) e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação (Embrapa Florestas - PR).

Estas foram inoculadas em placas de Petri com meio mLV, descrito no tópico 3.2.1, e mantidas no escuro em estufas BOD ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ ). As MPEs foram transferidas para novo meio a cada 14 dias com auxílio de pinça em ambiente asséptico de cabine de fluxo laminar. Após o tempo determinado de subcultivos visando o envelhecimento celular, indicado no tópico seguinte, as amostras foram expostas ao agente hipometilante azacitidina.

#### 3.3.2 Aplicação de 5-azacitidina

##### 3.3.2.1 Primeiro experimento

Quatro linhagens (ECL02, ECL04, ECL05 e ECL07) de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* em subcultivo de 12 meses em meio mLV, descrito no tópico 3.2.1, foram selecionadas pelas diferenças quanto à coloração e textura para o primeiro experimento visando avaliar o efeito de 5-azacitidina (5-azaC; Sigma-Aldrich, Alemanha) na competência embriogênica. Sendo as linhagens ECL04 e ECL07; escuras, opacas e compactas e as linhagens ECL02 e ECL05 de coloração branca ou amarela clara e com aspecto friável.

Alíquotas da 5-azaC foram esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio mLV de acordo com as respectivas concentrações de tratamentos 50 e

150  $\mu\text{M}$ , meios sem 5-azaC foram os controles do experimento. Trezentos miligramas de massas pró-embriogênicas frescas foram transferidos para os meios de cultura em placas de Petri e para cada linhagem nas respectivas concentrações, permanecendo nessas durante 10 dias em estufa BOD (23°C) no escuro.

O experimento foi realizado para cada linhagem em duplicata em cada concentração. As coletas foram realizadas após 3 e 10 dias da instalação tendo como objetivos avaliar a resposta das ECLs à 5-azaC com diferentes características de textura e coloração, por meio de teste de citoquímica (tópico 3.4). Para a análise metabolômica via CG-EM (tópico 3.5), MPEs da linhagem ECL05 foram transferidas para tubos Eppendorf de 2 mL, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (- 80°C) por 9 meses, quando foi realizada a análise metabolômica.

#### 3.3.2.2 Segundo experimento

Após 17 meses de subcultivo das linhagens ECL02 e ECL05 em meio mLV, descrito no tópico 3.2.1, foi realizada a repetição do experimento com 5-azaC (Figura 3).

Este experimento ocorreu de acordo com a descrição do primeiro, no subtópico anterior, com poucas modificações. Para cada linhagem, 500 mg de MPEs foram utilizadas em quadruplicata por coleta em cada concentração para a linhagem ECL02 e em duplicata para ECL05, devido a menor quantidade disponível de massa. As massas foram coletadas após 3 e 10 dias da instalação com pesagens a fresco para analisar o crescimento.

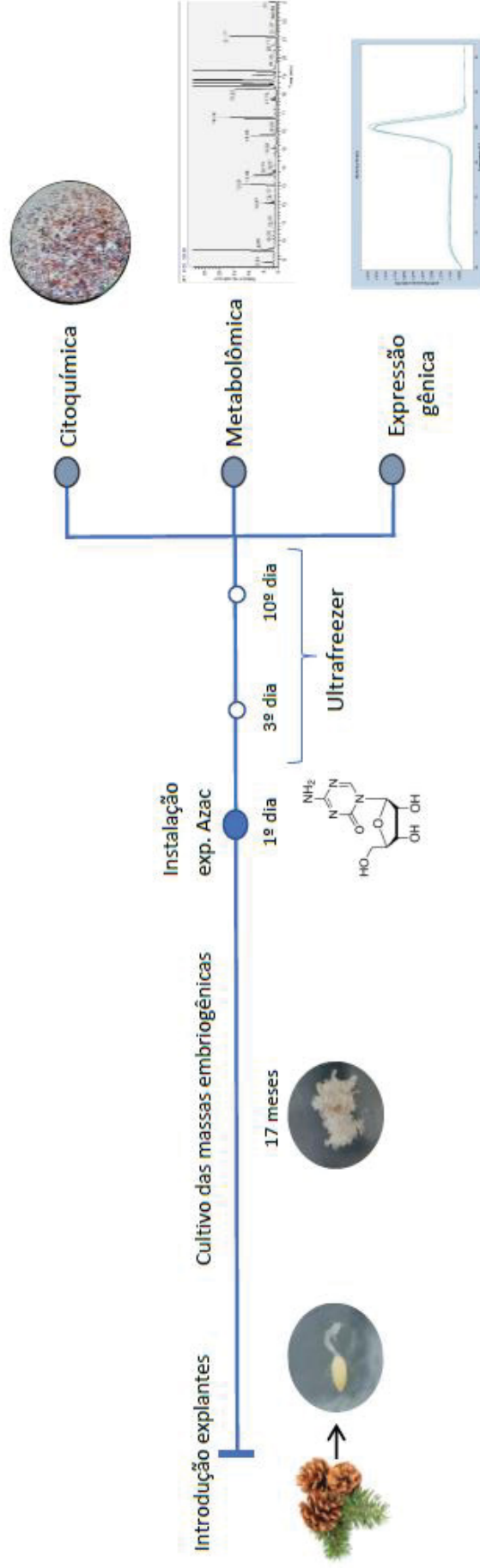
As coletas de ambas as linhagens seguiram para análises: citoquímica (tópico 3.4) e de expressão gênica (tópico 3.6), após transferência e congelamento, como citados anteriormente, por 20 dias quando foram então analisadas por RT-qPCR.

O cálculo da taxa de crescimento entre o peso das MPEs nas coletas e na instalação do experimento, para a linhagem ECL02 em cada concentração, foi realizado de acordo com a Equação 1. Os dados obtidos deste foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade, seguido do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e as médias foram comparadas pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher usando o software RStudio® (versão 1.4.1717) com os comandos e pacotes indicados por Melo *et. al* (2021).

**Equação 1.** Cálculo da taxa de crescimento por concentração. Sendo: Peso (instalação) o peso da massa pró-embriogênica no dia da instalação do experimento; Peso (coleta X) o peso da mesma MPE no dia da coleta, com X sendo 3º ou 10º dia.

$$\Delta \text{Crescimento} = \text{Peso}_{(\text{coleta X})} - \text{Peso}_{(\text{instalação})}$$

**Figura 3.** Esquema da metodologia empregada no segundo experimento de massas pró-embriogênicas de *Pinus elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* linhagens ECL02 e ECL05 submetidas ao agente hipometilante azacitidina (5-azac), com posteriores análises citoquímica, metabolômica e de expressão gênica.



### 3.4 ANÁLISE CITOQUÍMICA DAS LINHAGENS EMBRIOGÊNICAS

Com o objetivo de determinar a competência embriogênica das linhagens de massas pró-embriogênicas em proliferação, foi empregada a análise citoquímica por dupla coloração. Com massas frescas, fez-se uso dos corantes carmim acético a 2% por um minuto e azul de Evans 0,1% por 30 segundos, ambas as etapas seguidas de lavagem com água destilada, de acordo com a metodologia adaptada de Steiner *et al.* (2005). Com auxílio de câmera de aparelho celular acoplada em estereomicroscópio modelo SMZ-161 (Motic) e utilizando o aumento de 0,75, os pró-embriões das MPEs foram contados e as imagens foram capturadas.

A proporção de células coradas por azul de Evans e carmim acético foi avaliada por meio da análise de RGB (do inglês *Red Green Blue*) a qual mensura o nível de píxeis para vermelho e azul utilizando o plugin RGB do software ImageJ (ZHONG *et al.*, 2019). Essa análise estima indiretamente a competência embriogênica das MPEs após duplcoloração, relacionando a quantidade de píxeis vermelhos às células embriogênicas e píxeis azul às células do suspensor.

### 3.5 ANÁLISE METABOLÔMICA POR CG-EM

#### 3.5.1 Reagentes

Para a reação de metoximação o reagente cloridrato de metoxamina foi dissolvido ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) em piridina grau CLAE (Merck, Brasil). Os padrões de  $^{13}\text{C}$ -Sorbitol ( $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e ácido nonadecanóico ( $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) com grau de pureza 97-99% (Sigma-Aldrich, USA) foram diluídos em metanol e clorofórmio respectivamente (Merck, Brasil). Na etapa de sililação foi utilizado o reagente N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA; CAS 24589-78-4) da Sigma-Aldrich (Alemanha).

#### 3.5.2 Extração

As MPEs (ECL05) foram maceradas em nitrogênio líquido e 20 mg ( $\pm 4 \text{ mg}$ ) transferidas para tubos Eppendorf de 2 mL juntamente com 300  $\mu\text{L}$  de metanol (CLAE) refrigerado. Após agitação em vórtex foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de ácido

nonadecanóico e 30  $\mu\text{L}$  de  $^{13}\text{C}$ -Sorbitol para padronização interna quantitativa das fases apolar e polar respectivamente. Em equipamento Thermomixer (Eppendorf), o material permaneceu sob agitação a 950 RPM por 15 min a  $70^\circ\text{C}$ . Após ser resfriado em temperatura ambiente, neste Eppendorf foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio permanecendo no Thermomixer (950 RPM, 5 min a  $37^\circ\text{C}$ , FIEHN *et al.* (2000). Então, água ultrapura (400  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada no tubo precedendo a centrifugação por 7 min a 12000 RPM. Com a separação das fases a parte polar foi transferida para um novo tubo Eppendorf e seca *overnight* em *Speed Vac* (Concentrador plus - Eppendorf, modo V-AQ sem aquecimento). O material extraído foi armazenado a  $-80^\circ\text{C}$  até requerida para a etapa de derivatização.

### 3.5.3 Derivatização

Na reação de metoximação 50  $\mu\text{L}$  de cloridrato de metoxamina em piridina (20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram adicionados ao extrato seco, material preparado na etapa anterior, após agitação em vórtex e incubado em Thermomixer a  $40^\circ\text{C}$  durante 90 min. Em seguida, na reação de siliilação foram adicionados sobre a solução da etapa anterior 50  $\mu\text{L}$  de MSTFA, sendo novamente incubado em thermomixer a  $40^\circ\text{C}$  por 90 min.

### 3.5.4 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

Para as análises cromatográficas se utilizou um cromatógrafo gasoso (Focus GC, Thermo Scientific) com injeção automática (TripPlus AS, Thermo Scientific), acoplado a um espectrômetro de massas de íon trap (Polaris Q, Thermo Scientific). A injeção das amostras ocorreu por divisão de fluxo 1:25 (1 min) e a separação dos compostos foi realizada via coluna cromatográfica modelo DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  Thermo Scientific). A análise foi realizada com fluxo constante e compensação a vácuo com a temperatura do injetor a  $230^\circ\text{C}$ , linha de transferência  $250^\circ\text{C}$  e gás de arraste hélio a  $1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A programação de temperatura interna do forno foi de  $70^\circ\text{C}$  com isoterma de 1 min; e aquecimento  $320^\circ\text{C}$  na taxa de  $8^\circ\text{C}\text{ min}^{-1}$ , isoterma final de 18 min. A operação do espectrômetro de massas decorreu no modo positivo e eletroionização a 70 eV com a temperatura da fonte de íons a  $200^\circ\text{C}$ .

### 3.5.5 Tratamento pós-análise e análise estatística

O software AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution, NIST) foi utilizado para realizar o processo de deconvolução a partir dos cromatogramas gerados pelo software Xcalibur e a identificação dos compostos ocorreu por meio dos espectros de massas, comparação do índice de retenção (IR), de acordo com a plataforma *Golm Metabolome Database* (HUMMEL *et al.*, 2013). As intensidades dos metabólitos (i.e., altura dos picos) foram normalizadas pelo peso das amostras e pelo padrão interno (<sup>13</sup>C-Sorbitol), usando fragmentos (m/z) característicos de cada composto. Para análise quantitativa dos açúcares identificados foi realizada a razão entre a sacarose e as hexoses pela equação: Sacarose / (Glicose + Frutose).

A análise de componentes principais (PCA, dados transformados para log<sub>2</sub>) foi empregada na redução da dimensão e para verificar as semelhanças/diferenças entre as amostras. Na análise estatística dos compostos esses foram inicialmente classificados de acordo com a normalidade e homogeneidade da variância, sendo utilizado o teste estatístico apropriado nas análises, modelo linear generalizado (GLM) ou não paramétrico (NP). Em seguida as médias dos tratamentos foram comparadas por post-hoc testes, adotando o valor de 5% para significância estatística de acordo com Melo *et. al* (2021).

## 3.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE *SERK1* E *LEC1* POR RT-qPCR

A análise de expressão gênica utilizou a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) baseada no processo de transcrição reversa (RT), em amostras dos experimentos intitulados “efeito da temperatura e do genótipo na indução da embriogênese somática em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*” e “efeito da azacitidina na reaquisição de competência embriogênica em linhagens de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*”

### 3.6.1 Desenho e seleção de primers

Primers específicos foram desenhados para a análise da expressão do gene constitutivo *α-tubulin* (*aTUB*, GenBank no. KF158848.1) usando os softwares livres Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2007) e Reverse Complement (software livre

*Bioinformatics.org*). Para os genes de interesse *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 (SERK1)* e *Leafy cotyledon 1 (LEC1)* primers foram selecionados com base em pesquisa bibliográfica (Tabela 1).

**Tabela 1.** Genes para análise de expressão por RT-qPCR.

Gene	Sequência (5'-3' / Forward-Reverse)	Concentração ( $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ )	Fragmento (bp)	Espécie	Referência
<i>SERK1</i> <sup>1</sup>	GGCTTGGCAAACTTATGGA	1,2	228	<i>Pinus radiata</i>	BRAVO <i>et al.</i> , 2017
	GCCTTTAACCCAGTCAAGCA				
<i>LEC1</i> <sup>1</sup>	GCTGAAGGCGATCACAGAG	0,5	200-300	<i>Pinus pinaster</i>	ARRILLAGA <i>et al.</i> , 2019
	AGAACCTGTGATTGAATCCTTG				
$\beta\text{TUB}$ <sup>2</sup>	ATCTGGAGCCGACTGTCA	0,5	75	<i>Pinus taeda</i>	AUTORA, 2021
	TGATAAGCTGTTCAGGATGGAA				

<sup>1</sup>Primers para genes de interesse; <sup>2</sup>Primers para gene constitutivo de referência.

### 3.6.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para o procedimento baseado em CTAB 2% (2% CTAB, 2% PVP-40, 2M NaCl, 1M Tris-HCl pH 8,0, 32 mM EDTA pH 8,0 e 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol adicionado logo antes do uso), este reagente foi inicialmente aquecido em banho maria (65°C) em tubo Falcon. A amostra (500 mg), pulverizada em nitrogênio líquido, foi adicionada ao tampão de extração e incubada a 65°C por 30 minutos com agitação por inversão a cada 5 minutos e, a seguir, permaneceu em temperatura ambiente por 15 minutos.

Adicionou-se clorofórmio:álcool isoamílico (CIA, 24:1 v/v) ao tubo seguido de agitação por inversão durante 10 minutos; logo, foi centrifugado a 4000 RPM por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recuperado com auxílio de micropipeta e realizada uma segunda extração com CIA nas mesmas condições. Prosseguindo com a transferência do sobrenadante para um novo tubo e a adição de cloreto de lítio (10M), após a agitação por inversão o material permaneceu *overnight* em geladeira.

No dia seguinte, o material foi centrifugado a 7400 RPM por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Acrescentou-se SSTE (1M NaCl, 17 mM SDS, 1M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) seguido de transferência para tubo tipo Eppendorf (1,5 mL)

e adição de CIA. Após agitação por inversão, o tubo foi centrifugado a 5000 RPM por 5 minutos a 4°C.

A fase aquosa foi passada para um novo Eppendorf com adição de etanol absoluto, e assim, o conteúdo permaneceu por duas horas em ultrafreezer. Finalizado o tempo foi acrescentado etanol 75% e, sem agitação, seguiu para centrifugação a 12000 RPM (10 min, 4°C). Descartou-se o sobrenadante e o tubo foi levado a *speedvac* (Eppendorf, Alemanha) para secagem durante 15 min em temperatura ambiente.

O *pellet* foi resuspendido em água tratada com DEPC e o RNA foi avaliado quanto à quantidade e pureza (razão 260/280 nm) no equipamento Epoch® (BioTek, EUA), assim como a qualidade da extração em eletroforese com gel de agarose 2% (p/v) e brometo de etídio 0.01% (v/v).

Em seguida, o DNA genômico residual foi removido com o kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, EUA) e realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) com o uso do kit SuperScript® III First-Strand (Invitrogen, EUA), conforme instruções dos respectivos fabricantes.

Todas as soluções citadas foram preparadas com água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC; 0,1% v/v) sob agitação (150 RPM, 37°C) *overnight* e autoclavada a 121°C e 1 atm de pressão por 15 minutos (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### 3.6.3 Análises de expressão gênica

A análise de expressão gênica foi realizada por meio da técnica de PCR quantitativa via transcrição reversa (RT-qPCR) com três replicatas técnicas, usando 26 µL por reação, sendo 4 µL de cDNA (50 ng/µL) e 22 µL de reagentes padronizados do kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master kit (Roche Molecular Biochemicals, Alemanha) com os primers específicos para os genes. As condições da reação foram 95°C por 5 min para pré-incubação, 45 ciclos de 95°C por 30s, 63°C por 30s e 72°C por 10s.

Como referência de expressão, o gene endógeno *aTUB* foi utilizado para realizar o método do Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ) exposto por Livak e Schmittgen (2001; Equação 2), visando a quantificação relativa da expressão dos genes de interesse *SERK1* e *LEC1* (Tabela 1).

Para a determinação da distribuição dos dados de expressão gênica relativa quanto a normalidade se utilizou o teste Shapiro-Wilk, na sequência modelo linear generalizado e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, todos os dados foram estatisticamente testados a 5% de significância utilizando o software RStudio® (versão 1.4.1717) com os comandos e pacotes indicados por Melo *et. al* (2021).

**Equação 2.** Cálculo da expressão relativa pelo método do Ct comparativo exposto por Liviak e Schmittgen (2001). Sendo: (QR) Quantificação Relativa; (Ct) Cycle Threshold; (gi) gene de interesse; (gr) gene de referência.

$$QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra experimental)} - \Delta Ct \text{ (amostra calibradora)}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ (gi)} - Ct \text{ (gr)}$$

## 4 RESULTADOS

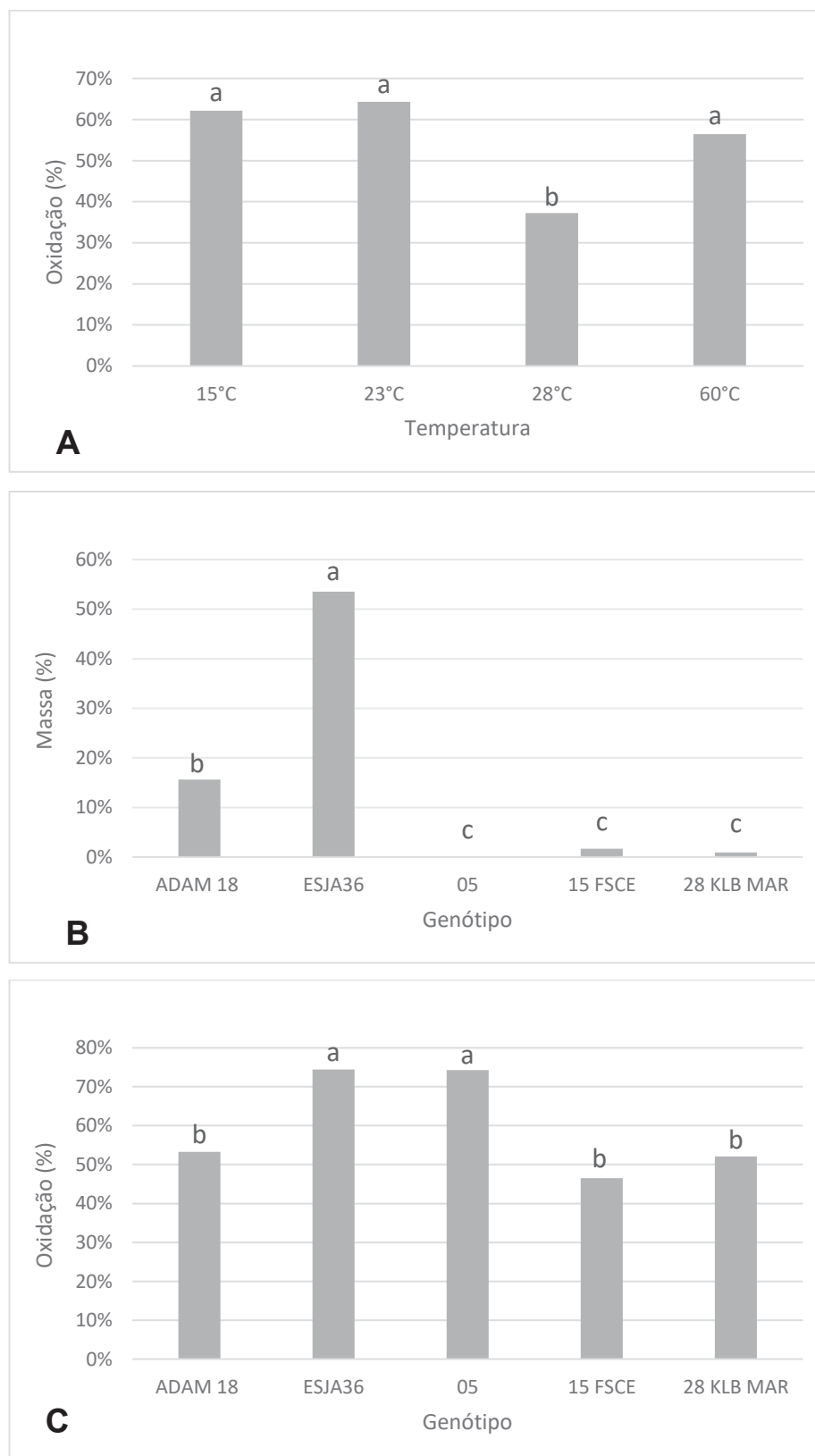
### 4.1 EFEITO DA TEMPERATURA E DO GENÓTIPO NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus taeda* E *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*

#### 4.1.1 Efeito da temperatura e do genótipo

Após 4 semanas no meio de indução, quando comparados os diferentes tratamentos de temperatura, observou-se uma diferença significativa apenas para a variável oxidação dos explantes ( $p < 0,01$ ). Ainda sobre essa, em todos os genótipos houve uma alteração com taxas de 37 a 64% com a menor porcentagem de oxidação no tratamento a 28°C (Figura 4A). A variável porcentagem de massa pró-embriogênica ( $p < 0,01$ ) foi superior nos genótipos ADAM 18 e ESJA36 comparada com os demais genótipos e estatisticamente diferentes entre si (Figura 4B). A porcentagem de explantes oxidados também variou entre os genótipos de 40% a 74% ( $p < 0,05$ ; Figura 4C).

Contaminações por fungo, bactéria e ácaro também foram observadas durante o experimento (dados não apresentados) levando à perda de repetições, as quais foram desconsideradas nas análises estatísticas.

**Figura 4.** Avaliações dos genótipos de *Pinus taeda* (ADAM 18, 05, 15 FSCE, 28 KLB Mar) e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (ESJA36). A) Taxa de massa por genótipo. B) Taxa de oxidação de explantes por genótipo e C) temperatura após 10 semanas de exposição. Médias identificadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Fisher (DMS) a 5% de significância.



#### 4.1.2 Formação de linhagens por genótipo

Após o término do experimento foi identificada a formação de diferentes linhagens celulares embriogênicas (ECL, do inglês *embryogenic cell lines*) apenas para os genótipos ADAM 18 e ESJA36 expostos às diferentes temperaturas (Tabela 2). Devido a maior proliferação, as ECLs: ECL05 (15°C), ECL17 (23°C), ECL15 (28°C) e ECL13 (60°C) do genótipo ADAM 18, foram coletadas e posteriormente analisadas pela técnica RT-qPCR (tópico 4.1.3).

**Tabela 2.** Linhagens celulares embriogênicas (ECL) formadas após experimento efeito da temperatura e do genótipo na indução da embriogênese somática em *Pinus taeda* (genótipo ADAM 18) e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (genótipo ESJA 36).

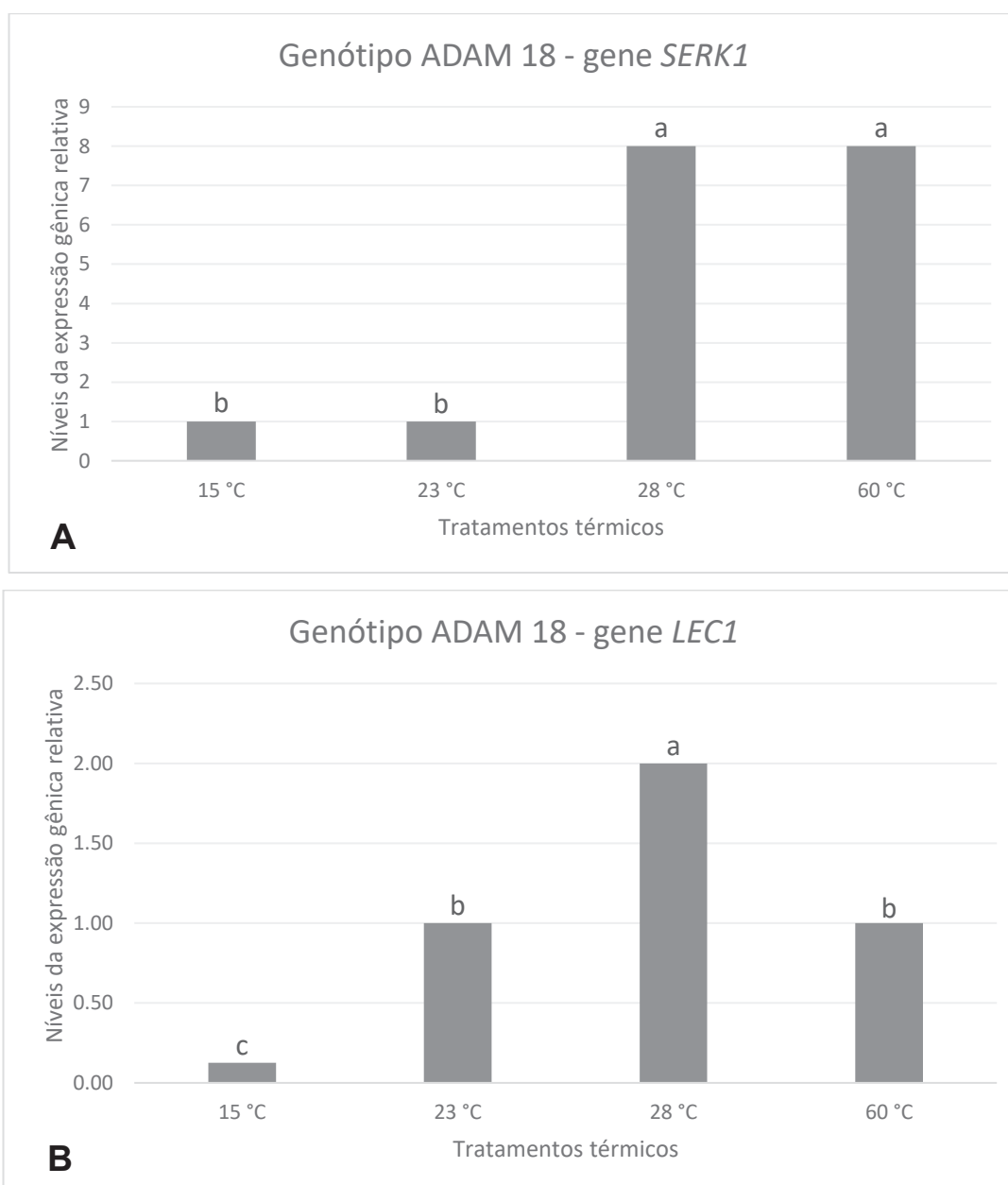
15°C		23°C		28°C	60°C
ADAM 18	ESJA36	ADAM 18	ESJA36	ADAM 18	ADAM 18
ECL2	ECL1	ECL8	ECL2	ECL14	ECL5
ECL3	-	ECL9	ECL13	ECL15	ECL6
ECL5	-	ECL12	-	-	ECL7
-	-	ECL16	-	-	ECL13
-	-	ECL17	-	-	ECL17
-	-	ECL19	-	-	ECL18

#### 4.1.3 Análise de expressão dos genes *SERK1* e *LEC1* em resposta a temperatura

No experimento para avaliação do efeito da temperatura na indução de ES em *Pinus taeda* (genótipo ADAM 18) os genes de interesse exibiram diferentes padrões de expressão quando comparados pelo método do Ct comparativo (Equação 2). Enquanto *SERK1* (Figura 5A) teve um aumento no nível de expressão relativa entre

os grupos (15°C, 23°C) para (28°C, 60°C); a expressão relativa do gene *LEC1* apresentou uma curva, com crescimento e declínio, na variação das temperaturas tendo o seu ápice a 28°C em nível 2 (Figura 5B).

**Figura 5.** Níveis de expressão gênica relativa dos genes A) *SERK1* e B) *LEC1* no genótipo ADAM 18, em relação aos tratamentos térmicos.



## 4.2 EFEITO DA AZACITIDINA NA REAQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA NA ES DE *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*

### 4.2.1 Primeiro experimento - análise citoquímica

A análise citoquímica por dupla coloração de carmim acético e azul de Evans das massas pró-embriogênicas (MPEs) das linhagens ECL04 e ECL07 de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* expostos ao 5-azaC (0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 150  $\mu$ M), apontou o aumento relativo de células coradas pelo azul de Evans em todas as concentrações nas coletas realizadas após 3 e 10 dias da instalação. Esse aumento relativo indica a predominância de células do suspensor comparado a células somáticas nas MPEs dessas linhagens (dados não apresentados). Sendo assim, é possível afirmar que o agente 5-azaC não teve efeito sobre essas linhagens neste grau de envelhecimento celular. Por este motivo, as linhagens não foram utilizadas nos experimentos de análise de metabólitos e expressão gênica.

No entanto, o teste de dupla coloração realizado nas massas de ECL02 e ECL05, expostas ao 5-azaC nas mesmas concentrações, indicou um aumento na proporção de células coradas de vermelho entre coletas no terceiro e décimo dia (dados não apresentados). Resultado que indica visualmente o aumento do número de células somáticas, sugerindo o efeito positivo do 5-azaC na reaquisição de competência dessas linhagens. Logo, as MPEs da ECL05 deste experimento foram utilizadas na análise metabolômica (tópico 4.2.4) e as linhagens ECL02 e ECL05 foram definidas para a repetição do experimento com o objetivo geral da compreensão de expressão gênica por RT-qPCR.

### 4.2.2 Segundo experimento - análise citoquímica, número de pró-embriões e crescimento das massas pró-embriogênicas

No segundo experimento, a partir da análise citoquímica foram observadas as células em menor aumento (Figuras 6 e 7), visando a análise de RGB, e em maior aumento identificando os pró-embriões (Figura 8) com a estrutura bipolar característica, para posterior contagem de acordo com os tratamentos. A análise RGB indicou que não ocorreram mudanças quanto ao aumento de células embriogênicas pelo nível de pixel vermelho para a linhagem ECL02. E analisando o nível para azul,

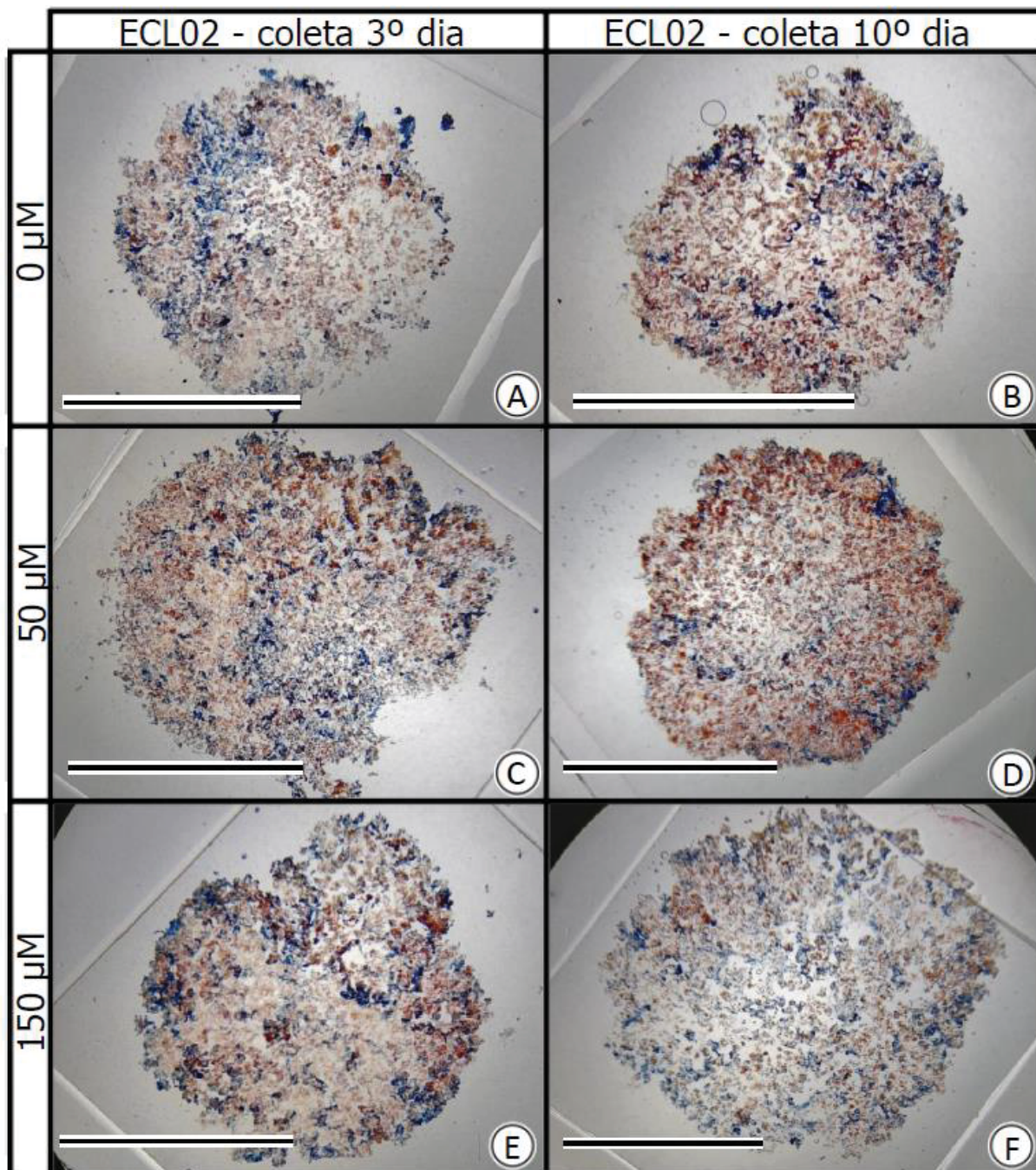
identifica-se na mesma um aumento de células do suspensor a 150  $\mu\text{M}$  de 5-azaC ao comparar as coletas no terceiro e décimo dia (Figura 9A). Contudo, a linhagem ECL05, apresentou um padrão de comportamento distinto. Na concentração de 150  $\mu\text{M}$  de 5-azaC foi observada uma recuperação do potencial de competência embriogênica (Figura 9B), com um aumento na segunda coleta de 16% no nível de píxeis para vermelho em relação ao controle (0  $\mu\text{M}$ ).

As análises estatísticas dos fatores “coletas” e “concentrações de azacitidina” sobre a taxa de crescimento das massas pró-embriogênicas (ECL02) durante o experimento indicaram o efeito estatisticamente significativo apenas dos diferentes tempos das coletas sobre este, tendo um aumento na coleta no décimo dia em todas as concentrações de 5-azaC (Figura 10).

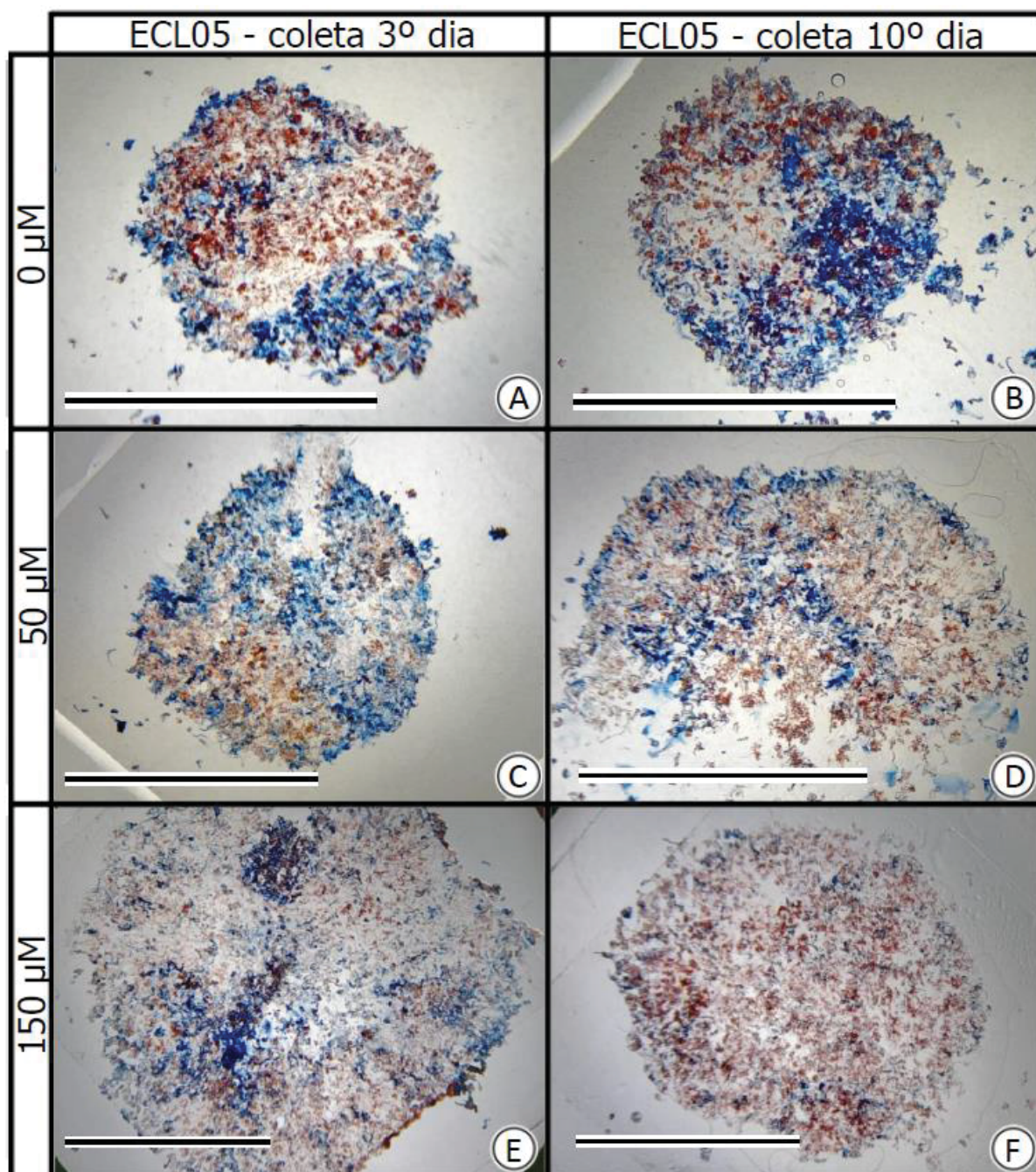
Quando avaliada a variação do crescimento ( $\Delta$  crescimento = peso final [g] – peso inicial [g]) entre as coletas de uma mesma concentração é identificada uma queda no crescimento das MPEs, linhagem ECL02, com o aumento da concentração de 5-azaC. Os resultados desse cálculo indicam aumento de crescimento em 86% no tratamento a 0  $\mu\text{M}$ , 81% a 50  $\mu\text{M}$  e 55% a 150  $\mu\text{M}$ .

A contagem de pró-embriões indicou um aumento desses para as linhagens ECL02 e ECL05 nos tratamentos a 50 e 150  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Tabela 3). No controle, em ambas as linhagens, houve uma redução do número de pró-embriões entre as coletas realizadas e a estrutura bipolar característica não foi encontrada nas MPEs coletadas no décimo dia do experimento.

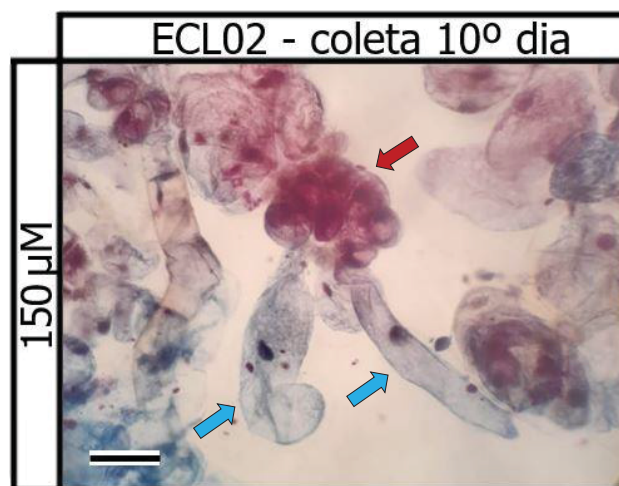
**Figura 6.** Análise citoquímica de massas pró-embriogênicas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, linhagem ECL02, coradas com carmim acético e azul de Evans após exposição ao agente hipometilante azacitidina (controle, 50  $\mu$ M e 150  $\mu$ M) sendo coletadas em dois tempos a partir do início do experimento, no terceiro e décimo dia. As imagens foram capturadas com câmera de aparelho celular acoplada em estereomicroscópio modelo SMZ-161 (Motic) com aumento 0,75. Barras de escala: A - F 100  $\mu$ m.



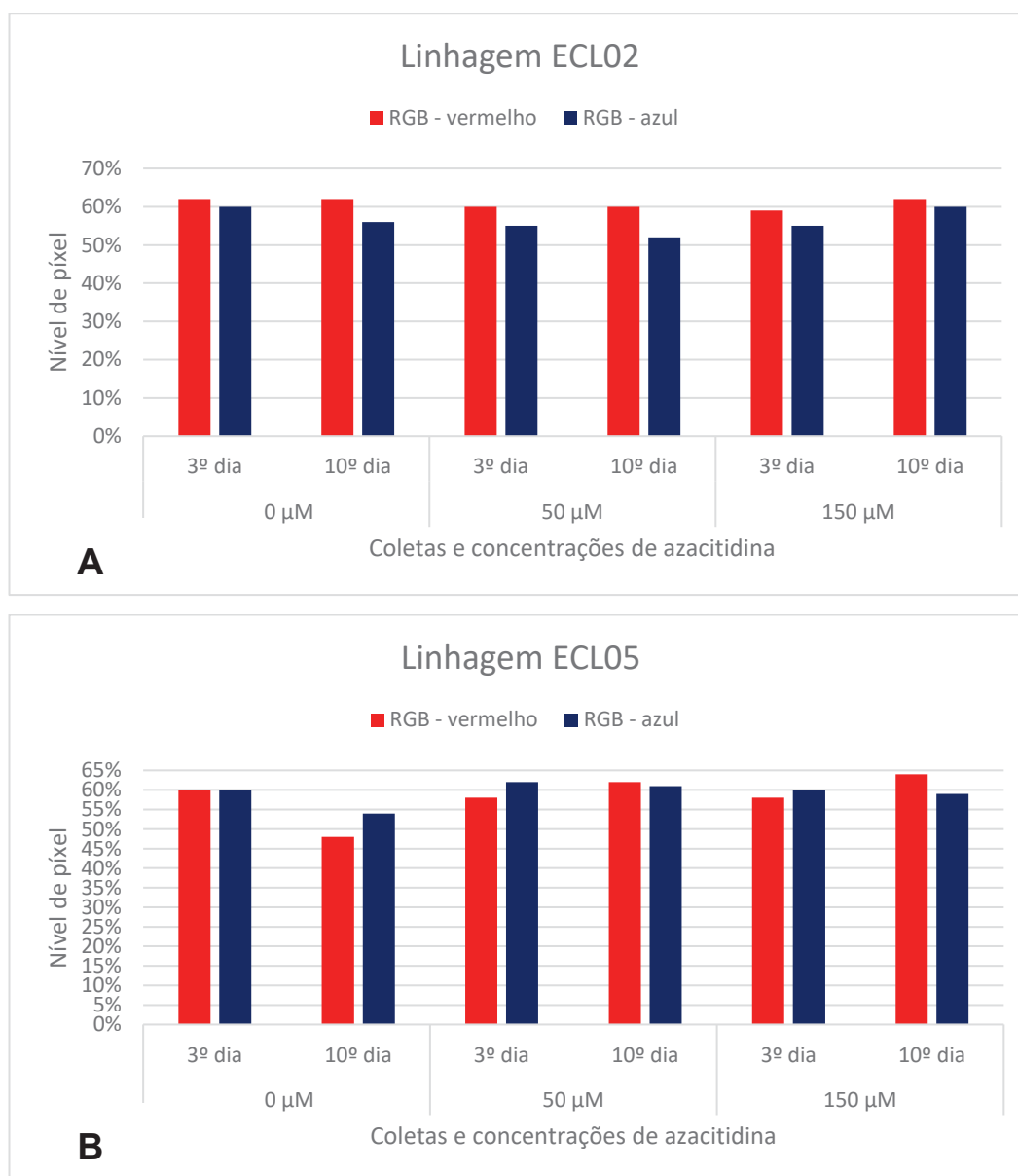
**Figura 7.** Análise citoquímica de massas pró-embriogênicas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* linhagem ECL05, coradas com carmim acético e azul de Evans após exposição ao agente hipometilante azacitidina (controle, 50  $\mu$ M e 150  $\mu$ M) sendo coletadas em dois tempos a partir do início do experimento, no terceiro e décimo dia. As imagens foram capturadas com câmera de aparelho celular acoplada em estereomicroscópio modelo SMZ-161 (Motic) com aumento 0,75. Barras de escala: A - F 100 $\mu$ m.



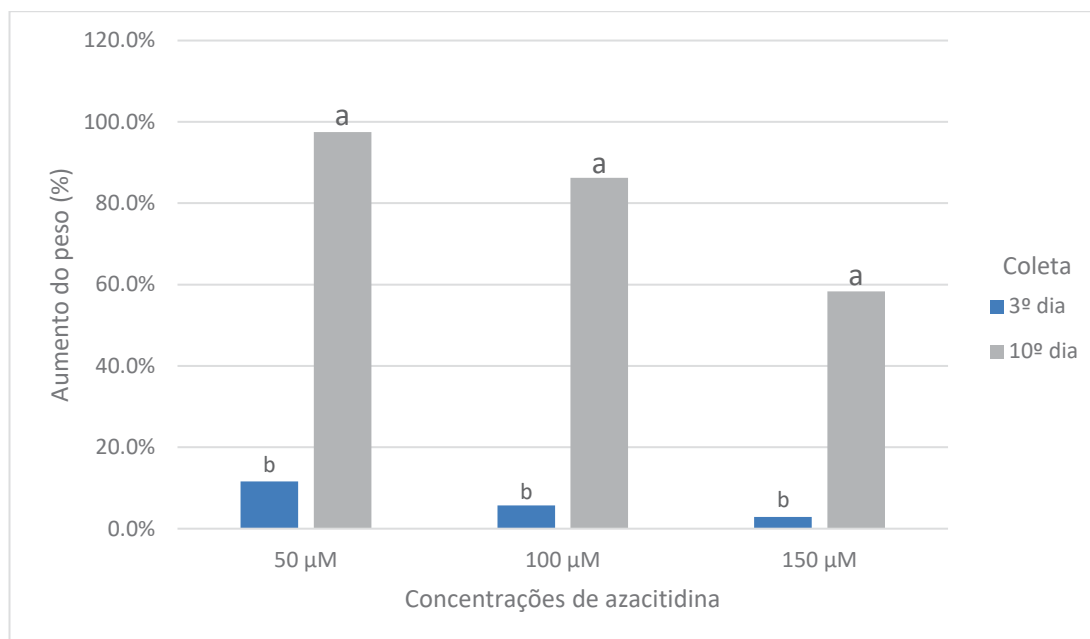
**Figura 8.** Pró-embrião identificado em massa pró-embriogênica de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* linhagem ECL02 após exposição à azacitidina (150  $\mu$ M – coleta no 10<sup>o</sup> dia). Estruturas coradas: células embriogênicas – corante carmim acético (seta vermelha) e células do suspensor – azul de Evans (seta azul). Imagem capturada com câmera de aparelho celular acoplada em microscópio óptico (Coleman) com objetiva de 10x. Barra de escala: 100 $\mu$ m.



**Figura 9.** Nível de píxeis para vermelho e azul obtido a partir análise de RGB nas imagens da análise citoquímica pelo software ImageJ, de acordo com as coletas e concentrações para as linhagens de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* A) ECL02 e B) ECL05.



**Figura 10.** Taxa de crescimento de massas pró-embriogênicas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, linhagem ECL02, de acordo com a concentração do agente hipometilante azacitidina e as coletas durante o experimento.



**Tabela 3.** Número de pró-embriões nas massas pró-embriogênicas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, de acordo com a linhagem, o tratamento pela concentração de azacitidina e as coletas durante o experimento.

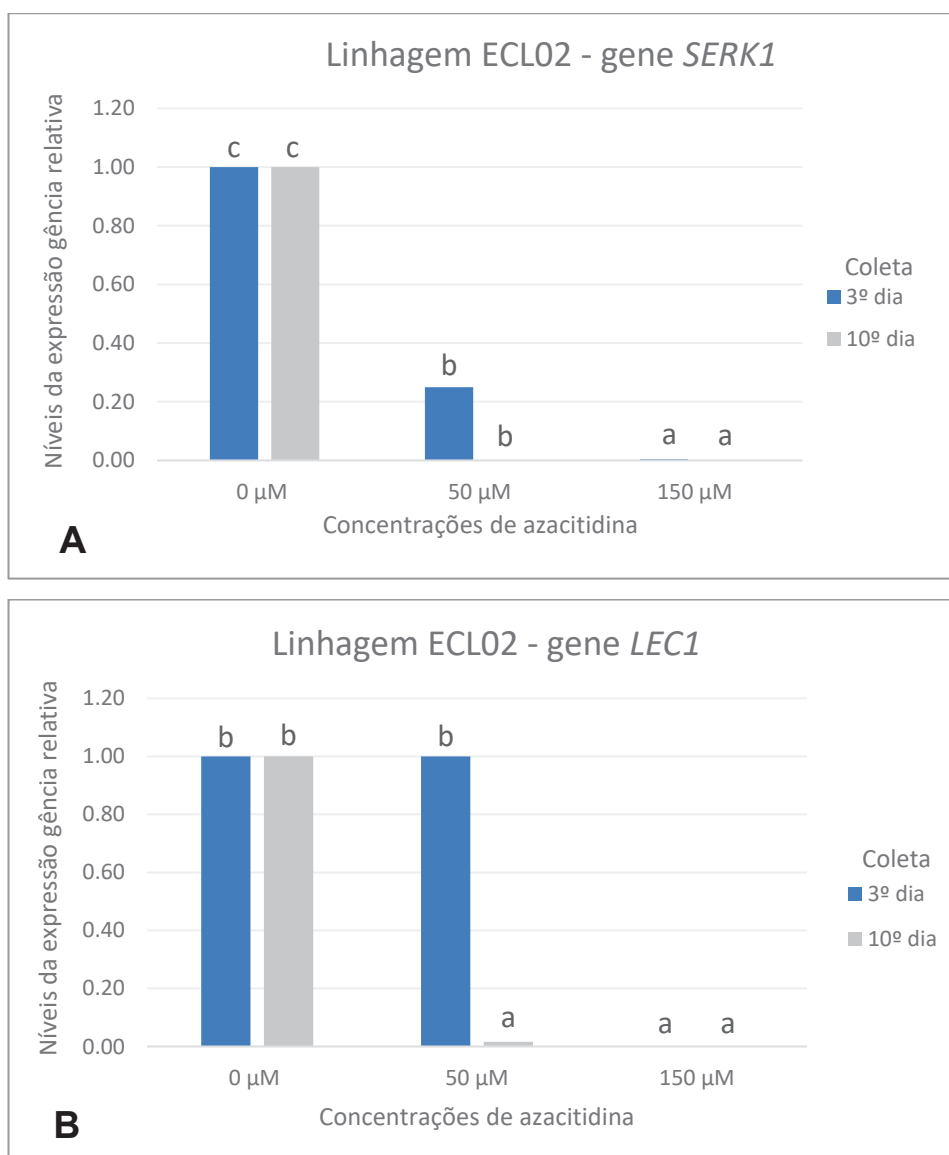
Linhagem	Tratamento (µM)	Coleta (dia)	Nº de pró-embriões
ECL02	0	3º	3
		10º	0
	50	3º	1
		10º	3
	150	3º	7
		10º	5
ECL05	0	3º	8
		10º	0
	50	3º	4
		10º	7
	150	3º	0
		10º	9

#### 4.2.3 Análise de expressão dos genes *SERK1* e *LEC1* em resposta ao agente azacitidina

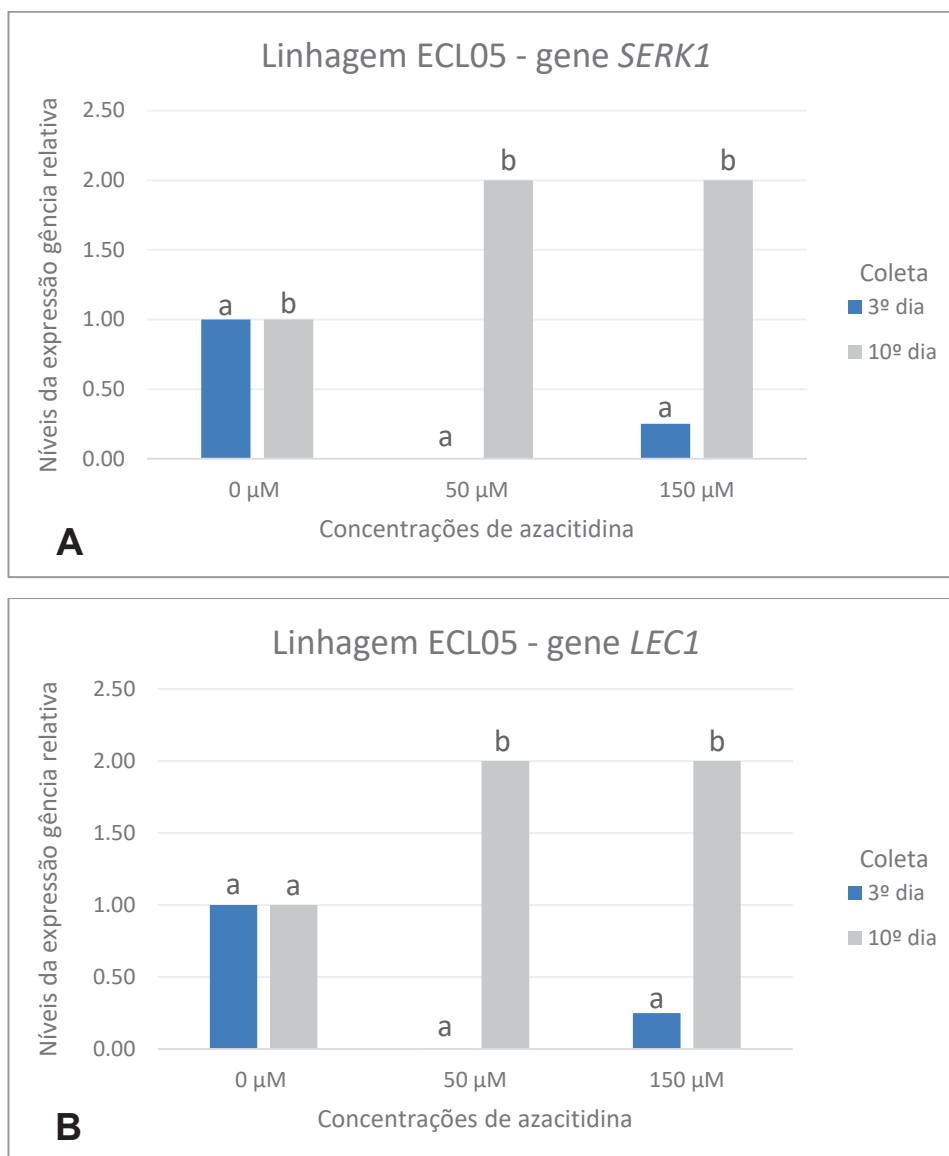
Os resultados de expressão relativa obtidos pelo método do Ct comparativo (Equação 2) indicaram que os fatores “coleta” e “concentração” não demonstraram interação sobre a expressão dos genes de interesse relacionados a ES. Por meio da

análise dos gráficos (Figuras 9 e 10), identificou-se uma tendência a padrões nos níveis de expressão gênica relativos para *SERK1* e *LEC1* dentro das duas linhagens. Em massas de ECL02, tratadas com 5-azaC a 50  $\mu\text{M}$ , foi observado um declínio da expressão relativa em ambos os genes em comparação ao controle (Figura 11) e, no tratamento a 150  $\mu\text{M}$ , a expressão foi próxima a nulidade. Para a linhagem ECL05 foi observado o oposto, os níveis de expressão relativa aumentaram em 50  $\mu\text{M}$  e 150  $\mu\text{M}$  na coleta 2 quando comparados ao controle (Figura 12). Contudo, nesse caso não houve diferença estatística entre os resultados.

**Figura 11.** Níveis de expressão gênica relativa dos genes **A) *SERK1*** e **B) *LEC1*** em *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, linhagem ECL02, em relação às concentrações de azacitidina e coletas realizadas durante o experimento.



**Figura 12.** Níveis de expressão gênica relativa do gene **A) *SERK1*** e **B) *LEC1*** em *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*, linhagem ECL05, em relação às concentrações de azacitidina e coletas realizadas durante o experimento.



#### 4.2.4 Análise metabolômica de massas pró-embriogênicas tratadas com azacitidina

Para análise do perfil metabólico das massas pró-embriogênicas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* linhagem ECL05 tratadas com agente hipometilante, foi empregada a técnica de perfil metabólico baseada em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Para uma melhor compreensão da fisiologia, foi adicionada na análise uma MPE jovem como controle positivo com competência comprovada por análise citoquímica (dupla coloração de carmim acético e azul de Evans).

Neste experimento foram detectados 40 compostos na análise com CG-EM, dentre esses 38 foram identificados (95%). No intuito de diminuir a dimensão das variáveis e buscar semelhanças e diferenças entre as amostras, realizou-se as análises de componentes principais (PCA) resultando nos componentes PC1 e PC2 que quando somados explicaram 74% dos dados do sistema (Figura 13).

Os *scores* de PC1 (53%) mostraram a separação das massas em dois grupos de acordo com os tratamentos com 5-azaC: (i) MPE jovem junto a massas expostas a 150  $\mu$ M (A15\_C1), com valores negativos em PC1; e (ii) controle negativo 0  $\mu$ M (A0\_C1 e A0\_C3) somado às massas expostas a 50  $\mu$ M (A5\_C1 e A5\_C3; Figura 13), com valores positivos em PC1. E os *scores* de PC2 (21%) indicaram a formação de grupos seguindo as concentrações do tratamento com 5-azaC (valores positivos em PC2). O fator coleta apresentou valores próximos as entre os tratamentos indicando uma menor influência no experimento. Dessa forma, as coletas não tiveram relevância no processo, sendo consideradas como replicatas nas análises estatísticas posteriores (Figura 13).

Com as massas pró-embriogênicas do experimento apresentando um perfil de fração polar enriquecida para metabólitos primários, estes foram dispostos na Tabela 4 seguindo a classificação pela análise de componentes principais (PC1 ou PC2), índice de retenção (IR) de acordo com a plataforma Golm Metabolome Database (Hummel *et al.*, 2013), nomenclatura, classe química, via metabólica e fragmentos (m/z) característicos usados na identificação e quantificação.

Prossequindo as análises estatísticas, verificou-se 17 compostos significativos pertencentes à classe dos ácidos orgânicos, representados pelos ácidos: láctico, glicólico, succínico, chiquímico, cítrico e quínico; classe aminoácidos: alanina, valina, serina, ácido glutâmico e glutamina; classe açúcares: frutose, glicose,

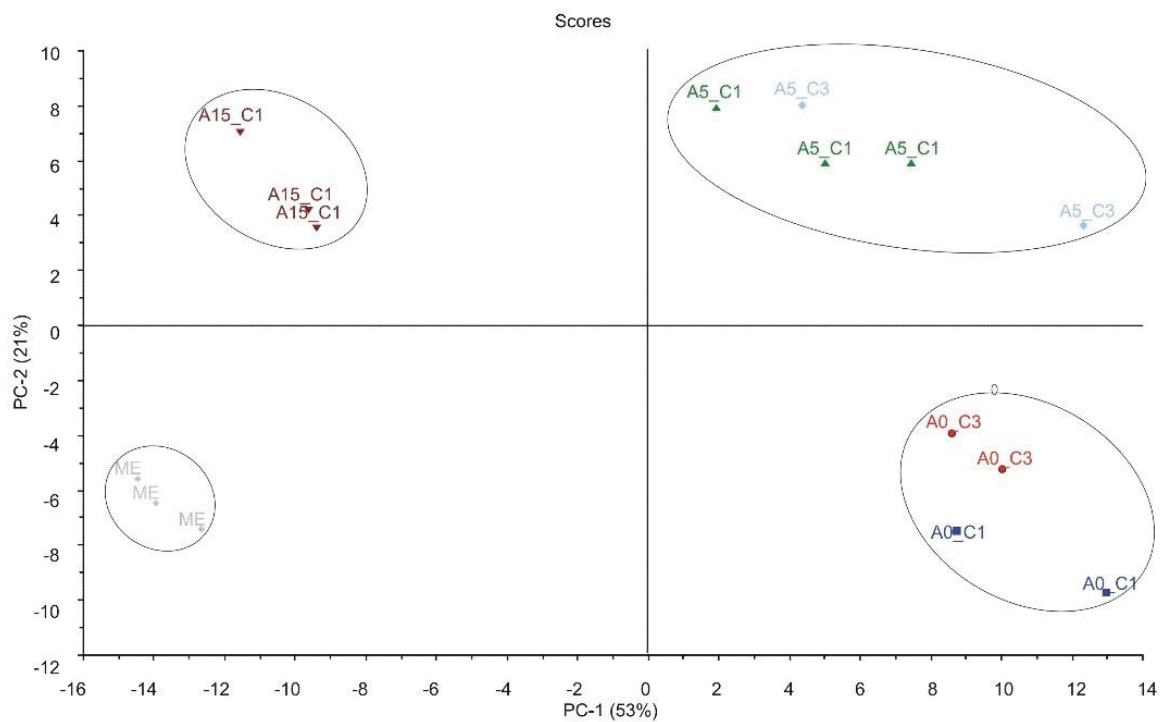
sacarose. Assim como, o composto putrescina pertencente à classe dos nitrogênios orgânicos; ácido glucônico, classe dos ácidos de açúcar e catequina pertencente aos fenóis. Os resultados para os açúcares frutose com IR 1862,0 e 1871,7; glicose com IR 1871,7 e 1905,2 (Tabela 4) representam os isômeros cis e trans oriundos do processo de derivatização por metoximação, é esperado que eles apresentam os mesmos resultados. Dessa forma, para cada açúcar serão discutidos somente os resultados do composto de menor IR.

Alguns dos compostos apresentaram padrões nas suas concentrações, dessa forma, foram organizados em grupos. No grupo 1 – referente ao metabolismo de açúcares, a frutose e glicose tiveram concentrações próximas a zero na MPE jovem e não diferiram estatisticamente do controle a 0  $\mu\text{M}$ . Já a sacarose exibiu a sua maior concentração na MPE jovem e na concentração de 150  $\mu\text{M}$  (Figura 14). O grupo 2 – metabolismo de aminoácidos, apresentou elevados teores no controle (0  $\mu\text{M}$ ) e na concentração de 5  $\mu\text{M}$  de 5-azaC e declínio no tratamento a 150  $\mu\text{M}$  e na MPE jovem. Pertencem a esse grupo: os aminoácidos alanina, ácido glutâmico, valina, serina e glutamina (Figura 15). Grupo 3 - ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), composto pelos ácidos cítrico e succínico (Figura 16), indicaram as maiores concentrações no controle dos tratamentos (0  $\mu\text{M}$ ) e na MPE.

Finalizando, o composto putrescina teve baixas concentrações nos tratamentos com 5-azaC e sua maior concentração na MPE jovem, como apresentado na figura 17.

Como mencionado anteriormente, poucos autores estudaram a embriogênese somática (ES) utilizando a metabolômica. Apesar de serem significativos para o experimento os ácidos glicólico, láctico, chiquímico, quínico, glucônico e o composto catequina não serão discutidos diretamente por não apresentarem informações prévias associadas à ES em literatura.

**Figura 13.** Scores dos dois primeiros componentes principais do conjunto de amostras de calos de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* linhagem ECL05, expostos a diferentes concentrações de azacitidina. ME= massa pró-embriogênica jovem; A0\_C1: massa a 0  $\mu$ M coletada no 3º dia, A0\_C3= massa a 0  $\mu$ M coletada no 10º dia; A5\_C1= massa a 50  $\mu$ M coletada no 3º dia, A5\_C3= massa a 50  $\mu$ M coletada no 10º dia; A15\_C1= massa a 150  $\mu$ M coletada no 3º dia.

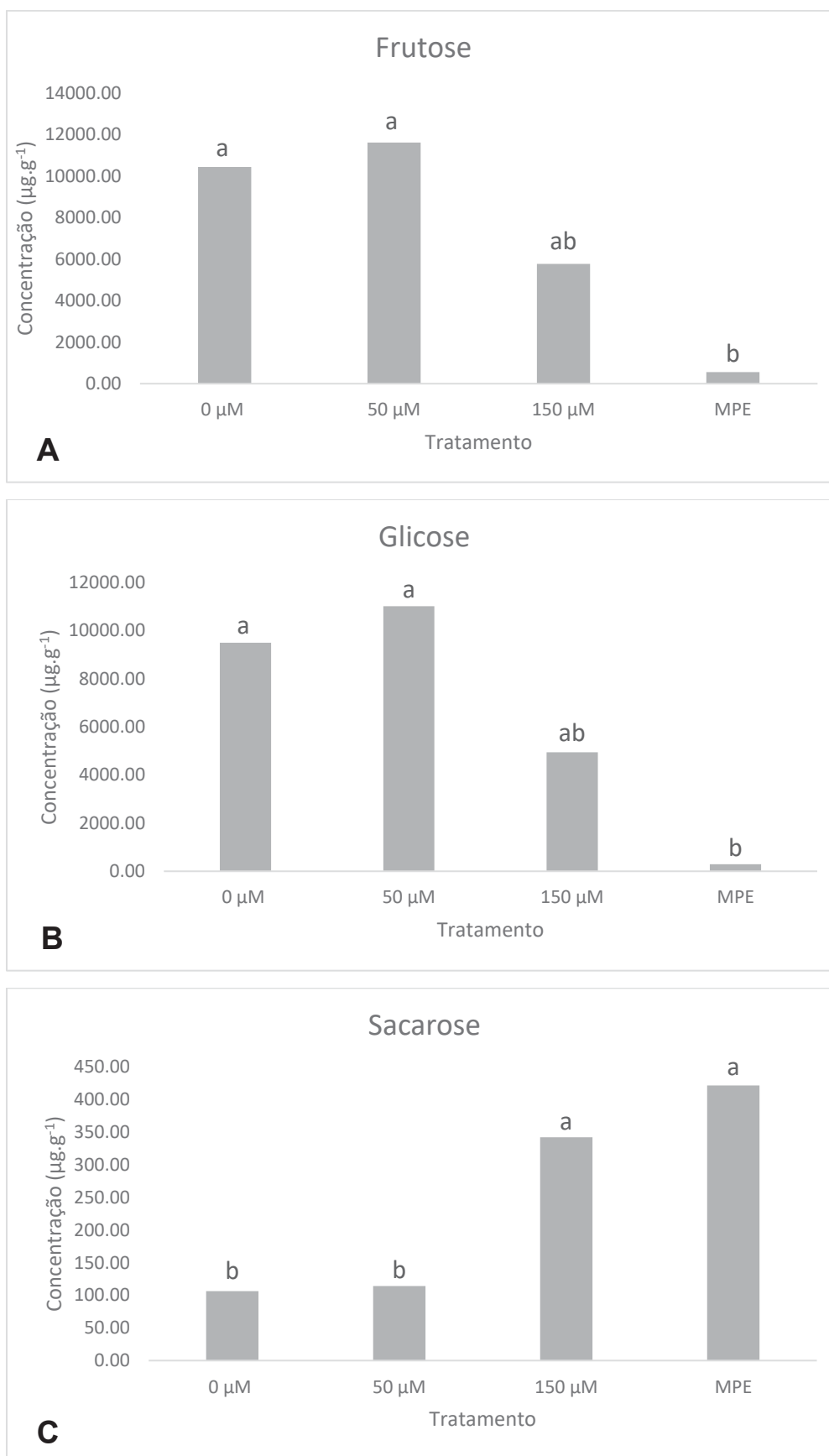


**Tabela 4.** Compostos identificados em massas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* submetidas a diferentes concentrações de azacitidina e coletadas em dois tempos diferentes, com uma massa pró-embriogênica jovem.

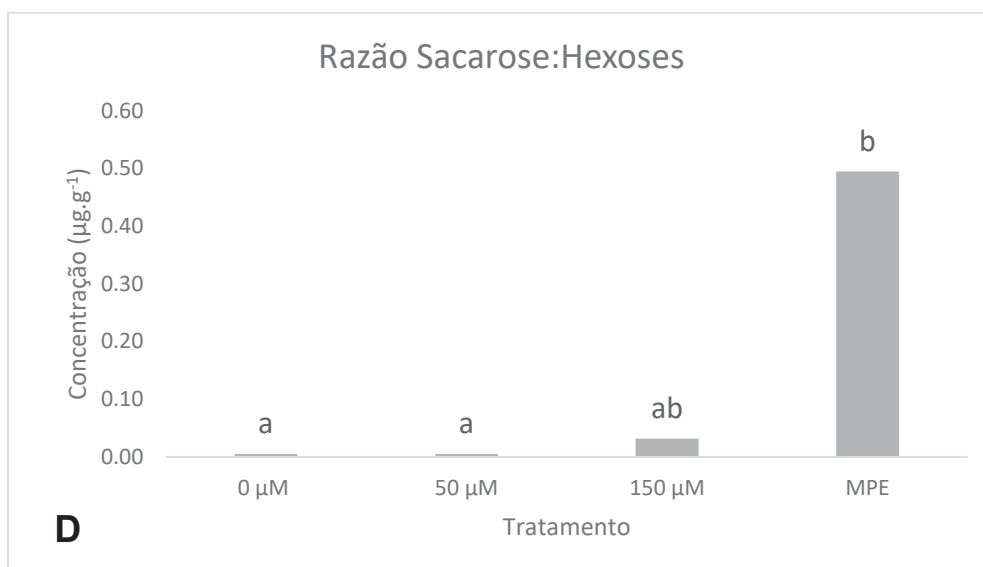
PC	IR	Nome	Classe	Via metabólica	Fragmentos (m/z)		
					m/z (1)	m/z (2)	m/z (3)
1	1053,1	<b>Ácido láctico*</b>	Ácido orgânico	Metabolismo anaeróbico	219	191	147
1	1076,6	<b>Ácido glicólico*</b>	Ácido orgânico	Fotorrespiração	205	177	147
1	1097,9	<b>Alanina*</b>	Aminoácido	Aminoácidos	218	190	147
1	1155,8	Álcool benzílico	Aromático	Chiquimato	180	165	135
1	1209,6	<b>Valina*</b>	Aminoácido	Aminoácidos	218	144	100
1	1248,7	Ácido benzoico	Aromático	Chiquimato	179	135	105
1	1291,9	Prolina	Aminoácido	Aminoácidos	216	142	73
1	1299,7	Glicina	Aminoácido	Aminoácidos	276	248	174
2	1311,1	<b>Ácido succínico**</b>	Ácido orgânico	Ciclo do ácido tricarbóxico (TCA)	247	172	147
1	1326,6	Semelhante a lumicromo	Nitrogênio orgânico	Metabolismo da riboflavina	285	227	184
1	1352,4	Alanina	Aminoácido	Aminoácidos	290	262	188
1	1353,7	<b>Serina*</b>	Aminoácido	Metabolismo da glicina, serina e treonina	306	218	204
1	1356,6	Ácido nonanóico	Ácido orgânico	β-oxidação	215	129	117
1	1418,5	NA_1415,51	desconhecido	desconhecido	228	217	184
1	1422,2	β - alanina	Aminoácido	Aminoácidos	290	248	174
1	1515,6	Ácido 1-pirrolina-3-hidroxi-5-carboxílico	Nitrogênio orgânico	Aminoácidos	258	230	156
1	1552,3	Ácido treônico	Ácido de açúcar	Metabolismo de ascorbato e aldarato	319	292	220
1	1614,3	<b>Ácido glutâmico*</b>	Aminoácido	Aminoácidos	348	246	230
2	1731,7	<b>Putrescina**</b>	Nitrogênio orgânico	Metabolismo de arginina e prolina	214	174	86
1	1768,8	<b>Glutamina**</b>	Aminoácido	Aminoácidos	348	246	230
2	1804,8	<b>Ácido chiquímico**</b>	Ácido orgânico	Chiquimato	372	282	204
2	1812,8	<b>Ácido cítrico*</b>	Ácido orgânico	Ciclo do ácido tricarbóxico (TCA)	375	273	257
2	1849,6	<b>Ácido quínico*</b>	Ácido orgânico	Chiquimato	372	345	255
1	1862,0	<b>Frutose*</b>	Açúcar	Metabolismo do açúcar	364	307	217
1	1871,7	<b>Frutose*</b>	Açúcar	Metabolismo do açúcar	364	307	217
1	1887,9	<b>Glicose*</b>	Açúcar	Metabolismo do açúcar	319	217	205
1	1905,2	<b>Glicose*</b>	Açúcar	Metabolismo do açúcar	319	217	205
2	1987,6	<b>Ácido glucônico**</b>	Ácido de açúcar	Metabolismo de fosfato de inositol	333	292	204
1	2624,9	<b>Sacarose**</b>	Açúcar	Metabolismo do açúcar	437	361	217
1	2870,5	<b>Catequina***</b>	Fenol	Compostos fenólicos	368	355	267

Os compostos indicados em negrito se mostram significativos a \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

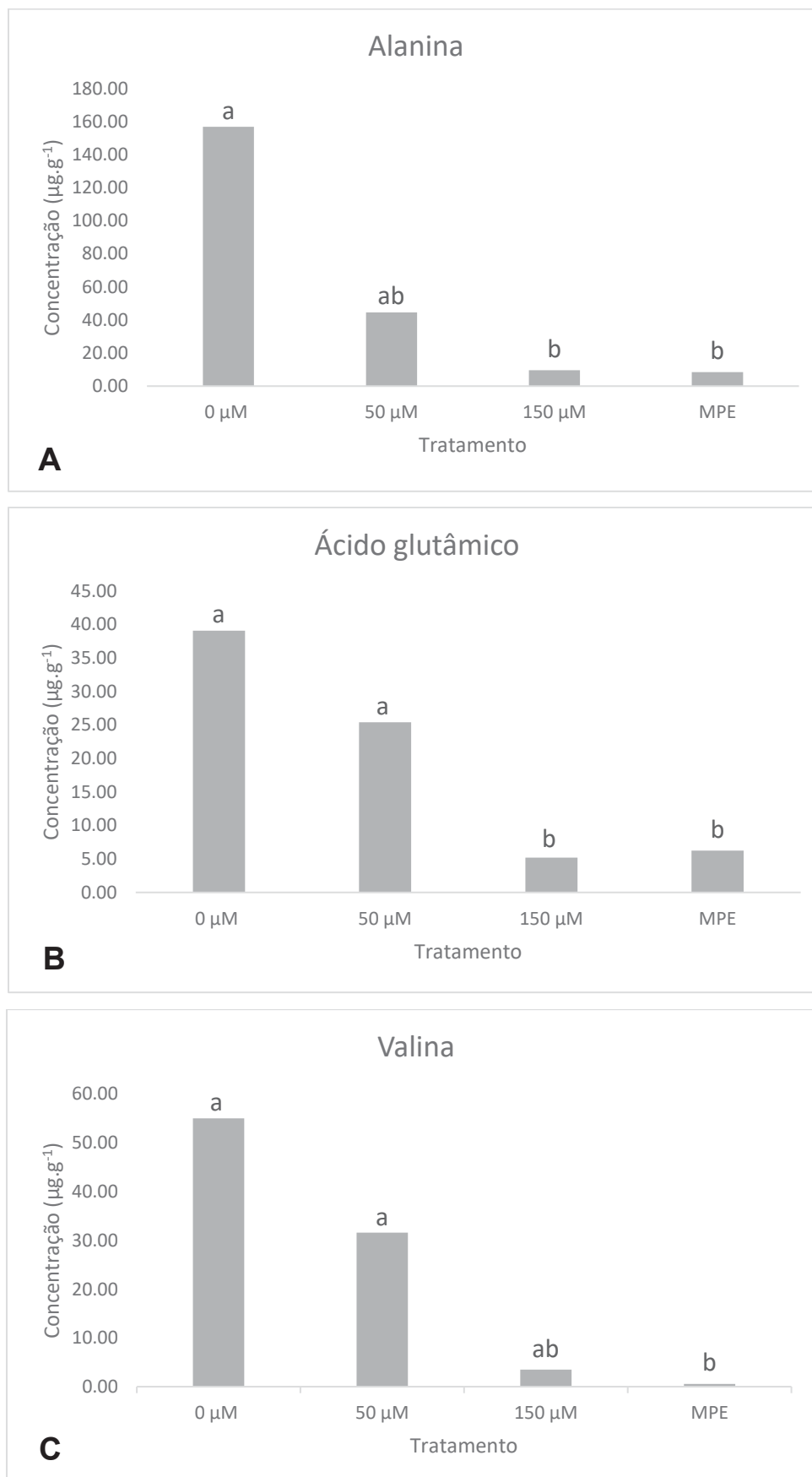
**Figura 14.** Grupo 1. Variação da concentração de A) frutose, B) glicose, C) sacarose e D) razão entre sacarose e hexoses em massa pró-embriogênica jovem (MPE) de *Pinus elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* em função das concentrações de azacitidina (CONTINUA).



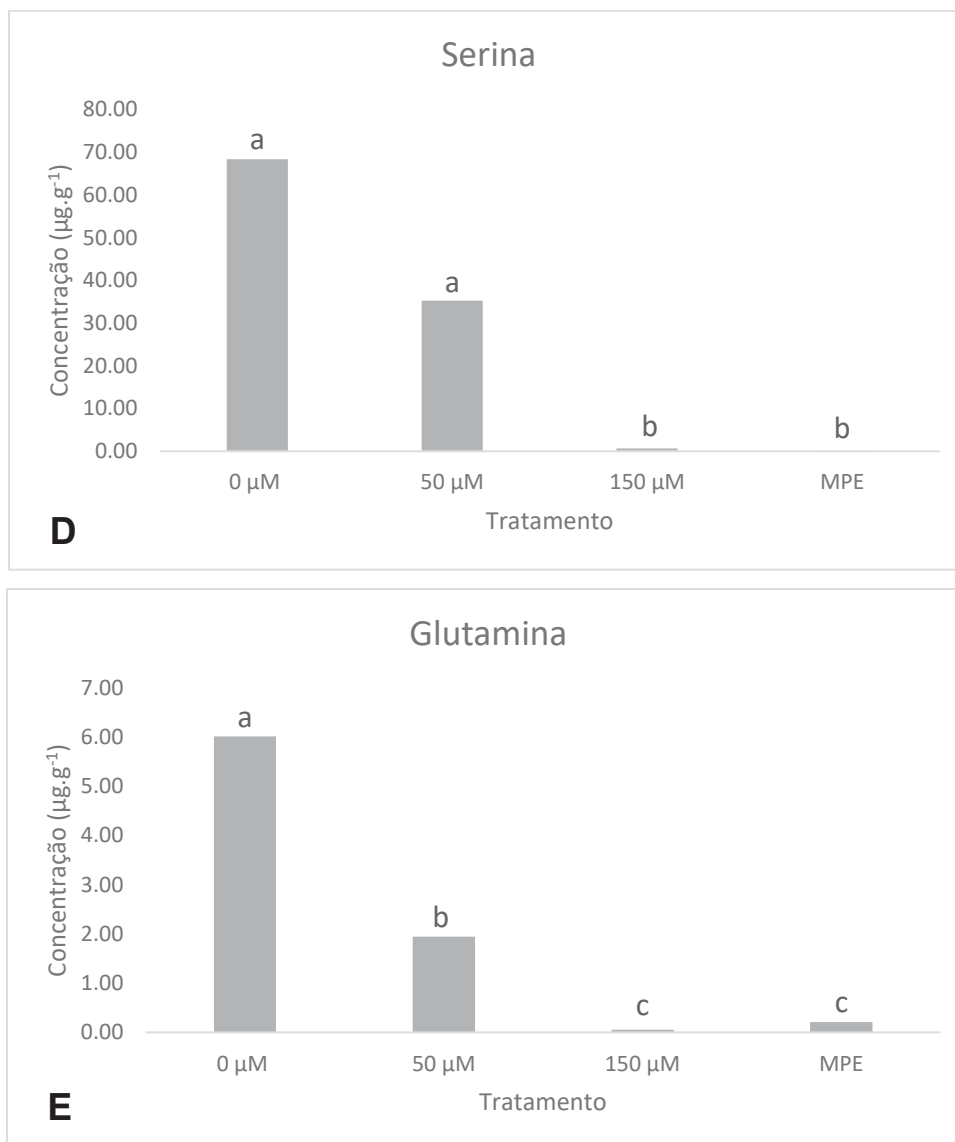
**Figura 14.** Grupo 1. Variação da concentração de A) frutose, B) glicose, C) sacarose e D) razão entre sacarose e hexoses em massa pró-embriogênica jovem (MPE) de *Pinus elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* em função das concentrações de azacitidina (CONCLUSÃO).



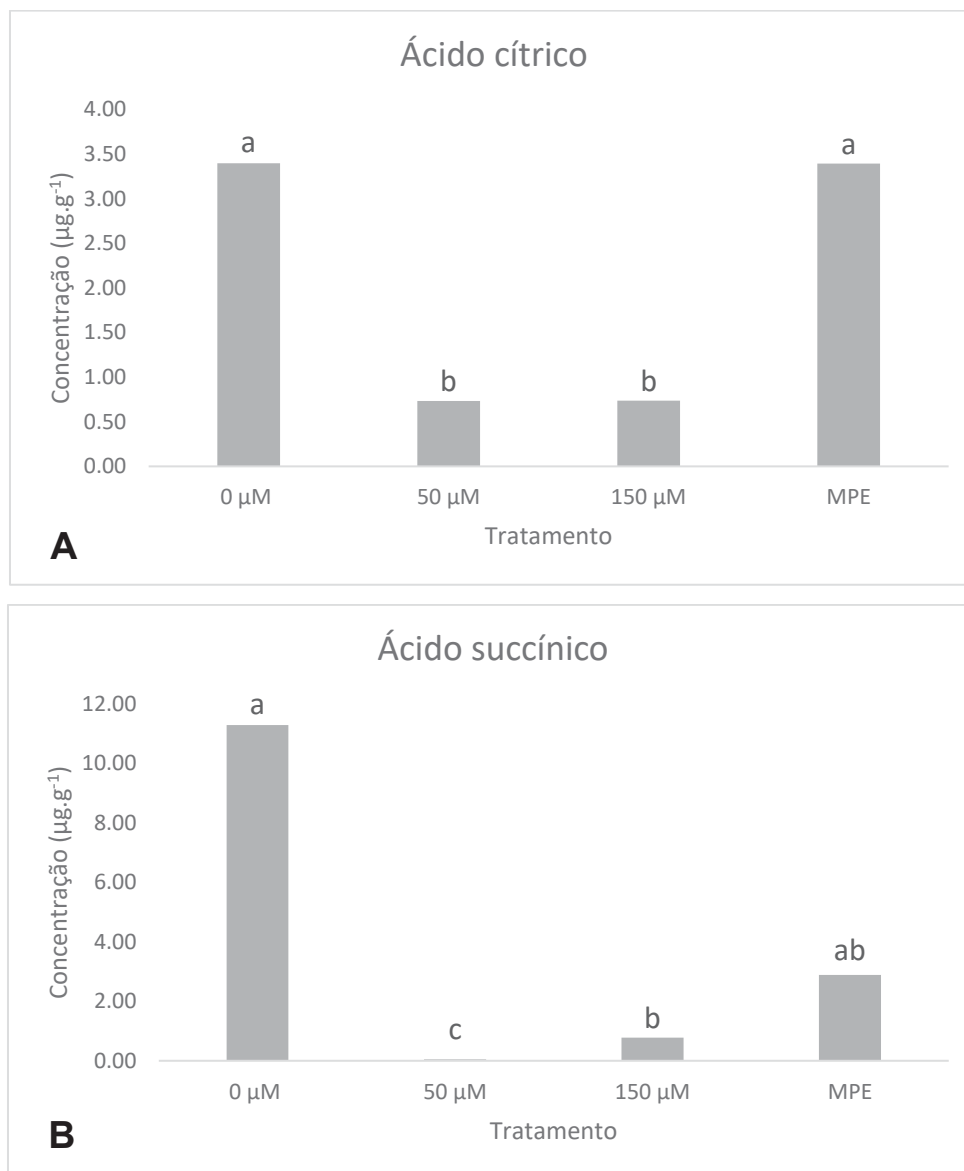
**Figura 15.** Grupo 2. Variação da concentração de A) alanina, B) ácido glutâmico, C) valina, D) serina e E) glutamina em massa pró-embriogênica jovem (MPE) de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* sob efeito do fator concentrações de azacitidina (CONTINUA).



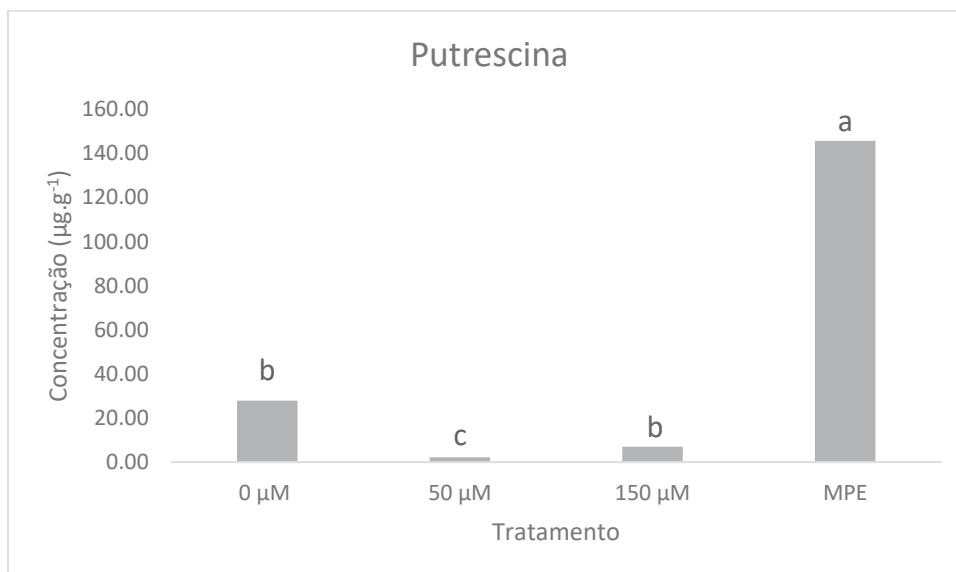
**Figura 15.** Grupo 2. Variação da concentração de A) alanina, B) ácido glutâmico, C) valina, D) serina e E) glutamina em massa pró-embriogênica jovem (MPE) de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* sob efeito do fator concentrações de azacitidina. (CONCLUSÃO)



**Figura 16.** Grupo 3. Variação da concentração de A) ácido cítrico e B) ácido succínico em massa pró-embriogênica jovem (MPE) de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* sob efeito do fator concentrações de azacitidina.



**Figura 17.** Variação da concentração de putrescina em massa pró-embriogênica jovem (MPE) de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* em função das concentrações de azacitidina.



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 EFEITO DA TEMPERATURA E DO GENÓTIPO NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* x *p. caribaea* var. *hondurensis*

#### 5.1.1 Avaliação de explantes e formação de linhagens por genótipo

No presente trabalho, a temperatura não teve influência na indução da embriogênese somática quando utilizados megagametófitos imaturos de famílias de meios irmãos de *Pinus taeda* (ADAM 18 e , 05, 15 FSCE e 28 KLB Mar) e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (ESJA 36).

Em *Pinus halepensis*, quando aplicados os tratamentos térmicos de 40°C por 4 h, 50°C por 30 min e 60°C por 5 min e o controle (23°C), com posterior permanência destes a 23°C por nove semanas, não foram observadas diferenças estatísticas para as taxas de indução, que variaram entre 51,80% a 40°C e 56,25% a 23°C (PEREIRA *et al.*, 2020).

Porém, estes resultados divergem de outros encontrados na literatura. Para *Pinus halepensis*, Pereira e colaboradores (2016) observaram uma maior taxa de indução (53%) em megagametófitos cultivados a 23°C em comparação a 18°C e 28°C (entre 20 a 40%) por 5-10 semanas. Assim como, em outro estudo, os resultados para a taxa de indução das temperaturas aplicadas, 18°C e 28°C, foram semelhantes às observadas em condições padrão (23°C) em *Pinus pinaster* (ARRILLAGA *et al.*, 2019).

No presente estudo, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas nas taxas de indução, nas temperaturas de 23 e 60°C houve uma tendência de maior formação de linhagens em *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (Tabela 2), esse resultado sugere que estas temperaturas favoreceram a formação de MPEs.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a influência do genótipo sobre a indução da ES, conforme observado por outros autores (GARCIA-MENDIGUREN *et al.*, 2016; ARRILLAGA *et al.*, 2019; PÉREZ-OLIVER *et al.*, 2021). O efeito do genótipo foi significativo para a indução da ES em todas as avaliações com destaque para as famílias ESJA36 e ADAM 18. Nesses genótipos foi também observada a formação de linhagens com boa proliferação (Tabela 2). Quando relacionado ao índice de

oxidação, observa-se que esta foi maior no material proveniente do genótipo ESJA36 (Figura 4C). Isso pode indicar que o estresse oxidativo pode ser relevante para desencadear determinados processos responsáveis pela formação de massas pró embriogênicas, e que neste caso, a oxidação pode não ser um fator limitante para a indução da ES. Para o genótipo ADAM 18 foram obtidas linhagens em todas as temperaturas, com destaque para 23°C (controle) e 60°C, sendo possível afirmar que este é um genótipo superior quanto à esta característica com relação aos demais avaliados neste trabalho.

### 5.1.2 Análise de expressão dos genes *SERK1* e *LEC1* em resposta a temperatura

Diversos estudos vêm sendo realizados em *Pinus spp* para investigar o efeito da temperatura na fase de indução da ES e como esta pode interferir posteriormente no desenvolvimento do embrião em plântula (GARCÍA-MENDIGUREN *et al.*, 2016, 2017; MONCALEÁN *et al.*, 2018; CASTANDER-OLARIETA *et al.*, 2019, 2020a, 2020b; 2020c; DO NASCIMENTO *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2020; PÉREZ-OLIVER *et al.*, 2021). Devido a mecanismos epigenéticos, o estresse térmico gerado nas fases iniciais do desenvolvimento vegetal pode desenvolver uma “memória” nas células totipotentes por meio do efeito de preparação ou *priming effect* (LÄMKE & BÄURLE, 2017; SOW *et al.*, 2018; TRONTIN *et al.*, 2021).

Um estudo aprofundado de Castander-Olarieta *et al.* (2020a) revelou a formação de memória epigenética estável por meio da aplicação de altas temperaturas (40°C, 4 h; 60°C, 5 min) em *Pinus radiata* nos estágios iniciais da ES. Os autores observaram que as temperaturas utilizadas podem provocar mudanças no estado de metilação de longo prazo, impactando positivamente a capacidade de retardar os efeitos negativos decorrentes da seca em plantas somáticas. Sendo interessante frente às mudanças climáticas, uma vez que os recursos hídricos estão diminuindo (IPCC, 2018).

A epigenética é uma chave importante na adaptação e plasticidade vegetal (SAEZ-LAGUNA *et al.*, 2014; SOW *et al.*, 2018; TRONTIN *et al.*, 2021). Dessa maneira, alguns fatores de transcrição associados ao *priming effect* como os da família *WRKY*, são estudados devido a associação com modificações da cromatina e a metilação e acetilação das histonas H3 e H4 (BAUM *et al.*, 2019; PÉREZ-OLIVER *et al.*, 2021). No entanto, apesar dos resultados promissores, trabalhos relacionando

a expressão de genes característicos da ES ao *priming effect* não foram encontrados em literatura.

No presente trabalho, um aumento considerável na expressão gênica relativa de *SERK1* foi identificado nos tratamentos térmicos de (15°C, 23°C) para (28°C, 60°C) em MPEs de *Pinus taeda*. Pouco é discutido sobre a influência da temperatura sobre a expressão desse gene na literatura. Foi observado em calos de *Ananas comosus* cv. Shewan, após tratamento a 4°C por 24 h, um aumento de 4 a 5 vezes na expressão do homólogo do gene para a espécie (*AcSERK*; MA *et al.*, 2016). No mesmo experimento também houve exposição dos calos a 40°C pelo mesmo período, neste caso não foi indicada a alteração da expressão gênica em relação ao controle (25°C). Como apresentado pelos autores, a espécie *A. comosus* não é sensível a altas temperaturas, sendo assim não afetou a expressão do gene. De forma similar, por ser uma espécie com adaptação para o seu local de origem com clima temperado, Sul e Sudeste dos Estados Unidos (ACOSTA *et al.*, 2019), há a possibilidade de que a expressão de *SERK1* em *P. taeda* não seja afetada pela baixa temperatura analisada.

A expressão de *LEC1*, contudo, apresentou uma curva de sino na variação das temperaturas tendo o seu ápice a 28°C e quase nula a 15°C. Considerando que em *Larix decidua* Mill a expressão do homólogo para *LEC1* é observada principalmente nas fases iniciais da ES (Guan *et al.*, 2016), discute-se a possibilidade de que a temperatura amena tenha afetado a expressão de *LEC1*, levando à redução dessa.

Esses resultados sugerem que para a espécie trabalhada a temperatura ideal para estudos futuros com *priming effect* esteja em torno de 28°C aplicada por 8 semanas ou 60°C por 5 minutos. Contudo, é necessário pontuar novamente que ambos os tratamentos passaram por variáveis acidentais (Tópico 3.2.2) e devem ser consideradas em trabalhos futuros. Essa metodologia pode ser uma fonte rápida para enfrentar tais questões globais por ser uma importante chave na adaptação e plasticidade vegetal (PLOMION *et al.*, 2016; TRONTIN *et al.*, 2021).

## 5.2 EFEITO DA AZACITIDINA NA REAQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA

### EMBRIOGÊNICA NA ES DE *Pinus elliotii* x *p. caribaea* var. *hondurensis*

#### 5.2.1 Análises citoquímica e de crescimento das massas pró-embriogênicas

A análise citoquímica realizada por meio da dupla coloração com azul de Evans e carmim acético caracteriza os dois diferentes tipos celulares encontrados em uma massa pró-embriogênica (MPE). O primeiro corante pigmenta de azul as células do suspensor, reconhecidas por serem irregulares e altamente vacuoladas. E o carmim acético atua sobre células embriogênicas, as quais são isodiamétricas com tamanho reduzido, núcleos grandes e citoplasma denso (GUERRA *et al.*, 2000; STEINER *et al.*, 2005; KRAJNÁKOVÁ & HÄGGMAN, 2016).

No experimento realizado para efeito da azacitidina na reaquisição de competência embriogênica (CE) na ES, observou-se na linhagem ECL05 o aumento de células embriogênicas expostas a 150  $\mu\text{M}$  de 5-azaC sendo indicado pela análise de RGB (Figura 9B). A reaquisição da CE pelo tratamento com o agente também foi observada em *Bactris gasipaes* Kunth a 16  $\mu\text{M}$  ou 64  $\mu\text{M}$  (REE *et al.*, 2020) e *Theobroma cacao* a 10  $\mu\text{M}$  (PILA QUINGA *et al.*, 2017).

Estudos têm demonstrado que o balanço entre o regulador de crescimento vegetal ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) utilizados nos protocolos de ES e a azacitidina é um fator relevante para a obtenção do melhor potencial nos protocolos de ES (LELJAK-LEVANIC *et al.*, 2004; YAMAMOTO *et al.*, 2005; FRAGA *et al.*, 2012). A presença de 2,4-D promove a proliferação celular por indução de mudanças moleculares e metabólicas (OSORIO *et al.*, 2018). Contudo, observa-se uma redução do número de células embriogênicas nas MPEs (Figuras 5 e 6) com o aumento do subcultivo das MPEs levando a perda da CE. Osorio e colaboradores (2018) sugerem que a atuação de 5-azaC induza uma suprarregulação de genes que codificam para fatores de transcrição (FT) com função reguladora na biossíntese, degradação ou sinalização de auxinas como observado para um agente inibidor de histona desacetilase (WÓJCIKOWSKA *et al.*, 2018). Dessa forma, é provável que o equilíbrio bioquímico seja retomado com o uso de 5-azaC tendo como resultado o aumento de células embriogênicas e, em conjunto das células do suspensor, a formação de embriões viáveis (Figura 8).

Nas linhagens ECL04 e ECL07, as quais apresentavam um grau de envelhecimento maior, o agente 5-azaC não apresentou efeito sobre essas como indicado no tópico 4.2.1. A inibição drástica da ES após o uso de 5-azaC foi verificada em *Medicago truncatula* a 100  $\mu\text{M}$  (SANTOS *et al.*, 2002), *Larix x eurolepis* 100  $\mu\text{M}$  (TEYSSIER *et al.*, 2014), *Arabidopsis thaliana* a 10  $\mu\text{M}$  (GRZYBKOWSKA *et al.*, 2018; OSORIO-MONTALVO *et al.*, 2018). Com isso, a concentração, o grau de

envelhecimento celular e a espécie aparentam também serem fatores relevantes para o sucesso da reaquisição da CE.

A variação da taxa de crescimento diminuiu com o aumento da concentração de 5-azaC nas massas pró-embriogênicas para ECL02 sugerindo um efeito danoso sobre essa linhagem. Este efeito também foi observado em outras espécies. No entanto, apesar do crescimento mais lento, para *Pinus pinaster*, quando utilizadas as concentrações de 10 e 15  $\mu\text{M}$  do agente na maturação foram observadas as maiores quantidades de embriões (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2009). Já para o híbrido *Larix x eurolepis* houve uma redução significativa na taxa de crescimento e da CE quando a 5-azaC foi utilizada (TEYSSIER *et al.*, 2014).

#### 5.2.2 Análise de expressão dos genes *SERK1* e *LEC1* em resposta ao agente azacitidina

O homólogo de *SERK1* em *Araucaria angustifolia* apresentou expressão em células embriogênicas e não foi expresso em células não embriogênicas (STEINER *et al.*, 2012). Os resultados de Bravo *et al.* (2017) mostraram uma tendência a regulação negativa nas linhagens não embriogênicas, porém não foi estatisticamente significativo devido a variabilidade entre as linhagens. E para *Picea balfouriana*, o homólogo de *SERK1* foi sugerido como marcador dos estágios iniciais da ES (LI *et al.*, 2014).

Em espécies não florestais como *Arabidopsis thaliana* (FEHÉR *et al.*, 2003; VERDEIL *et al.*, 2007; SALAJ *et al.*, 2008), *Brassica napus* (AHMADI *et al.*, 2016) e *Trifolium nigrescens* (PILARSKA *et al.*, 2016) foi observada alta expressão de *SERK1* nas massas embriogênicas que proveram embriões ou estruturas semelhantes a esses. No entanto, Magnani *et al.* (2017) relataram uma alta expressão de *SERK* do mesmo modo em células não embriogênicas de *A. thaliana*.

Os genes da família *LEC* desempenham um papel crucial na manutenção e controle de muitos aspectos da embriogênese vegetal e codificam fatores de transcrição (KUMAR & STADEN, 2017). Estudos em *Pinus contorta*, apontam que *HAP3A* (gene da família *LEC*) teve maior expressão em massas não embriogênicas (PARK *et al.*, 2010); e em *Araucaria angustifolia*, foram avaliados diversos genes

incluindo *AaLEC* e foi observada influência da presença/ausência de auxinas e citocininas sobre a expressão (SCHLÖGL *et al.*, 2012).

A perda progressiva da CE durante a fase de proliferação é observada em linhagens celulares embriogênicas em espécies florestais (BRETON *et al.*, 2006; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2007, 2009). Entretanto muitas análises genômicas de linhagens embriogênicas e não embriogênicas mostraram um baixo nível de metilação global de DNA em MPEs com CE quando comparados a não embriogênicas (NOCEDA *et al.*, 2009; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2009; TEYSSIER *et al.*, 2014; KUMAR & STADEN, 2017; KARIM *et al.*, 2018; OSORIO-MONTALVO *et al.*, 2018). Dessa forma, visando aumentar a competência embriogênica das massas e as taxas de maturação na ES, a azacitidina tem sido aplicada como um promotor de mudanças epigenéticas em diversas espécies (FRAGA *et al.*, 2012; PÉREZ *et al.*, 2015; SOLÍS *et al.*, 2015; PILA QUINGA *et al.*, 2017; BETEKHTIN *et al.*, 2018; GRZYBKOWSKA *et al.*, 2018; REE *et al.*, 2020). Contudo, poucas análises de expressão gênica foram realizadas para avaliar a ação do agente, como relatado na revisão de Osorio-Montalvo *et al.* (2018).

No presente estudo, o efeito do 5-azaC foi aferido através da avaliação da expressão gênica após a aplicação em duas linhagens embriogênicas. Os níveis de expressão relativa dos homólogos de *SERK1* e *LEC1* na linhagem ECL02 de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* apresentaram expressão máxima no controle e um declínio com o aumento da concentração de 5-azaC. Sendo a expressão de ambos os genes relacionadas a aquisição da totipotência, considera-se que essa não foi readquirida com os tratamentos a 50  $\mu$ M e 150  $\mu$ M, o que está de acordo com a análise citoquímica. A mesma análise realizada após exposição de 5-azaC (10  $\mu$ M) em explantes de *A. thaliana*, revelou uma repressão significativa do gene *LEC1* em MPEs incapazes de indução, contudo, a análise de metilação global do DNA revelou uma diminuição no nível global de metilação do DNA durante a ES (GRZYBKOWSKA *et al.*, 2018).

Na linhagem ECL05 os níveis de expressão gênica relativa de *SERK1* e *LEC1* aumentaram em 50  $\mu$ M e 150  $\mu$ M comparados ao controle a 0  $\mu$ M, sendo relacionadas à readquirição da totipotência. Este resultado está de acordo com o apresentado na análise citoquímica, a qual indica a readquirição da CE, principalmente no tratamento a 150  $\mu$ M.

Ademais, conforme esperado, os níveis de expressão de *SERK1* e *LEC1* foram baixos nas massas com baixa CE (controle 0  $\mu\text{M}$ ) em comparação aos demais tratamentos, como observado por Park *et al.* (2010), Klimaszewska *et al.* (2011) e Magnani *et al.* (2017).

### 5.2.3 Análise metabolômica de massas pró-embriogênicas tratadas com azacitidina

#### 5.2.3.1 Grupo 1 – metabolismo de açúcares

No experimento com diferentes tratamentos (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 150  $\mu\text{M}$ ) de 5-azaC em conjunto de uma MPE jovem, os açúcares solúveis - frutose e glicose - tiveram suas menores concentrações na MPE jovem não diferindo estatisticamente do tratamento a 150  $\mu\text{M}$  de 5-azaC (Figura 14A e B). A quantidade da sacarose (Figura 14C) e a razão entre sacarose:hexoses (Figura 14D) foi maior na MPE jovem e sem diferença estatística do tratamento de 150  $\mu\text{M}$  de 5-azaC. Em *Picea abies* o mesmo padrão na ES foi observado por Gosslová *et al.* (2001), com um aumento relativo da sacarose sobre as hexoses à medida que os embriões se desenvolviam, tal como um desenvolvimento normal em *Pinus taeda* teve associação significativa com a presença de sacarose na proliferação (ROBINSON *et al.*, 2009). Como observado pelo teste de citotóxica e pela análise da expressão gênica, os indícios de reaquisição de competência embriogênica são reforçados.

A associação positiva e significativa da presença de sacarose à capacidade das culturas de desenvolver embriões maduros normais de *Pinus taeda* foi também observada por Robinson e colaboradores (2009). Em outro estudo, onde foi analisado o consumo de compostos do meio de cultura pela variação metabólica da sacarose, observou-se a hidrólise precoce dessa por células embriogênicas de *Picea glauca* na proliferação (DOWLATABADI *et al.*, 2009).

Com relação aos açúcares glicose e frutose, a análise da composição metabólica no presente estudo revelou as maiores concentrações de ambos no tratamento a 50  $\mu\text{M}$  e no controle (0  $\mu\text{M}$ ); assim como, a menor na MPE jovem (Figura 14A e B). Um recente estudo com *Pseudotsuga menziesii* (GAUTIER *et al.*, 2019) demonstrou ainda que o estado energético, representado por açúcares solúveis, foi maior em MPEs do que em massas não embriogênicas, como ocorre no presente trabalho, o que já havia sido observado previamente em outras coníferas (LIPAVSKÁ

& KONRÁDOVÁ, 2004; NAVARRO *et al.*, 2017). A concentração desses açúcares no tratamento a 15  $\mu\text{M}$  foi estatisticamente semelhante com os dois grupos formados e da mesma maneira para a razão entre sacarose:hexoses, podendo indicar uma transição do *status* não embriogênico para embriogênico.

#### 5.2.3.2 Grupo 2 – metabolismo de aminoácidos

Com destaque para os aminoácidos (AA) na fase de proliferação, os teores de valina, leucina e isoleucina indicam a síntese e regulação de proteínas e de DNA, a formação de estoque de energia, assim como o transporte de auxinas (DOWLATABADI *et al.*, 2009). Altas concentrações dos aminoácidos alanina, ácido glutâmico, valina, serina e glutamina são observadas no controle do tratamento com 5-azaC (0  $\mu\text{M}$ ), ou seja, em células que não possuem CE (Figura 15). É também apresentado um decréscimo das concentrações dos AA nos demais tratamentos (50 e 150  $\mu\text{M}$ ) e a menor na MPE jovem.

Em *Coffea arabica*, Awada e colaboradores (2019) caracterizaram a presença dos metabólitos relacionados aos estádios de folha (explante), desdiferenciação, calo (embriogênico e não embriogênico), rediferenciação e embrião. Contrapondo os resultados citados, os autores identificaram especificamente na fase de calo um sobre-acúmulo de glicina, prolina e metionina; e um sub-acúmulo de valina, leucina e lisina. Comparando calos embriogênicos e não embriogênicos, a valina também apresentou um sub-acúmulo em ambos e este AA foi o único em comum com o presente trabalho apresentando resultado estatisticamente significativo.

Buscou-se compreender os elevados teores dos AA no controle do tratamento e o declínio significativo a 150  $\mu\text{M}$  e na MPE jovem apresentados pela linhagem ECL05, relacionando-os com a potencial de recuperação da CE no tratamento a 150  $\mu\text{M}$  apontada pela análise citoquímica (Tópico 4.2.2; Figura 7). Uma relação da resposta ao estresse celular com a orientação da via embriogênica foi sugerida em estudos com *Pinus sylvestris* L. (SALO *et al.*, 2016), *Araucaria angustifolia* (JO *et al.*, 2013), *Larix leptolepis* (ZHANG *et al.*, 2010), *Cyphomandra betacea* (CORREA *et al.*, 2012, 2016) e *Vitis vinifera* (MARSONI *et al.*, 2008). Nas duas últimas espécies foi observado que o estado embriogênico pode estar relacionado a capacidade das células em regular os efeitos decorrentes das condições de estresse.

A regulação dos efeitos decorrentes de condições de estresse ocorre pela manutenção das espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando em níveis elevados essas apresentam toxicidade devido a instabilidade química e interação com todos os tipos de moléculas orgânicas (SOARES *et al.*, 2019). Contudo, EROs são encontradas em baixos níveis devido o rápido processo de proliferação celular e metabolismo aeróbio ativo. Nesse caso podem atuar como sinalizadores intracelulares induzindo uma resposta positiva no sistema antioxidante, o que já foi observado em *L. leptolepis* e na formação de embriões somáticos de *A. angustifolia* (ZHANG *et al.*, 2010; JO *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2019).

Utilizando a análise proteômica Klubicova e colaboradores (2017) verificaram que em *Pinus nigra* todas as proteínas envolvidas na desintoxicação eram mais abundantes em tecidos não embriogênicos do que em embriogênicos. Em *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] identificaram que esses sistemas não foram ativados de forma mais significativa independente do *status* da CE (GAUTIER *et al.*, 2019). Os autores dos trabalhos concordam que essa resposta é relacionada à predisposição dos tecidos à necrose após a oxidação de compostos fenólicos.

É possível relacionar esses resultados discorridos na literatura com os encontrados neste trabalho com *Pinus elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*. Essa relação se dá uma vez que para alcançar a homeostase de EROs é necessária a síntese de enzimas antioxidantes e uma maior concentração de AA é observada a 0  $\mu$ M e 50  $\mu$ M (Figura 15), a qual ocorreu de forma similar em *Pinus nigra* (KLUBICOVÁ *et al.*, 2017).

Minimizando a produção de ROS, a fotorrespiração que ocorre nos cloroplastos realiza a assimilação do cátion amônio pelo uso direto ou indireto de ATP e NADPH (VOSS *et al.*, 2013). Nesse processo há formação da glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS). Curiosamente, esse AA foi identificado neste trabalho juntamente ao ácido glicólico (Anexo 1), o qual é a fonte primária de CO<sub>2</sub> produzido durante a fotorrespiração (ZELITCH, 1972; NUNES-NESI *et al.*, 2010).

Apesar da formação de cloroplastos ocorrer na fase de embriões somáticos cotiledonares em *Pinus pinaster* e *Pinus sylvestris* (RODRÍGUEZ *et al.*, 2005) para ser possível a fotorrespiração, a análise metabolômica de glutamina e ácido glicólico indicou uma maior concentração nos tratamentos a 0  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de forma similar aos AA citados.

Para elucidar o comportamento das MPEs do híbrido são necessários estudos futuros com proteômica, análise de EROs e o possível papel da fotorespiração nessa fase do desenvolvimento.

#### 5.2.3.3 Grupo 3 – Ácido cítrico e ácido succínico

A respiração celular pode ser dividida em três principais vias: glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e transporte mitocondrial de elétrons. Sendo uma das vias principais do metabolismo, o ciclo do TCA é responsável pela oxidação dos substratos respiratórios para conduzir a síntese de ATP (FERNIE *et al.*, 2004). Os ácidos orgânicos são comumente associados a essa via, entre eles foi observada a presença de dois representantes significativos no estudo com 5-azaC na linhagem ECL05: o ácido cítrico e o ácido succínico.

O papel dos ácidos orgânicos nas fases do desenvolvimento embrionário, contudo, é pouco compreendido (PULLMAN & BUCALO, 2014). Sabe-se que a taxa de divisão celular é elevada nas massas pró-embriogênicas (MPEs), levando ao crescimento acelerado. Dessa forma, ocorre o que Taiz *et al.* (2017) denominam respiração de crescimento, levando a uma alta demanda de produção de energia e, por consequência, da síntese dos ácidos orgânicos associados ao ciclo do TCA (RODE *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2019).

Após isolar e identificar o ácido cítrico do megagametófito de *Pinus taeda*, Silva *et al.* (2008) aplicaram este de forma tópica em embriões somáticos em estágio inicial e observaram um crescimento significativo das MPEs. E em um estudo com 26 ácidos orgânicos foi observado o aumento significativo de cinco ácidos durante o desenvolvimento de embriões somáticos de *P. taeda*. O ácido succínico, estando entre esses, melhorou a iniciação das MPEs quando aplicado sozinho ou combinado (PULLMAN & BUCHANAN 2006; PULLMAN *et al.*, 2006).

De acordo com o estudo de Awada *et al.* (2019) é possível a avaliação de metabólitos do ciclo do TCA como marcadores para a CE em *Coffea arabica*. Neste, a sub-acumulação dos metabólitos em MPEs foi observada, contrapondo a alta atividade do ciclo TCA nas células que não possuem CE. Contudo, o oposto foi identificado no experimento com 5-azaC na linhagem ECL05, uma vez que os elevados níveis de ácido cítrico em MPEs que possuem alta CE comprovadamente

(MPE jovem) e com baixa CE (0  $\mu\text{M}$ ) foram estatisticamente iguais. Dessa forma, não se aplica a sugestão de Awada *et al.* (2019) no presente estudo.

Neste trabalho o ácido succínico teve baixas concentrações no tratamento a 150  $\mu\text{M}$  e MPE jovem (Figura 16), porém foi estatisticamente semelhante entre essas espelhando a análise citoquímica. Esses resultados apontam para uma demanda igual de energia entre ambos, o que validaria o uso deste metabólito do ciclo do TCA como marcador para a CE (AWADA *et al.*, 2019).

Como discutido para o grupo 1 – metabolismo de açúcares (Tópico 5.2.3.1), para os aminoácidos também houve disparidade entre os resultados obtidos com *C. arabica* e os identificados em ECL05. Possivelmente isso decorre das diferenças na ES para angiospermas e gimnospermas. Com isso, sugere-se a realização de estudos robustos sobre a atuação dos metabólitos relacionados ao ciclo do TCA nas diferentes fases da ES em coníferas para elucidação dos processos e dessa forma compreender se a atuação do agente 5-azaC interfere na demanda energética das células via TCA.

#### 5.2.3.4 Putrescina

Poliaminas (PAs) são moléculas pertencentes a classe dos compostos orgânicos nitrogenados. Nas plantas as formas mais representativas do grupo são a diamina putrescina, triamina espermidina, tetramina e espermina (Watanabe *et al.*, 2021). Essas estão envolvidas em processos de desenvolvimento, como as embriogêneses zigótica e somática (ES; PULLMAN & BUCALO, 2014; WINKELMANN *et al.*, 2016).

Visando uma melhor compreensão sobre a atuação dessas na ES, assim como melhorar o desenvolvimento dos embriões somáticos, a quantificação de PAs foi realizada em espécies florestais como *Pinus pinaster* (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2007), *Pinus gerardiana* (MALABADI & NATARAJA 2007), *Pinus nigra* (NOCEDA *et al.*, 2009), *Picea abies* (GEMPERLOVA *et al.*, 2009), *Picea glauca* (MESKAOUI & TREMBALY, 2009), *Araucaria angustifolia* (JO *et al.*, 2013) e *Pinus sylvestris* L. (VUOSKU *et al.*, 2012; SALO *et al.*, 2016).

No experimento com diferentes tratamentos (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 150  $\mu\text{M}$ ) de 5-azaC em conjunto com uma MPE jovem, a análise metabolômica determinou somente a presença da putrescina (Put; Figura 17). O mesmo foi observado em *Pinus pinaster* exposto a 5-azaC e *Pinus nigra* utilizando HPLC, sendo proposto pelos autores que a

falta dos demais metabólitos esteja relacionada com o rápido metabolismo de PAs em cultura celular de coníferas (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2009).

De forma endógena ou exógena, a maioria dos estudos indicam uma relação positiva de Put com o crescimento de culturas embriogênicas, estimulando a ES e recuperando a CE (MALABADI & NATARAJA, 2007; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2007; VUOSKU *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2019). Na fase de proliferação, no entanto, também já foi relatada a relação inversa da concentração de putrescina com a CE (NOCEDA *et al.*, 2009) e a presença abundante dessa independente do estado embriogênico (SALO *et al.*, 2016).

Neste trabalho a maior concentração de Put foi observada na MPE jovem controle positivo para CE (Figura 17). Os diferentes resultados apresentados sugerem que a concentração de Put em relação à CE pode variar entre as espécies. Essa hipótese é reforçada pela análise de PAs em MPEs de dois genótipos em *Pinus pinaster*, a qual exibiu um perfil inconsistente, dificultando a atribuição a um fenótipo de cultura específico (KLIMASZEWSKA *et al.*, 2007).

No presente experimento, em todos os tratamentos com 5-azaC, a concentração de Put foi baixa mesmo a 150  $\mu$ M, enquanto os resultados anteriores vêm indicando uma possível reaquisição da CE (Tópicos 5.2.1 e 5.2.2). Entretanto, é observada a associação da diminuição de Put e a desmetilação do DNA com a competência embriogênica durante a embriogênese zigótica em *Pinus nigra* (NOCEDA *et al.*, 2009). Desse modo, é possível pressupor que as baixas concentrações de Put possam ser relacionadas aos tratamentos com 5-azaC.

## 6 CONCLUSÃO

- ✓ A temperatura não tem efeito sobre a indução de massas pró-embriogênicas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* submetidas a 15°C, 23°C e 28°C e ainda a choque térmico de 60°C por 5 min seguido de incubação a 23°C.
- ✓ Há forte efeito do genótipo sobre a indução da ES em *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*.
- ✓ A linhagem ECL05 do híbrido *Pinus elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* apresenta reaquisição de competência embriogênica na fase de proliferação com o

uso de 5-azaC a 150  $\mu$ M. Neste tratamento as análises utilizadas apontam para essa conclusão devido: (1) o aumento de pró-embriões, (2) o conteúdo de açúcares similar à massa pró-embriogênica jovem e (3) o aumento da expressão gênica de *SERK1* e *LEC1* em relação ao controle sem 5-azaC.

### Considerações finais

Para estudos posteriores avaliando a aplicação de temperaturas na indução com *Pinus taeda*, é sugerido a investigação da expressão gênica. Essa leva a uma melhor compreensão dos processos podendo indicar alterações em nível molecular antes que sejam identificados em nível celular.

Estudos robustos nas coníferas são necessários para compreensão da atuação dos metabólitos nas diferentes fases da ES. Com isso, sugere-se estudos de metabolômica, assim como, com a aplicação de 5-azaC nas MPEs visando esclarecer os processos de forma comparativa. De modo mais específico, a associação das análises metabolômica e de determinação dos níveis de metilação do DNA possibilitará avaliar se a concentração de poliaminas pode ser relacionada aos baixos níveis de metilação causados pelo agente 5-azaC, visando reaquisição da CE em espécies de *Pinus*.

### REFERÊNCIAS

ACOSTA, J. J., FAHRENKROG, A. M., NEVES, L. G., RESENDE, M., DERVINIS, C., DAVIS, J. M., HOLLIDAY, J. A., & KIRST, M. Exome Resequencing Reveals Evolutionary History, Genomic Diversity, and Targets of Selection in the Conifers *Pinus taeda* and *Pinus elliotii*. **Genome biology and evolution**, v.11, n.2, p.508–520, Feb. 2019. Doi <https://doi.org/10.1093/gbe/evz016>

APRE. **Estudo setorial APRE 2017/2018** [E-book]. Curitiba: STCP, 2018. Disponível em: <https://www.apreflorestas.com.br/wp-content/uploads/2018/02/Estudo-Setorial-2018-APRE.pdf>

APRE. **Estudo setorial APRE 2020** [E-book]. Curitiba: STCP, 2020. Recuperado de <https://apreflorestas.com.br/publicacoes/estudo-setorial-apre-2020-2/>

ARRILLAGA I., MORCILLO M., ZANÓN I., LARIO F., SEGURA J., SALES E. New Approaches to Optimize Somatic Embryogenesis in Maritime Pine. **Frontiers in**

**Plant Science.** v.10, n.138, p.1-14, Fev. 2019. Doi:

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00138>

AWADA R., CAMPA C., GIBAUT E., DÉCHAMP E., GEORGET F., LEPELLEY M., ABDALLAH C., ERBAN A., MARTINEZ-SEIDEL F., KOPKA J., LEGENDRE L., LÉRAN S., CONÉJÉRO G., VERDEIL J.L., CROUZILLAT D., BRETON D., BERTRAND B., ETIENNE H. "Unravelling the Metabolic and Hormonal Machinery During Key Steps of Somatic Embryogenesis: A Case Study in Coffee".

**International Journal of Molecular Sciences.** v.20, n.19, p.1-29, Set. 2019. Doi:

<https://doi.org/10.3390/ijms20194665>

BAUM S., REIMER-MICHALSKI E.M., BOLGER A., MANTAI, ANDREA J., BENES, VLADIMIR, USADEL, BJÖRN, CONRATH, UWE. Isolation of Open Chromatin Identifies Regulators of Systemic Acquired Resistance. **Plant Physiology.**, v.181, n.2, p.817–833, Jul. 2019. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00673>

BETEKHTIN A., MILEWSKA-HENDEL A., CHAJEC L., ROJEK M., NOWAK K., KWASNIEWSKA J., WOLNY E., KURCZYNSKA E., HASTEROK R. 5-Azacytidine Induces Cell Death in a Tissue Culture of *Brachypodium distachyon*. **International Journal of Molecular Sciences.** v.19, n.6, p. 1-21, Jun. 2018.

<https://doi.org/10.3390/ijms19061806>

BIROL I., RAYMOND A., JACKMAN S. D., PLEASANCE C., ROBIN T., GREG A., YUEN M. M.S., KEELING C. I., BRAND D., VANDERVALK B. P., KIRK H., PANDOH P., MOORE R. A., ZHAO Y., MUNGALL A. J., JAQUISH B., YANCHUK A., RITLAND C., BOYLE B., BOUSQUET J., RITLAND K., MACKAY J., BOHLMANN J., JONES S.J.M. Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data. **Bioinformatics.** v.29, n.12, p.1492–149, Mai. 2013. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt178>

BOUTILIER K, OFFRINGA R, SHARMA VK, KIEFT H, OUELLET T, ZHANG L, HATTORI J, LIU CM, VAN LAMMEREN AA, MIKI BL, CUSTERS JB, VAN LOOKEREN CAMPAGNE MM. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell.** v.14, n.8, p.1737-49, Ago. 2002. <https://doi.org/10.1105/tpc.001941>

BOUYER D., ROUDIER F., HEESE M., ANDERSEN E.D., GEY D., NOWACK M.K., GOODRICH J., RENO J.P., GRINI P.E., COLOT V., SCHNITTGER A. Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. **PLoS Genet.** v.7, n.3, p. 1-19, Mar. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002014>

BRAVO S., BERTÍN A., TURNER A., SEPÚLVEDA F., JOPIA P., PARRA, M. J., CASTILLO R., HASBÚN R. Differences in DNA methylation, DNA structure and embryogenesis-related gene expression between embryogenic and non embryogenic lines of *Pinus radiata* D. don. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** v.130, n.3, p.521–529, Jun. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1242-3>

BRAYBROOK S.A., STONE S.L., PARK S., BUI A.Q., LE B.H., FISCHER R.L., GOLDBERG R.B., HARADA J.J. Genes directly regulated by *LEAFY COTYLEDON2* provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.103, n.9, p. 3468-3473. Fev. 2006.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0511331103>

BRAYBROOK S.A., HARADA J.J. LECs go crazy in embryo development. **Trends in Plant Science**, v.13, n.12, p.624–630. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.09.008>

BRETON D., HARVENGT L., TRONTIN J.F., BOUVET A., FAVRE J.M. High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. v.41, p.494–504, Mar. 2005.

<https://doi.org/10.1079/IVP2005671>

BRETON D., HARVENGT L., TRONTIN J.F., BOUVET A., FAVRE J.M. Long-term subculture randomly affects morphology and subsequent maturation of early somatic embryos in maritime pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.87, p.95-108.

<https://doi.org/10.1007/s11240-006-9144-9>

BUSINGE E., BRACKMANN K., MORITZ T., EGERTSDOTTER U. Metabolite profiling reveals clear metabolic changes during somatic embryo development of Norway spruce (*Picea abies*), **Tree Physiology**. v.32, n.2, p.232–244, Fev. 2012.

<https://doi.org/10.1093/treephys/tpr142>

CANUTO G. A. B., COSTA J.L., CRUZA P.L.R., SOUZA A.R.L., FACCIOA A.T., KLASSENC A., RODRIGUES K.T., TAVARES M.F.M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**. v.41, n.1, p.75-91, Out. 2018.

<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>

CARNEROS E., CELESTINO C., KLIMASZEWSKA K., PARK Y.S., TORIBIO M., BONGA J.M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.98, p.165–178, Mai. 2009.

<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2713-9>

CASTANDER-OLARIETA A., MONTALBÁN I.A., DE MEDEIROS OLIVEIRA E., DELL'AVERSANA E., D'AMELIA L., CARILLO P., STEINER N., FRAGA H. P.F., GUERRA M.P., GOICOA T., UGARTE M.D., PEREIRA C., MONCALEÁN P. Effect of Thermal Stress on Tissue Ultrastructure and Metabolite Profiles During Initiation of Radiata Pine Somatic Embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**. v.9, n.2004, p. 1-16, Jan. 2019.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.02004>

CASTANDER-OLARIETA A., PEREIRA C., SALES E., MEIJÓN M., ARRILLAGA I., CAÑAL M.J., GOICOA T., UGARTE M.D., MONCALEÁN P., MONTALBÁN I.A. Induction of Radiata Pine Somatic Embryogenesis at High Temperatures Provokes a Long-Term Decrease in DNA Methylation/Hydroxymethylation and Differential Expression of Stress-Related Genes. **Plants**. v.9, n.12, p.1762-1778, Dez. 2020.

<https://doi.org/10.3390/plants9121762>

CASTANDER-OLARIETA A., MONCALEÁN P., PEREIRA C., PĚNČÍK A., PETŘÍK I., PAVLOVIĆ I., NOVÁK O., STRNAD M., GOICOA T., UGARTE M. D., MONTALBÁN

I.A. Cytokinins are involved in drought tolerance of *Pinus radiata* plants originating from embryonal masses induced at high temperatures. **Tree Physiol.** v.41, n.6, p.912-926, Jun. 2021. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa055>

CHANVIVATTANA Y., BISHOPP A., SCHUBERT D., STOCK C., MOON Y.H., SUNG Z.R. Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. **Development.** v.131, n. 21, p.5263–5276, Set 2004. <https://doi.org/10.1242/dev.01400>

CHEN D., MOLITOR A., LIU C., SHEN W.H. The Arabidopsis PRC1-like ring-finger proteins are necessary for repression of embryonic traits during vegetative growth. **Cell research.** v.20, n.12, p.1332-1344, Nov. 2010. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.151>

CHEN D, SHAO Q, YIN L, YOUNIS A AND ZHENG B. Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses. **Frontiers in Plant Science.** v.9, n.1945, p. 1-13, Jan. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>

CHEN R., XIAOHUI C., WEN H., SHIZHONG Z., YULING L., ZHONGXIONG L. Transcriptome analysis of azacitidine (5-AzaC)-treatment affecting the development of early somatic embryogenesis in longan. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology.** v.96, n.3, p.311-323, Jan. 2021. <https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1847695>

CHENG X. Structural and functional coordination of DNA and histone methylation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.** v.6, n.8, Ago. 2014. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018747>

CHOUDHURY H., KUMARIA S., TANDON P. Induction and maturation of somatic embryos from intact megagametophyte explants in Khasi pine (*Pinus kesiya* Royle ex Gord.). **Current Science India.** v.95, n.10, p.1433–1438, Nov. 2008. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Hiranjit-Choudhury/publication/215837026\\_Induction\\_and\\_maturation\\_of\\_somatic\\_embryos\\_from\\_intact\\_megagametophyte\\_explants\\_in\\_Khasi\\_pine\\_Pinus\\_kesiya\\_Royle\\_ex\\_Gord/links/55e6c3a808aeccc5bbb7abe2/Induction-and-maturation-of-somatic-embryos-from-intact-megagametophyte-explants-in-Khasi-pine-Pinus-kesiya-Royle-ex-Gord.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hiranjit-Choudhury/publication/215837026_Induction_and_maturation_of_somatic_embryos_from_intact_megagametophyte_explants_in_Khasi_pine_Pinus_kesiya_Royle_ex_Gord/links/55e6c3a808aeccc5bbb7abe2/Induction-and-maturation-of-somatic-embryos-from-intact-megagametophyte-explants-in-Khasi-pine-Pinus-kesiya-Royle-ex-Gord.pdf). Acesso em: 16 jan. 2022

CORREIA S.I., VINHAS R., MANADAS B., LOURENÇO A.S., VERÍSSIMO P., CANHOTO J.M. Comparative proteomic analysis of auxin induced embryogenic and nonembryogenic tissues of the solanaceous tree *Cyphomandra betacea* (tamarillo). **Journal of Proteome Research.** v.11, n.3, p.1666–1675, Fev. 2012. Doi: <https://doi.org/10.1021/pr200856w>

CURABA J., MORITZ T., BLERVAQUE R., PARCY F., RAZ V., HERZOG M. AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by *LEAFY COTYLEDON 2* and *FUSCA 3* in *Arabidopsis*. **Plant Physiology.** v.136, n.3, p.3660–3669 Nov. 2004. <https://doi.org/10.1104/pp.104.047266>

DE-LA-PEÑA C., NIC-CAN G.I., GALAZ-ÁVALOS R.M., AVILEZ-MONTALVO R., LOYOLA-VARGAS V.M. The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. **Frontiers in Plant Science**. v.6, n.635, Ago. 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00635>

DO NASCIMENTO A.M.M., BARROSO P.A., NASCIMENTO N.F.F., GOICOA T., UGARTE M.D., MONTALBÁN I.A., MONCALEÁN P. *Pinus spp.* Somatic Embryo Conversion under High Temperature: Effect on the Morphological and Physiological Characteristics of Plantlets. **Forests**. v.11, n.11, p.1181, Nov. 2020. <https://doi.org/10.3390/f11111181>

DOWLATABADI R., WELJIE A.M., THORPE T.A., YEUNG E.C., VOGEL H.J. Metabolic footprinting study of white spruce somatic embryogenesis using NMR spectroscopy. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.47, n.5, p.43-350, Mai. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.12.023>

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Cultivo do Pínus., Sistema de Produção Embrapa, Curitiba, 2014, Disponível em: <https://goo.gl/Hrj7bv>.

ELHITI M.; STASOLLA C.; WANG A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. v.49, n.6, p.631–642, Dez. 2013. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9547-3>

FEHER A., PASTERNAK T.P., DUDITS D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.74, n.3, p.201–228, Set. 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>

FERNIE A.R., CARRARI F., SWEETLOVE L.J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Current Opinion in Plant Biology**. v.7, n.3, p.254-261, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.007>

FIEHN O., KOPKA J., TRETHERWEY R.N., WILLMITZER L. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. **Analytical Chemistry**. v.72, n.15, p.3573-3580, Set. 2000. <https://doi.org/10.1021/ac991142j>

FRAGA, H.P.; VIEIRA, L.N.; CAPRESTANO, C.A.; STEINMACHER, D.A.; MICKE, G.A.; SPUDEIT, D.A.; PESCADOR, R.; GUERRA, M.P. 5-Azacytidine combined with 2, 4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. **Plant Cell Reports**. v.31, n.12, p.2165-2176, Dez. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1327-8>

GAJ M.D., ZHANG S., HARADA J.J., LEMAUX P.G. Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. **Planta**. v.222, n.6, p.977–988, Dez. 2005. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0041-y>

GALLOIS J.L., NORA F.R., MIZUKAMI Y., SABLONSKI R., WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. **Genes Development**. v.18, p.375–380, Jan. 2004. <https://doi.org/10.1101/gad.291204>

GARCÍA-MENDIGUREN O., MONTALBÁN I.A., GOICOA T. M., UGARTE D., MONCALEÁN. P. Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos. **Trees**. v.30, p.949–958, Jun. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1336-7>

GAUTIER F., LABEL P., ELIÁŠOVÁ K., LEPLÉ J.-C., MOTYKA V., BOIZOT N., VONDRÁKOVÁ Z., MALBECK J., TRÁVNÍČKOVÁ A., LE METTÉ C., LESAGE-DESCAUSES M.-C., LOMENECH A.-M., TRONTIN J.-F., COSTA G., LELU-WALTER M.-A., TEYSSIER C. Cytological, Biochemical and Molecular Events of the Embryogenic State in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]). **Frontiers in Plant Science**. v.10, n.118, Feb. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00118>

GEMPERLOVÁ L., FISCHEROVÁ L., CVIKROVÁ M., MALÁ J., VONDRÁKOVÁ Z., MARTINCOVÁ O., Vágner M. Polyamine profiles and biosynthesis in somatic embryo development and comparison of germinating somatic and zygotic embryos of Norway spruce. **Tree Physiology**. v.29, n.10, p.1287-1298, Oct. 2009. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpp063>

GÖSSLOVÁ M., SVOBODOVÁ H., LIPAVSKÁ H., ALBRECHTOVÁ J., VREUGDENHIL D. Comparing Carbohydrate Status during Norway Spruce Seed Development and Somatic Embryo Formation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**. v.37, n.1, p.24-28, Jan. 2001. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0005-2>

GRZYBKOWSKA D., MOROŃCZYK J., WÓJCIKOWSKA B. *et al.* Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in Arabidopsis. **Plant Growth Regulation**. v.85, p.243–256, Jun. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0389-1>

GUAN Y., LI S., FAN X., SU Z. Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Frontiers in Plant Science**. v.938, n.7, Jun. 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>

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

HAND M. L.; VRIES S.; KOLTUNOW A. M. G. A Comparison of In Vitro and In Vivo Asexual Embryogenesis. In: **In Vitro Embryogenesis in Higher Plants**. 1. ed. New York City: Springer, 2016. p.3-23.

HARDING E.W., TANG W., NICHOLS K.W., FERNANDEZ D.E., PERRY S.E. Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through

constitutive expression of AGAMOUS-Like15. **Plant Physiology**. v.133, p.653–663, 2003. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023499>

HE K., GOU X., YUAN T., LIN H., ASAMI T., YOSHIDA S., RUSSELL S.D., LI J. BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. **Current Biology**. v.17, p.1109–1115, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.036>

HE Y. ZHOU J. SHAN L. MENG X. Plant cell surface receptor-mediated signaling - a common theme amid diversity. **Journal of Cell Science**. v.131, n.2, Jan. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.209353>

HECK G.R., PERRY S.E., NICHOLS K.W., FERNANDEZ D.E. AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. **Plant Cell**. v.7, p.1271–1282, 1995. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.8.1271>

HUANG M., HU Y., LIU X., LI Y., HOU X. Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON 1* controls cell fate determination during post-embryonic development. **Frontiers in Plant Science**. v.6, n.955, Nov. 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00955>

HUMMEL J., STREHMEL N., BÖLLING C., SCHMIDT S., WALTHER D., KOPKA J. **Mass Spectral Search and Analysis Using the Golm Metabolome Database**. In: The Handbook of Plant Metabolomics, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. P.321-343.

Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). Histórico do Desempenho do Setor. Curitiba, 2020. Disponível em: <http://iba.org/pt/biblioteca-iba/historico-do-desempenho-do-setor>.

IKEUCHI M., IWASE A., RYMEN B., HARASHIMA H., SHIBATA M., OHMUNA M., PRC 2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in *Arabidopsis*. **Nature Plants**, v. 1, p.1–7, 2005. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.89>

JO L., DOS SANTOS A.L.W., BUENO C.A., BARBOSA H.R., FLOH E.I.S., Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential, **Tree Physiology**, v.34, n.1, p.94–104, 2014. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt102>

JONES, P.A.; TAYLOR, S.M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. **Cell**. v.20, p.85–93, 1980. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90237-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90237-8)

JUNKER A., MÖNKE G., RUTTEN T., KEILWAGEN J., SEIFERT M., THI T. M., RENOU J. P., BALZERGUE S., VIEHÖVER P., HÄHNEL U., LUDWIG-MÜLLER J., ALTSCHMIED L., CONRAD U., WEISSHAAR B., BÄUMLEIN H. Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**. v.71, n.3, p.427-442, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04999.x>

KARIM R., TAN Y.S., SINGH P. *et al.* Expression and DNA methylation of *SERK*, *BBM*, *LEC2* and *WUS* genes in in vitro cultures of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. **Physiology and Molecular Biology of Plants**. v.24, p.741–751, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0566-8>

KLIMASZEWSKA K., TRONTIN J.-F., BECWARD M.R., DEVILLARD C., PARK Y. & LELU-WALTER, M.-A. Recent Progress in Somatic Embryogenesis of Four *Pinus spp.* **Tree and Forestry Science and Biotechnology**. v.1, n.1, p.11-25, 2007.

KLIMASZEWSKA K., NOCEDA C., PELLETIER G. Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**. v.45, n.20, p. 1-16, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9158-6>

KLIMASZEWSKA K, OVERTON C, STEWART D, RUTLEDGE RG. Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. **Planta**. v.233, n.3, p.635–647, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1325-4>

KLIMASZEWSKA K, HARGREAVES C, LELU-WALTER MA, TRONTIN JF. Advances in Conifer Somatic Embryogenesis Since Year 2000. **Methods in Molecular Biology**. v.1359, p.131-66, 2016. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_7)

KLUBICOVÁ K., UVÁCKOVÁ L., DANCHENKO M., NEMECEK P., SKULTÉTY P., SALAJ J., SALAJ T. Insights into the early stage of *Pinus nigra* Arn. somatic embryogenesis using discovery proteomics. **Journal of Proteomics**. v.169, p.99-111, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.05.013>

KONRÁDOVÁ A., LIPAVSKÁ H., ALBRECHTOVÁ J., VREUGDENHIL D. Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogenesis in Norway spruce: content of soluble saccharides and localisation of key enzyme activities. **Journal of Plant Physiology**. v.159, p.387–396, 2002. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00624>

KRAJŇÁKOVÁ J, HÄGGMAN H. Somatic Embryogenesis of *Abies cephalonica* Loud. **Methods in Molecular Biology**. v.1359, p.417-430, 2016. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_22)

KUMAR, V., VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. **Acta Physiologiae Plantarum**. v.39, n.194, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2487-5>

KVAALEN H, JOHNSEN Ø. Timing of bud set in *Picea abies* is regulated by a memory of temperature during zygotic and somatic embryogenesis. **New Phytology**. v.177, n.1, p.49-59, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02222.x>

LÄMKE J, BÄURLE I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. **Genome Biology**. v.18, n.1, p.124-135, Jun 2017. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1263-6>

LASCOUX M, GLÉMIN S, SAVOLAINEN O. **Local adaptation in plants**. Encyclopedia of life sciences. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2016.

LELJAK-LEVANIC, D., BAUER, N., MIHALJEVIC, S., & JELASKA, S. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. **Plant cell reports**, v.23, n.3, p.120–127, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0819-6>

LI Q., ZHANG S., WANG J. Transcriptome analysis of callus from *Picea balfouriana*. **BMC Genomics**. v.15, n.553, p.1-9, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-553>

LI Y, DUNGEY HS. Expected benefit of genomic selection over forward selection in conifer breeding and deployment. **PLoS One**. v.13, n.12, p.1-21, Dez. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208232>

LIN X., LEUNG D.W.M. Culture of isolated zygotic embryos of *Pinus radiata* D. Don. Part II: biochemical changes associated with the conversion of isolated embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**. v.38, n.198, 2002. <https://doi.org/10.1079/IVPIVP2001261>

LIPAVSKÁ H., KONRÁDOVÁ H. Invited review: Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**. v.40, n.1, p.23-30, 2004. <https://doi.org/10.1079/IVP2003482>

LOTAN T., OHTO M.A., YEE K.M., WEST M.A.L., LO R., KWONG R.W. Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. **Cell**. v.93, n.7, p.1195-205, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81463-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81463-4)

MA L., XIE L., LIN G., JIANG S., CHEN H., LI H., TAKÁČ T., ŠAMAJ J., XU C. Histological changes and differences in activities of some antioxidant enzymes and hydrogen peroxide content during somatic embryogenesis of *Musa AAA* cv. Yueyoukang1. **Scientia Horticulturae**. v.144, n.6, p.87-92, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.06.039>

MA, J., HE, Y.H., HE, Z.Y. *et al.* Histological analysis of somatic embryogenesis in pineapple: *AcSERK1* and its expression validation under stress conditions. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**. v.25, p.49–55, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13562-015-0308-8>

MATALLANA-RAMIREZ, L. P., WHETTEN, R. W., SANCHEZ, G. M., & PAYN, K. G. Breeding for Climate Change Resilience: A Case Study of Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) in North America. **Frontiers in plant science**. v.12 n.606908, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.606908>

MAGNANI E., JIMÉNEZ-GÓMEZ J.M., SOUBIGOU-TACONNAT L. *et al.* Profiling the onset of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. **BMC Genomics**. v.18, n.998, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4391-1>

MAHDAVI-DARVARI F.; NOOR N.M.; ISMANIZAN, I. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.120, n.2, p.:407–422, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0615-0>

MAHER B. Personal genomes: the case of the missing heritability. **Nature**. v.456, p.18–21, 2008. <https://doi.org/10.1038/456018a>

MALABADI R. B.; NATARAJA K. Putrescine influences somatic embryogenesis and plant regeneration in *Pinus gerardiana* Wall. **American Journal of Plant Physiology**. v.2, n.2, p.107-114, 2007. <https://doi.org/10.3923/ajpp.2007.107.114>

MARSONI M, BRACALE M, ESPEN L, PRINSI B, NEGRI AS, VANNINI C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. **Plant Cell Reports**. v.27, n.2, p.347–356, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0438-0>

MESKAOUI A.E., TREMBLAY F.M. Effects of exogenous polyamines and inhibitors of polyamine biosynthesis on endogenous free polyamine contents and the maturation of white spruce somatic embryos. **African Journal of Biotechnology**. v.8, n.24, p.6807-6814, 2015. <https://doi.org/10.5897/AJB2009.000-9528>

MONCALEÁN P., GARCÍA-MENDIGUREN O., NOVÁK O., STRNAD M., GOICOA T., UGARTE M.D., MONTALBÁN I.A. Temperature and Water Availability During Maturation Affect the Cytokinins and Auxins Profile of Radiata Pine Somatic Embryos. **Frontiers in Plant Science**. v.9, n.1898, Dez.2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01898>

MONTALBÁN IA, GARCÍA-MENDIGUREN O, MONCALEÁN P. Somatic Embryogenesis in *Pinus spp.* **Methods in molecular biology**. v.1359, p.405-415, 2016. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_21)

MORGANTE C.V. & BLAWID R. **Análise da Expressão Gênica pela Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real: Princípios e Fundamentos**. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Semiárido, 2016. E-book. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/157145/1/SDC278.pdf>

NICOTRA, A. B., ATKIN, O. K., BONSER, S. P., DAVIDSON, A. M., FINNEGAN, E. J., MATHESIUS, U., POOT, P., PURUGGANAN, M. D., RICHARDS, C. L., VALLADARES, F., & VAN KLEUNEN, M. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. **Trends in plant Science**. v.15, n.12, p.684–692. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.09.008>

NOCEDA, C., SALAJ, T., PÉREZ, M. *et al.* DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. **Trees**. v.1285, n.23, Jun. 2009. <https://doi.org/10.1007/s00468-009-0370-8>

NEALE DB, WEGRZYN JL, STEVENS KA, ZIMIN AV, PUIU D, CREPEAU MW, CARDENO C, KORIABINE M, HOLTZ-MORRIS AE, LIECHTY JD, MARTÍNEZ-GARCÍA PJ, VASQUEZ-GROSS HA, LIN BY, ZIEVE JJ, DOUGHERTY WM, FUENTES-SORIANO S, WU LS, GILBERT D, MARÇAIS G, ROBERTS M, HOLT C, YANDELL M, DAVIS JM, SMITH KE, DEAN JF, LORENZ WW, WHETTEN RW, SEDEROFF R, WHEELER N, MCGUIRE PE, MAIN D, LOOPSTRA CA, MOCKAITIS K, DEJONG PJ, YORKE JA, SALZBERG SL, LANGLEY CH. Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies. **Genome Biol**. v.15, n.3, Mar. 2014. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r59>

NYSTEDT, B., STREET, N., WETTERBOM, A. *et al.* The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. **Nature**. v.497, p.579–584, 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12211>

NODINE M.D., YADEGARI R., TAX F.E. RPK1 and TOAD2 are two receptor-like kinases redundantly required for *Arabidopsis* embryonic pattern formation. **Developmental Cell**. v.12, n.6, p.943–956, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.003>

NUNES S., MARUM L., FARINHA N., PEREIRA V.T., ALMEIDA T., SOUSA D., MANO N., FIGUEIREDO J., DIAS M.C., and SANTOS C. Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants. **Plant cell, tissue, and organ culture**. v.132, n. 1, p.71-84, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1311-7>

NUNES-NESI A, FERNIE AR, STITT M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**. v.3, n.6, p.973-996. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq049>

OSORIO-MONTALVO P, SÁENZ-CARBONELL L, DE-LA-PEÑA C. 5-Azacytidine: A Promoter of Epigenetic Changes in the Quest to Improve Plant Somatic Embryogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**. v.19, n.10, Oct. 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19103182>

OSORIO-MONTALVO, P., DE-LA-PEÑA, C., OROPEZA, C. *et al.* A peak in global DNA methylation is a key step to initiate the somatic embryogenesis of coconut palm (*Cocos nucifera* L). **Plant Cell Report**. v.39, p.1345–1357, Ago. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02568-2>

PARK SY, KLIMASZEWSKA K, PARK JY, MANSFIELD SD. Lodgepole pine: the first evidence of seed-based somatic embryogenesis and the expression of embryogenesis marker genes in shoot bud cultures of adult trees. **Tree Physiology**, v.30, n.11, p.1469–1478, Nov. 2010. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq081>

PEREIRA C, CASTANDER-OLARIETA A, MONTALBÁN IA, PĚNČÍK A, PETŘÍK I, PAVLOVIĆ I, DE MEDEIROS OLIVEIRA E, FREITAS FRAGA HPD, GUERRA MP, NOVÁK O, STRNAD M, CANHOTO J, MONCALEÁN P. Embryonal Masses Induced at High Temperatures in Aleppo Pine: Cytokinin Profile and Cytological Characterization. **Forests**. v.11, n.8, p.807-832, Jul. 2020. <https://doi.org/10.3390/f11080807>

PEREIRA C., MONTALBÁN I.A., GARCÍA-MENDIGUREN OLATZ GARCÍA-MENDIGUREN O., GOICOA T. *Pinus halepensis* somatic embryogenesis is affected by the physical and chemical conditions at the initial stages of the process. **Journal of Forest Research**. v.21, n.3, p.143-150, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10310-016-0524-7>

PÉREZ, M.; VIEJO, M.; LACUESTA, M.; TOOROP, P.; CAÑAL, M.J. Epigenetic and hormonal profile during maturation of *Quercus suber* L. somatic embryos. **J. Plant Physiology**. v.173, p.51–61, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.07.028>

PÉREZ-OLIVER, M.A.; HARO, J.G.; PAVLOVIĆ, I.; NOVÁK, O.; SEGURA, J.; SALES, E.; ARRILLAGA, I. Priming Maritime Pine Megagametophytes during Somatic Embryogenesis Improved Plant Adaptation to Heat Stress. **Plants**. v.10, n.446, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10030446>

PILA QUINGA, L.A., PACHECO DE FREITAS FRAGA, H., DO NASCIMENTO VIEIRA, L. *et al.* Epigenetics of long-term somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L.: DNA methylation and recovery of embryogenic potential. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.131, p.295–305, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1284-6>

PILARSKA M., MALEC P., SALAJ J., BARTNICKI F., KONIECZNY R. High expression of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* coincides with initiation of various developmental pathways in in vitro culture of *Trifolium nigrescens*. **Protoplasma**. v.253, n.2, p.345-3551, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0814-5>

PLOMION, C., BASTIEN, C., BOGEAT-TRIBOULOT, MB. *et al.* Forest tree genomics: 10 achievements from the past 10 years and future prospects. **Annals of Forest Science**. v.73, p.77–103, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0488-3>

PULLMAN G.S, BUCHANAN M. Identification and quantitative analysis of stage-specific carbohydrates in loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo and female gametophyte tissues. **Tree Physiol**. v.28, n.7, p.985-996, 2008. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.7.985>

PULLMAN, G.S., BUCALO, K. Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development. **New Forests**. v.45, p.353–377, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11056-014-9407-y>

PULLMAN, G.S. Embryogenic Tissue Initiation in Loblolly Pine (*Pinus Taeda L.*). In: JAIN, Shri Mohan; GUPTA, Pramod. de (Ed.) **Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants**. New York City: Springer, 2018. p. 13-31.

RADOEVA T, WEIJERS D. A roadmap to embryo identity in plants. **Trends in plant science**, v.19, n.11, p.709–716. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.009>

REE, J.F., POLESI, L.G., BACK, F. *et al.* Aging peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures lose embryogenic potential and metabolic cellular function due to continuous culture in hypoxic environments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.140, p.49–67, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01710-7>

REINERT, J. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. **Naturwissenschaften**. v.45, n.14, p.344–345, 1958. <https://doi.org/10.1007/BF00640240>

ROBINSON AR, DAUWE R, UKRAINETZ NK, CULLIS IF, WHITE R, MANSFIELD SD. Predicting the regenerative capacity of conifer somatic embryogenic cultures by metabolomics. **Plant Biotechnology Journal**. v.7, n.9, p.952-963, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00456.x>

RODE C, LINDHORST K, BRAUN HP, WINKELMANN T. From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. **Planta**. v.235, n.5, p.995-1011, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1554-1>

RODRÍGUEZ, M.J.P., SUÁREZ, M.F., HEREDIA, R., *et al.* Expression patterns of two glutamine synthetase genes in zygotic and somatic pine embryos support specific roles in nitrogen metabolism during embryogenesis. **New Phytologist**. v.169, n.1, p.35 - 44, Jan 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01551.x>

ROESSNER U, LUEDEMANN A, BRUST D, *ET AL.* Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **Plant Cell**. v.13, n.1, p.11-29. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.11>

SAEZ-LAGUNA E, GUEVARA M-A, DIAZ L-M, SANCHEZ-GOMEZ D, COLLADA C, *et al.* Epigenetic Variability in the Genetically Uniform Forest Tree Species *Pinus pinea* L. **PLoS ONE**. v.9, n.8, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103145>

SALAJ J, VON RECKLINGHAUSEN IR, HECHT V, DE VRIES SC, SCHEL JH, VAN LAMMEREN AA. *AtSERK1* expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.46, n.7, p.709–714, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.04.011>

SALO H.M., SARJALA T., JOKELA A., HÄGGMAN H., VUOSKU J., Moderate stress responses and specific changes in polyamine metabolism characterize Scots pine somatic embryogenesis. **Tree Physiology**. v.36, n.3, p.392–402, 2016. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv136>

SANTOS M.O., ROMANO E., YOTOKO K.S.C., TINOCO M.L.S., DIAS B.B.A., ARAGÃO F.L.J. Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**. v.168, n.3, p.723-729, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.10.004>.

SCHLÖGL, P.S., DOS SANTOS, A.L.W., DO NASCIMENTO VIEIRA, L. *et al.* Gene expression during early somatic embryogenesis in Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.108, p.173–180, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0023-7>

SCHMIDT E.D., GUZZO F., TOONEN M.A., DE VRIES, S.C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**. v.124, n.10, p.2049–2062, 1997. Disponível em: <https://journals.biologists.com/dev/article/124/10/2049/39242/A-leucine-rich-repeat-containing-receptor-like>

SILVA, V., BOSTWICK, D., BURNS, K.L. *et al.* Isolation and characterization of a molecule stimulatory to growth of somatic embryos from early stage female gametophyte tissue of loblolly pine. **Plant Cell Reports**. v.27, p.633–646, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0484-7>

SHIMIZU, J.Y. *Pinus* na silvicultura brasileira. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 223p. Recuperado de <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/315381/pinus-na-silvicultura-brasileira>

SMERTENKO A.; BOZNHOV, P.V. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. **Journal Experimental Botany**. v.65, p.1343–13609, 2014. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru005>

SOARES C., CARVALHO M.E.A., AZEVEDO R. A., FIDALGO F. Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks. **Environmental and Experimental Botany**. v.161, p.4-25, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.009>.

SONG, Y., BAI, X., DONG, S., YANG, Y., DONG, H., WANG, N., ZHANG, H., & LI, S. (2020). Stable and Efficient Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Larch Using Embryogenic Callus. **Frontiers in plant science**, v.11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.584492>

SOW M.D., ALLONA I., AMBROISE C., CONDE D., FICHOT R., GRIBKOVA S., JORGE V., LE-PROVOST G., PÂQUES L., PLOMION C., SALSE J., SANCHEZ-RODRIGUEZ L., SEGURA V., TOST J., MAURY S. SOLÍS, M.-T.; EL-TANTAWY, A.-A.; CANO, V.; RISUEÑO, M.C.; TESTILLANO, P.S. 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. **Frontiers in Plant Science**. v.6, n.472, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00472>

SOW M.D., ALLONA I., AMBROISE C., CONDE D., FICHOT R., GRIBKOVA S., JORGE V., LE-PROVOST G., PÂQUES L., PLOMION C., *ET AL.* Epigenetics in forest trees: state of the art and potential implications for breeding and management in a context of climate change. **Advances in Botany Research**. v.88, p.387–453, 2018. [doi.org/10.1016/bs.abr.2018.09.003](https://doi.org/10.1016/bs.abr.2018.09.003)

STEINER N., SANTA-CATARINA C., GUERRA M.P., CUTRI L., DORNELAS M.C., FLOH E.I.S. A gymnosperm homolog of somatic embryogenesis receptor-like kinase-1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.109, p.41–50, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0071-z>.

STEINER N., VIEIRA F.D.N., MALDONADO S., GUERRA M.P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.48, p.895–903, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000800005>

STONE S.L., BRAYBROOK S.A., PAULA S.L., KWONG L.W., MEUSER J., PELLETIER J. *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON 2* induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.105, n.8, p.3151–3156, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712364105>

SU Y.H., ZHAO X.Y., LIU Y.B., ZHANG C.L., O'NEILL S.D., ZHANG X.S. Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. **Plant Journal**. v.59, p.448–460, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03880.x>

TAIZ L, ZEIGER E, MØLLER IM, MURPHY A. 2017. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

TAYLOR, S.M.; JONES, P.A. Mechanism of action of eukaryotic DNA methyltransferase: Use of 5-azacytosine-containing DNA. **Journal of molecular biology**. v.162, p.679–692, 1982. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90395-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90395-3)

TELLMAN G, GEULEN O. LightCycler 480 Real-Time PCR System: innovative solutions for relative quantification. **Biochemica**. 2006. 4:16–18. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwimv-HMpdX1AhWwqZUCHd3qDZgQFnoECA8QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.gene-quantification.de%2Fbiochemica-4-2006.pdf&usq=AOvVaw0onBRD27zWxlvJhRM44SLo>

TEYSSIER, C.; MAURY, S.; BEAUFOUR, M.; GRONDIN, C.; DELAUNAY, A.; LE METTÉ, C.; ADER, K.; CADENE, M.; LABEL, P.; LELU-WALTER, M.A. In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): Global DNA methylation and proteomic analyses. **Physiologia plantarum**, v.150, n.2, p.271–291. <https://doi.org/10.1111/ppl.12081>

TORN M.; ALBRECHT C.; Vries, S. On the Origin of SERKs: Bioinformatics Analysis of the Somatic Embryogenesis Receptor Kinases. **Molecular Plant**, v.8, n.5, p.762–82, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.015>

TRONTIN J.-F.; KLIMASZEWSKA, K.; MOREL A.; HARGREAVES C.; LELU-WALTER M.-A. Molecular Aspects of Conifer Zygotic and Somatic Embryo Development: A Review of Genome-Wide Approaches and Recent Insights. In: GERMANÀ, Maria A.; LAMBARDI, Maurizio. de (Ed.) **In Vitro Embryogenesis in Higher Plants**. New York City: Springer, 2016. p.3-23.

TRONTIN J.F., RASCHKE J., RUPPS A. Tree 'memory': new insights on temperature-induced priming effects during early embryogenesis. **Tree Physiol**. v.41, n.6, p.906–911, 2021. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa150>

UDDENBERG D, VALLADARES S, ABRAHAMSSON M, SUNDSTRÖM JF, SUNDÅSLARSSON A, VON ARNOLD S. Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor. **Planta**. v.234, p.527–539, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1418-8>

VERDEIL, J.-L., ALEMANN, L., NIEMENAK, N. AND TRANBARGER, T.J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**. v.12, p.245–252, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.002>

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.233-249, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>

VOSS I, SUNIL B, SCHEIBE R, RAGHAVENDRA AS. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. **Plant Biol (Stuttg)**. v.15, n.4, p.713-722, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00710.x>

VUOSKU J., SUORSA M., RUOTTINEN M., SUTELA S., RIINA MUILU-MÄKELÄ, RIITTA JULKUNEN-TIITTO, TYTTI SARJALA, PETER NEUBAUER, HELY HÄGGMAN, Polyamine metabolism during exponential growth transition in Scots pine embryogenic cell culture, **Tree Physiology**. v.32, n.1, p.1274–1287, 2012. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps088>

WANG X., NIU Q.-W., TEN C. LI C. MU, J. CHUA, N.-H. Overexpression of PGA37/MYB118 and MYB115 promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **Cell Res**. 19:224–235, 2009. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.276>

WALTHER, M., WAGNER, I., RASCHKE, J. *et al.* Abscisic acid induces somatic embryogenesis and enables the capture of high-value genotypes in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* [MIRB.] Franco). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.148, p.45–59, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02159-3>

WATANABE M., CHIBA Y., HIRAI M.Y. Metabolism and Regulatory Functions of O-Acetylserine, S-Adenosylmethionine, Homocysteine, and Serine in Plant Development and Environmental Responses. **Frontiers in Plant Science**. v.12, n.593, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.643403>

WILLEMSSEN V.; SCHERES B. Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. **Annual Review of Genetics**. v.38, p.587–614, 2004. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092231>

WINKELMANN, T. Somatic Versus Zygotic Embryogenesis: Learning from Seeds. *In*: GERMANÀ, Maria A.; LAMBARDI, Maurizio. de (Ed.) **In Vitro Embryogenesis in Higher Plants**. New York City: Springer, p.25-46, 2016. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2)

WÓJCIKOWSKA, B., BOTOR, M., MORONCZYK, J., WÓJCIK, A. M., NODZYNSKI, T., KARCZ, J., & GAJ, M. D. Trichostatin A Triggers an Embryogenic Transition in *Arabidopsis* Explants via an Auxin-Related Pathway. **Frontiers in plant science**, v.9, 2018. Doi <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01353>

WU, G., WEI, X., WANG, X. *et al.* Changes in biochemistry and histochemical characteristics during somatic embryogenesis in *Ormosia henryi* Prain. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.144, p.505–517, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01973-5>

YAKOVLEV I., FOSSDAL C.G., JOHNSEN O. MicroRNAs, the epigenetic memory and climatic adaptation in Norway spruce. **New Phytol.** v.187, p.1154–1169, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01973-5>

YAMAMOTO, N., KOBAYASHI, H., TOGASHI, T., MORI, Y., KIKUCHI, K., KURIYAMA, K., & TOKUJI, Y. Formation of embryogenic cell clumps from carrot epidermal cells is suppressed by 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor. **Journal of plant physiology**, v.162, n.1, 47–54, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.05.013>

YANG C., BRATZEL F., HOHMANN N., KOCH M., TURCK F., CALONJE M. VAL-and AtBMI1-Mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to post germinative growth in *Arabidopsis*. **Current Biology**. v.23, v. 14, p.1324–1329, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.050>

YANG, F., XIA, XR., KE, X. *et al.* Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii* Engelm): improving initiation of embryogenic tissues and maturation of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.143, 159–171 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01905-3>

YILDIRIM T, KAYA Z, ISIK K. Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEN. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.87, p.67–76, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9137-8>

ZHANG, Y., ZHANG, Y., YU, J. *et al.* NaCl-responsive ROS scavenging and energy supply in alkali grass callus revealed from proteomic analysis. **BMC Genomics**. v.20, n.990, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6325-6>

ZHONG, X., GUO, J., DENG, Y. Pixel-Classification-Based Reticulocyte Detection in Blood-Smear Microscopy Images. **Journal of Medical Devices**. v.13, n.4, 2019. <https://doi.org/10.1115/1.4043919>

ZELITCH I. Comparison of the effectiveness of glycolic Acid and glycine as substrates for photorespiration. **Plant Physiology**. v.50, n.1, p.109-113, 1972. <https://doi.org/10.1104/pp.50.1.109>

ZIMIN A. V., KRISTIAN A. STEVENS, MARC W. CREPEAU, DANIELA PUIU, JILL L. WEGRZYN, JAMES A. YORKE, CHARLES H. LANGLEY, DAVID B. NEALE, STEVEN L. SALZBERG. An improved assembly of the loblolly pine mega-genome using long-read single-molecule sequencing. **GigaScience**. v.6, n.1, 2017. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giw016>

ZUO J., NIU Q.W., FRUGIS G., CHUA N.H. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **Plant Journal**. v.30, p.349–359, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01289.x>

ANEXO 1 - Variação da concentração de ácido glicólico em MPEs de *Pinus elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* sob efeito de azacitidina.

