

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO DIEGO KAZIUK

EFEITO DO ESTRESSE PELO AUMENTO DE TEMPERATURA NA
RESPIRAÇÃO, NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E
EXPRESSÃO DO GENE *AaSERK* EM CÉLULAS DE *Araucaria angustifolia*
COM DIFERENTES POTENCIAIS EMBRIOGÊNICOS

CURITIBA

2021

FERNANDO DIEGO KAZIUK

EFEITO DO ESTRESSE PELO AUMENTO DE TEMPERATURA NA
RESPIRAÇÃO, NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E
EXPRESSÃO DO GENE *AaSERK* EM CÉLULAS DE *Araucaria angustifolia*
COM DIFERENTES POTENCIAIS EMBRIOGÊNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências
Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Maria S. C. Cadena
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Glaucia Regina Martinez

CURITIBA

2021

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

Kaziuk, Fernando Diego

Efeito do estresse pelo aumento de temperatura na respiração, níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e expressão do gene *AaSERK* em células de *Araucaria angustifolia* com diferentes potenciais embriogênicos / Fernando Diego Kaziuk. – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Maria S. C. Cadena.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Glaucia Regina Martinez.

1. *Araucaria angustifolia*. 2. Aquecimento global. 3. Plantas – Efeito da temperatura. 4. Plantas lenhosas – Embriogênese somática. I. Cadena, Silvia Maria Suter Correia-1967-. II. Martinez, Glaucia Regina. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

ATA Nº329

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

No dia dezesseis de dezembro de dois mil e vinte e um às 14 horas, na sala Ambiente virtual Teams, Defesa remota - ambiente virtual Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando **FERNANDO DIEGO KAZIUK**, intitulada: **EFEITO DO ESTRESSE PELO AUMENTO DE TEMPERATURA NA RESPIRAÇÃO, NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E EXPRESSÃO DO GENE AaSERK EM CÉLULAS DE *Araucaria angustifolia* COM DIFERENTES POTENCIAIS EMBRIOGÊNICOS**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), LUCIANA LOPES FORTES RIBAS (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), MARIA ELIANE MERLIM ROCHA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ROGÉRIO ANTÔNIO KRUEK (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 16 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

14/01/2022 17:56:17.0

SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/01/2022 12:56:59.0

LUCIANA LOPES FORTES RIBAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

12/01/2022 06:03:21.0

GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

11/01/2022 22:04:38.0

MARIA ELIANE MERLIM ROCHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/01/2022 09:21:05.0

ROGÉRIO ANTÔNIO KRUEK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 141407

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 141407



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FERNANDO DIEGO KAZIUK** intitulada: **EFEITO DO ESTRESSE PELO AUMENTO DE TEMPERATURA NA RESPIRAÇÃO, NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) E EXPRESSÃO DO GENE AaSERK EM CÉLULAS DE *Araucaria angustifolia* COM DIFERENTES POTENCIAIS EMBRIOGÊNICOS**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 16 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

14/01/2022 17:56:17.0

SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/01/2022 12:56:59.0

LUCIANA LOPES FORTES RIBAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

12/01/2022 06:03:21.0

GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

11/01/2022 22:04:38.0

MARIA ELIANE MERLIM ROCHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/01/2022 09:21:05.0

ROGÉRIO ANTÔNIO KRUEK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 141407

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 141407

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados familiares Zeno, Isaura, Jéssica, Elizandro, Alcione e Joice. Que sempre estiveram comigo em todas as adversidades e momentos, vocês são tudo que eu preciso, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela vida, pela saúde e coragem durante todo esse tempo.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial a Prof. Dra. Fabiane Fortes.

À professora Profa. Dra. Sílvia Maria Suter Correia Cadena. Graças a ela tudo foi possível. Agradeço por todos ensinamentos, pelo incentivo, pelas orientações, pela paciência, por mostrar que a bondade e a educação são a melhor solução. Saiba que sua amizade e carinho permanecerão para sempre em minha memória e em meu coração.

À minha coorientadora Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez, por todo ensinamento, apoio, carinho e atenção que teve comigo.

À professora Profa. Dra. Eny lochevet Segal Floh (IBUSP). Pela gentileza em ceder às células embriogênicas de *A. angustifolia*, que foram utilizadas nesse trabalho.

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, que foram importantes no desenvolvimento desse trabalho, em especial a banca interna Profs. Dras. Maria Eliane Merlin Rocha e Juliana Bello Baron Maurer, pelas valiosas correções e dicas no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório oxidações 1 e demais laboratórios, em especial a Aninha pelo incentivo e pelo apoio constante nos experimentos.

Ao centro de RMN da UFPR, em especial ao Arquimedes, Leociley e Guilherme por sempre serem gentis e cederem o nitrogênio necessário para realizar os experimentos.

À Rafaela, Elizabeth e Henrique pela atenção e ajuda com os experimentos de Western blot e PCR.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Bioquímica e a CAPES.

“Saruman acredita que apenas um grande poder pode manter o mal sobre controle, mas não é o que descobri. Descobri que são as pequenas coisas, as tarefas diárias de pessoas comuns que mantêm o mal afastado, simples ações de bondade e amor.”

(O Hobbit: Uma Jornada Inesperada. Peter Jackson. New Line Cinema, Metro-Goldwyn-Mayer e WingNut Films. 2012).

RESUMO

Araucaria angustifolia (Bertol) Kuntze, também conhecida como Pinheiro do Paraná está atualmente classificada como espécie em extinção. O aquecimento global representa uma nova ameaça para a floresta de araucária remanescente, uma vez que esta espécie é adaptada a regiões de temperatura média entre 12 e 18 °C. Sabe-se também que o desenvolvimento de embriões somáticos (ES), que podem ser utilizados em estratégias de reflorestamento desta espécie, sofre a influência dos níveis de espécies reativas de oxigênio e da expressão do gene *SERK*, entre outros fatores, que podem atuar como sinalizadores no desenvolvimento da araucária. Assim, este estudo teve como objetivo investigar o efeito do estresse pelo aumento de temperatura (30 °C) sobre fatores que possam interferir no desenvolvimento de embriões somáticos de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, com diferentes potenciais de maturação. Para tanto, foram utilizadas linhagens celulares de *A. angustifolia* responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) ao desenvolvimento de embriões somáticos, submetidas ao estresse por alta temperatura (30 ± 1°C), por 24, 48 e 72h. A avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de transmissão mostrou que as células SE1 e SE6 foram diferentemente afetadas pelo estresse. Para a linhagem SE6, após o estresse de 48h, observou-se um menor número de mitocôndrias de tamanho reduzido. No maior tempo de estresse (72h), estas organelas estavam rompidas em ambas as linhagens. Os níveis basais de ERO foram maiores na linhagem SE1 quando as células foram cultivadas na condição controle (25 ± 1 °C). O estresse por 24h aumentou os níveis de ERO na linhagem SE1, seguindo-se uma redução em 48 e 72h. Por sua vez, na linhagem SE6, os níveis de ERO aumentaram após 24 e 48h de estresse, retornando aos níveis de controle nas 72 h. A proteína ATP sintase (subunidade β) foi encontrada nas duas linhagens, porém, em maior quantidade na linhagem SE6. O consumo de oxigênio foi maior, para todos os substratos avaliados (Glutamato mais malato, NADH, succinato e TMPD/ascorbato), em mitocôndrias da linhagem SE6. Não houve diferença na expressão da enzima AOX entre as linhagens, mas sua atividade foi maior nas células SE6 cultivadas a 25 ± 1 °C. Em condições de estresse, o consumo de oxigênio foi maior (24h) na linhagem SE1 e reduzido na linhagem SE6 para todos os tempos de exposição. O gene *AaSERK1* foi identificado em ambas as culturas, com maior expressão na linhagem SE1. Em condições de estresse houve um aumento na expressão desse gene para a linhagem SE1, em 24 e 48h. A partir destes resultados é possível concluir que as linhagens SE1 e SE6 respondem de forma distinta quando submetidas ao estresse pelo aumento de temperatura, sugerindo que este fator pode interferir no desenvolvimento de embriões de *Araucaria angustifolia*. Os resultados evidenciam, ainda, que os mecanismos de resposta ao estresse das células SE1 (responsivas) são mais efetivos em modular os níveis de ERO, que, por sua vez, estão relacionados a capacidade de maturação destas células.

Palavras-chave: Araucária, aquecimento global, estresse térmico, embriogênese somática.

ABSTRACT

Araucaria angustifolia (Bertol) Kuntze, also known as Parana pine, is currently classified as endangered. Global warming represents a new threat to the remaining Araucaria Forest since this species is adapted to regions with temperatures between 12 and 18 °C. It is also known that the development of somatic embryos (SE), which can be used in reforestation strategies for this species, is influenced by oxygen-reactive species levels and *SERK* gene expression, among other factors. Thus, this study aimed to investigate the effect of stress caused by temperature increase (30 °C) on certain factors that may interfere with the development of somatic embryos of *A. angustifolia* embryogenic cultures with different maturation potentials. For that, *A. angustifolia* cell lines responsive (SE1) and non-responsive (SE6) to the development of somatic embryos were subjected to high-temperature stress (30 ± 1 °C), for 24, 48 and 72h. Transmission electron microscopy analysis showed that SE1 and SE6 cells were differently affected by stress. After 48h stress, a smaller number of mitochondria was observed for SE6 lineage. In the longest time of stress (72h), these organelles were disrupted in both lines. ROS levels were already higher in the SE1 line when cells were cultured in the control condition (25 ± 1 °C). Stress for 24h increased ROS levels in the SE1 line, followed by a reduction in 48 and 72h. In turn, in the SE6 line, ROS levels increased after 24 and 48 hours of stress, returning to control levels at 72 hours. ATP synthase (β subunit) was identified in both lines; however, in greater amount in the SE6 line. Respiration was higher for all evaluated substrates (Glutamate plus malate, NADH, succinate and TMPD/ascorbate) in mitochondria from SE6 line. There was no difference in the expression of the AOX enzyme between the lines, but its activity was higher in SE6 cells cultured at 25 ± 1 °C. Under stress conditions, oxygen consumption was higher (24h) in the SE1 line and reduced in the SE6 line for all exposure times. The *AaSERK1* gene was identified in both cultures, with greater expression in the SE1 line. An increase in the expression of *AaSERK1* occurred after heat stress by 24 and 48 h for SE1 cells. Based on these results, it is possible to conclude that the SE1 and SE6 lines respond differently when subjected to stress due to increased temperature, suggesting that this factor may interfere with the development of *A. angustifolia* embryos. The results also show that the stress response mechanisms of SE1 (responsive) cells are more effective in modulating ROS levels, which, in turn, are related to the maturation capacity of these cells.

Keywords: Araucaria, global warming, heat stress, somatic embryogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS LINHAGENS SE1 E SE6 SUBMETIDAS AO ESTRESSE PELO CALOR	45
Figura 2 – NÍVEIS DE ERO DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS SE1 E SE6 ESTRESSADAS PELO AUMENTO DE TEMPERATURA	49
Figura 3 – DETECÇÃO DA PROTEÍNA ATP β EM CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i>	52
Figura 4 – PERFIL DA RESPIRAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE CELULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i>	54
Figura 5 – COMPARAÇÃO ENTRE A RESPIRAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE CELULAS EMBRIOGÊNICAS SE1 E SE6 DE <i>A. angustifolia</i> . ..	55
Figura 6 – DETECÇÃO DA PROTEÍNA AOX EM CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i>	57
Figura 7 – ATIVIDADE E PRESENÇA DA AOX EM CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE PELO AUMENTO DE TEMPERATURA	60
Figura 8 – EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE AaSERRK1 EM CULTURAS SE1 E SE6	63
Figura 9 – EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE AaSERRK1 EM CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSE PELO AUMENTO DE TEMPERATURA 30°C	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Antimicina A

AaSERK1 - *Araucaria angustifolia Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1*

ACN - Acetonitrila

AcSERK2 - *Ananas comosus Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 2*

ADC - Arginina descarboxilase

AOX - Oxidase alternativa

APX - Ascorbato peroxidase

ASA - Ácido ascórbico

BER - *Base Excision Repair*

BSA - Bovine serum albumin

CAT - Catalase

cDNA - DNA complementar

DAR-4M - Diaminorododina-4M

DCF - Diclorofluoresceína oxidada

DCFH - Diclorofluoresceína reduzida

DCFH-DA - Acetato de diclorofluoresceína

DHAR - Dehidroascorbato redutase

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ES - Embriogênese somática

FCCP - Cianeto de carbonila-4-fenil-hidrazona

GC - Cromatografia gasosa

GPX - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione redutase

GSH - Glutathione

HPLC - Cromatografia líquida de alta precisão

HvSERK1 - *Hordeum vulgare Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1*

HvSERK3 - *Hordeum vulgare Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 3*

IBUSP - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

LRR-RLKs - Proteína quinase receptora transmembrana rica em sequências de leucina

LsSERK - *Lactuca sativa Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*

MCP - Morte celular programada

MDHAR - Monodehidroascorbato redutase
MdSERK - *Malus hupehensis Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MPE - Massa pró-embrionária
NADex - NAD(P)H desidrogenases externas
NADin - NAD(P)H desidrogenases internas
NASA - Administração Nacional de Aeronáutica e Espaço
NDs - NAD(P)H desidrogenases
ODC - Ornitina descarboxilase
OsSERK1 - *Oryza sativa Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1*
Prxs - Peroxidases
PUMP - Proteína desacopladora de plantas
Put - Putrescina
qRT-PCR - Polymerase chain reaction quantitative real time
ERN - Espécies reativas de nitrogênio
SAM - S-adenosil-metionina
SE1 - *Somatic embryogenic cells 1*
SE6 - *Somatic embryogenic cells 6*
SERK - *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*
SHAM - Ácido salicilhidroxâmico
SOD - Superóxido dismutase
Spd - Espermidina
SPDS - Espermidina sintase
Spm - Espermina
SPMS - Espermina sintase
TBS - Tampão tris(hidroximetil)aminometano
TBS-T - Tampão tris(hidroximetil)aminometano com polissorbato
TMPD - N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina
TOC - Tocoferóis
UBI1 – Ubiquitina 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.2 Justificativa e objetivo	19
1.3 Estratégia experimental.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 <i>Araucaria angustifolia</i>	22
2.2 Embriogênese somática como modelo de estudo.....	24
2.3 Variações de temperatura e desenvolvimento de plantas	28
2.4 Marcadores bioquímicos em embriões somáticos	31
2.4.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN).....	31
2.4.2 Poliaminas	33
2.4.3 Etileno.....	35
2.4.4 Gene <i>SERK</i>	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.2 Reagentes.....	37
3.3 Cultivo das linhagens embriogênicas de <i>A. angustifolia</i>	37
3.4 Condições de estresse	38
3.5 Análise morfológica	38
3.6 Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO)	39
3.7 Isolamento de mitocôndrias	39
3.8 Respiração mitocondrial.....	40
3.9 Respiração celular via AOX	41
3.10 Western blot	41
3.11 Expressão do gene <i>AaSERK1</i>	42
3.12 Determinação da concentração de proteínas.....	43
3.13 Análise Estatística	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.2 Morfologia	44
4.3 Níveis de ERO	47
4.4 Identificação da ATP sintase (subunidade β).....	51
4.5 Respiração	53
4.6 Atividade e expressão da enzima AOX	57
4.7 Expressão do gene <i>AaSERK1</i>	62
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67

6	REFERÊNCIAS	69
----------	--------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, também conhecida como Araucaria ou pinheiro brasileiro, é uma conífera da família Araucariaceae (REITZ; KLEIN, 1966), de ocorrência natural na floresta ombrófila mista, especificamente no bioma mata atlântica do Brasil (MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2004). Essa espécie possui madeira de alta qualidade, sendo a única conífera nativa de importância econômica no Brasil (Silveira, Steiner, Santos, Nodari, & Guerra, 2002). Devido a sua intensa exploração até a década de 70 (MATTOS, 1994) apenas 2% de sua área original ainda persistem (ASTARITA & GUERRA, 2000; GUERRA, SILVEIRA, DOS SANTOS, ASTARITA, & NODARI, 2000; NODARI, 2016; STEFENON, KLABUNDE, LEMOS, ROGALSKI, & NODARI, 2019; THOMAS, 2013). As projeções sugerem que as mudanças climáticas poderão ser capazes de causar uma redução de 60% dos nichos climáticos adequados para o desenvolvimento da espécie até o ano de 2070 (CASTRO et al., 2020). Atualmente, a *A. angustifolia* é classificada como espécie criticamente ameaçada pela União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN) (THOMAS, 2013).

O aquecimento global representa uma nova ameaça para a floresta de araucária remanescente, uma vez que esta espécie é adaptada a regiões onde a temperatura média varia entre 12 e 18 °C (FRITZSON; WREGE; MANTOVANI, 2018; QUINTEIRO; ALEXANDRE; MAGALHÃES, 2019). Segundo Wrege et al. (2009), um aumento de temperatura de 3 °C pode causar uma redução significativa da área adequada para a espécie. Dados da Administração Nacional de Aeronáutica e Espaço (NASA) preveem que a temperatura do planeta possa exceder 45°C em 2100 (NASA, 2014), e espera-se que a regeneração e distribuição natural de espécies, como a araucária, sejam drasticamente afetadas (FRITZSON; WREGE; MANTOVANI, 2018).

Estratégias adaptativas das plantas a temperaturas elevadas são determinadas pela termo tolerância basal, sem condicionamento prévio e, adquirida, com condicionamento prévio a temperaturas subletais (AHUJA et al., 2010). Essas estratégias compreendem uma gama de respostas moleculares, celulares e da planta como um todo (KOYRO; AHMAD; GEISSLER, 2012). Sabe-se que altas temperaturas representam uma condição de estresse para a maioria

das plantas, sendo o processo relacionado ao desenvolvimento reprodutivo (micro e macrosporogênese, fertilização e desenvolvimento embrionário), o estágio mais sensível ao calor durante seu ciclo de vida (LOHANI; SINGH; BHALLA, 2019). De acordo com Suzuki e Katano (2018), os processos que regulam o desenvolvimento reprodutivo compartilham características comuns, com estratégias adaptativas a estresses ambientais, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a ativação de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para sua eliminação.

As respostas das plantas ao estresse térmico estão relacionadas a níveis elevados de ERO, incluindo o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e oxigênio singlete (1O_2) (CZARNOCKA; KARPIŃSKI, 2018; MITTLER, 2017; VALENTE et al., 2012; ZANDALINAS et al., 2018). As ERO causam danos oxidativos em biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA, promovendo a morte celular (GILL; TUTEJA, 2010).

As mitocôndrias são uma fonte importante de ERO em células vegetais e animais (MITTLER, 2017; WANG et al., 2019). No entanto, diferente dos animais, as mitocôndrias vegetais possuem proteínas únicas na cadeia respiratória, como as NAD(P)H desidrogenases (NDs) alternativas externas e internas, a oxidase alternativa (AOX) e a proteína mitocondrial desacopladora de plantas (UCP), que contribuem para a manutenção do equilíbrio redox nas células vegetais (MØLLER, 2001).

Como mencionado, para manter um nível basal de ERO, as plantas usam mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPX), dehidroascorbato redutase (DHAR) e monodehidroascorbato redutase (MDHAR) (DEL RÍO et al., 2018; FOYER, 2018; NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018) estão relacionadas às vias enzimáticas, enquanto que a glutathione (GSH), ácido ascórbico (ASA), tocoferóis (TOC) e compostos fenólicos são os principais compostos antioxidantes não enzimáticos (FOYER, 2018; JALEEL et al., 2009; NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018).

A embriogênese somática (ES) associada à criopreservação pode ser usada como técnica biotecnológica para propagação clonal em massa e conservação *ex situ* para araucária e outras espécies criticamente ameaçadas (DOS SANTOS, JO, SANTA-CATARINA, GUERRA, & FLOH, 2012; DUTRA et al., 2013; GUERRA et al., 2000; SANTA-CATARINA et al., 2006). Além disso, a ES tem sido amplamente utilizada como um sistema modelo para entender os eventos fisiológicos e moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento do embrião e sua resposta a diferentes estresses abióticos (CASTANDER-OLARIETA et al., 2019; ELBL et al., 2015; ELIÁŠOVÁ et al., 2017, 2018; FURLANETTO et al., [s.d.]; JIN et al., 2014). Neste contexto, sabe-se que o gene homólogo *AaSERK1*, identificado em *Araucaria angustifolia*, está associado com a competência para formação de embriões somáticos, o que torna importante a determinação de sua expressão em estudos que avaliam os efeitos da variação de temperatura no desenvolvimento desta planta (BEN MAHMOUD et al., 2017; CUEVA; CONCIA; CELLA, 2012).

Jo et al. (2014), estabeleceram e caracterizaram duas linhagens celulares embriogênicas de *A. angustifolia* com base em seu potencial embriogênico: SE1, uma linhagem celular responsiva e, SE6 uma linha celular bloqueada a formação de embriões somáticos. Análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares foram realizadas em ambas as linhagens e evidenciaram diferenças relevantes relacionadas à produção e a eliminação de ERO (DOS SANTOS et al., 2016; ELBL et al., 2015; JO et al., 2014). FURLANETTO et al. (2020) também demonstraram diferenças significativas entre as linhagens, quanto às funções mitocondriais e a atividade de enzimas antioxidantes.

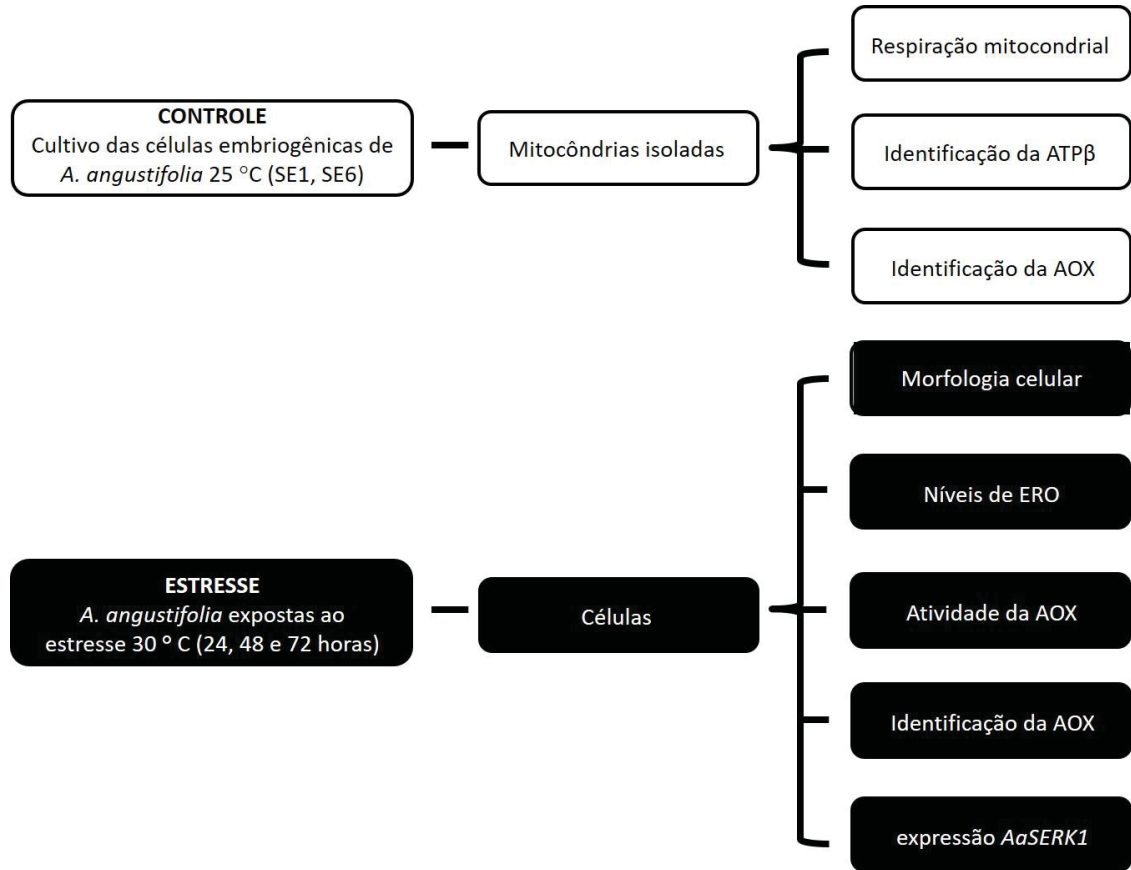
No presente estudo foram avaliadas as respostas ao estresse térmico (30 °C) de células de *A. angustifolia* das linhagens SE1 e SE6, com foco particular em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo. Para tanto, foram analisadas a morfologia celular, os níveis de expressão das proteínas mitocondriais ATP sintase (subunidade β) e AOX, a respiração mitocondrial e a expressão do gene *AaSERK1*.

1.2 Justificativa e objetivo

As culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* constituem um bom modelo experimental para avaliar parâmetros fisiológicos e bioquímicos dessa planta frente a mudanças ambientais, como o aquecimento global. Neste contexto, sabe-se que o desenvolvimento de embriões somáticos (ES) sofre a influência de diferentes fatores, como os níveis de ERO e a expressão do gene *SERK*, que podem atuar como sinalizadores no desenvolvimento da araucária. Por sua vez, a expressão do gene *SERK* está relacionada aos níveis de ERO, que podem ser originadas durante a respiração mitocondrial. Apesar deste conhecimento, são escassos na literatura trabalhos que demonstrem os efeitos do aumento da temperatura nestes fatores, principalmente durante o desenvolvimento de embriões somáticos. Dessa forma, estudos que avaliem esses efeitos são essenciais, uma vez que podem auxiliar na seleção de linhagens para programas de melhoramento genético, reflorestamento artificial ou até de produção de sementes sintéticas. Assim, o objetivo geral deste estudo foi investigar o efeito do estresse pelo aumento de temperatura (30 °C) sobre fatores que possam interferir no desenvolvimento de embriões somáticos de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, com diferentes potenciais de maturação. Para tanto, foram objetivos específicos desse estudo, em células embriogênicas de *A. angustifolia* (SE1 e SE6) expostas ou não ao estresse pelo aumento de temperatura (30 °C por 24, 48 e 72 horas):

- a) Analisar a morfologia celular;
- b) Avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO);
- c) Identificar a ATP sintase mitocondrial (subunidade β);
- d) Identificar a enzima AOX mitocondrial e verificar sua atividade;
- e) Avaliar diferentes estados da respiração em mitocôndrias isoladas;
- f) Analisar a expressão do gene *AaSERK1*.

1.3 Estratégia experimental



Com a finalidade de contribuir para a caracterização das linhagens SE1 e SE6, as células foram mantidas em condições ideais de cultivo (25 ± 1 °C) por 15 dias e foram realizadas as análises de respiração mitocondrial em oxígrafo de alta resolução, incluindo a atividade da AOX e de identificação das proteínas mitocondriais ATP sintase (subunidade β) e AOX, ambas por Western blot em células.

Para avaliar os efeitos do estresse pelo aumento de temperatura, as células SE1 e SE6 foram mantidas em incubadora a 25°C por 15 dias e submetidas ou não (Controle) a temperatura de 30 ± 1 °C por um período de 24, 48 e 72 h. Nas duas linhagens (SE1 e SE6), tanto do grupo controle (25 ± 1 °C), quanto do estressado por temperatura (30 ± 1 °C, por de 24, 48 e 72 h), foram

realizados os seguintes ensaios: 1) análise da morfologia por microscopia eletrônica de transmissão, com a finalidade de observar possíveis alterações celulares e/ou em organelas; 2) determinação dos níveis de ERO, utilizando a sonda acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), para avaliar se o estresse por temperatura é capaz de modificar estes níveis nas linhagens e correlacionar estes resultados com possíveis alterações na morfologia e demais efeitos nas células estressadas; 3) ensaios de atividade da enzima mitocondrial Oxidase Alternativa através de ensaios de respiração em oxígrafo de alta resolução e sua expressão, por Western Blot. Estes ensaios se justificam pelo envolvimento da AOX no controle dos níveis de ERO e, conseqüentemente, no estresse oxidativo e, 4) avaliação da expressão do gene *AaSERK1* por PCR em tempo real (qRT-PCR), que fornecerá importantes informações relacionadas ao potencial embriogênico destas células, bem como para o esclarecimento dos efeitos associados ao estresse pelo aumento de temperatura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* ou araucária é uma espécie conífera da família Araucariaceae (REITZ; KLEIN, 1966), naturalmente encontrada na floresta ombrófila mista no bioma Mata Atlântica do Brasil (MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2004). Sua distribuição original se estendia pelos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, ocupando uma área de mais de 185.000 km² (CARVALHO, 1994). O formato de candelabro é característico desta árvore (OLIVEIRA-FILHO et al., 2014), que no ecossistema floresta ombrófila mista se destaca graças ao seu grande porte e sua sobreposição as demais árvores. Essas peculiaridades fazem com que esse ecossistema seja conhecido também como floresta de araucária (CARVALHO, 2006).

As sementes da araucária conhecidas como pinhão, são envoltas em uma pinha, em árvores com no mínimo 12 anos de idade (THOMAS, 2013). A partir do momento em que a planta começa a produzir as sementes, pode gerar até 200 pinhas por ano (CARVALHO, 1994). O pinhão é uma semente comestível rica em carboidratos e serve de alimento para vários animais, inclusive para o homem (MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2004).

Esta espécie tem grande importância na região sul do Brasil. Isto se reflete, por exemplo, na bandeira do estado do Paraná que possui um ramo de araucária, bem como nas festas típicas tradicionais no estado de Santa Catarina, que comemoram a colheita do pinhão (ADAN et al., 2016; ZECHINI et al., 2018). Em 2020, no Brasil, foram colhidas 10605 toneladas de pinhão, com valor comercial de mais de US \$ 7,4 milhões (IBGE, 2020).

Quanto ao desenvolvimento, a araucária exige um ambiente específico, com altitudes entre 600 a 800 metros (SCHEEREN et al., 2000) e clima temperado úmido, com variações de temperatura entre 12 e 18°C (FRITZSON; WREGE; MANTOVANI, 2018; QUINTEIRO; ALEXANDRE; MAGALHÃES, 2019; SCHEEREN et al., 2000). Além disso, essa espécie requer para seu

desenvolvimento uma vasta quantidade de nutrientes à base de fósforo, cálcio, potássio, magnésio, boro e nitrogênio (CASSOL, 1982; SCHEEREN et al., 2000).

Mesmo a araucária sendo uma espécie símbolo da região sul do Brasil, de grande importância cultural e valor econômico, seu intenso desmatamento, principalmente no século XX, fez com que se tornasse criticamente ameaçada de extinção (THOMAS, 2013). O crescimento da economia no Brasil e o grande fluxo de imigrantes da Europa, durante os anos de 1910 a 1970, foram acompanhados de uma grande demanda de madeira, que em apenas 50 anos foi capaz de reduzir em 97% o habitat da araucária (NODARI, 2016; THOMAS, 2013). A alta qualidade de sua madeira, principal causa do desmatamento, foi responsável por esta espécie ser considerada a única conífera nativa de importância econômica do Brasil (REITZ; KLEIN, 1966; SILVEIRA et al., 2002).

Montagna et al., (2012) avaliaram a diferença entre araucárias presentes em áreas de conservação e araucárias em áreas privadas no estado de Santa Catarina. Os autores demonstraram que as áreas de conservação retêm uma porção significativa de diversidade genética do estado, quando comparadas a áreas externas. Além disso, os autores ainda mostraram que as áreas conservadas possuem um número total de alelos maior, o que contribui para variabilidade genética. Trabalhos como esse comprovam que áreas não protegidas se tornam fragmentadas, diminuindo significativamente a variabilidade genética nas futuras gerações. Sabe-se que plantas com maior diversidade genética estão mais aptas para resistir às mudanças ambientais, reforçando a importância das áreas de conservação como fontes de informações genéticas e locais de pesquisa para o aprimoramento de estratégias de preservação desta espécie (MONTAGNA et al., 2012).

Além do desmatamento, a araucária enfrenta outro problema que pode comprometer ainda mais sua preservação e regeneração. De acordo com a Administração Nacional Aeronáutica e Espacial (NASA), estão previstos significativos aumentos na temperatura global nos próximos anos. Os dados indicam que a temperatura pode ultrapassar 45 °C até 2100 (NASA, 2014), alteração que será acompanhada por diminuições no volume das chuvas, principalmente no verão (CHOU et al., 2014). Como a araucária necessita de um clima específico para seu desenvolvimento (FRITZSON; WREGE;

MANTOVANI, 2018; QUINTEIRO; ALEXANDRE; MAGALHÃES, 2019; SCHEEREN et al., 2000), há uma previsão de que o crescimento e regeneração dessa espécie sejam radicalmente comprometidos (FRITZSON; WREGE; MANTOVANI, 2018). Este cenário tem mobilizado pesquisadores de todo o mundo que se dedicam ao estudo da fisiologia desta planta, bem como de estratégias que auxiliem na regeneração, desenvolvimento e preservação desta espécie (STEFENON et al., 2009). Neste contexto, um dos modelos de estudo que pode ser utilizado para investigar os efeitos do aumento de temperatura sobre essa espécie é a embriogênese somática (GUERRA, TORRES, & TEIXEIRA, 1999).

2.1 Embriogênese somática como modelo de estudo

O entendimento dos elementos que influenciam na regeneração da araucária é de primordial importância para que se obtenham métodos eficazes de restauração da espécie (FRANCO; DILLENBURG, 2007). A dificuldade nos trabalhos de campo e a vasta área de distribuição da araucária restringe a realização de certas análises moleculares e bioquímicas *in vivo*. Dessa forma, técnicas *in vitro*, como a micropropagação por embriogênese somática, são de grande utilidade para o estudo dessa espécie.

A micropropagação por embriogênese somática é uma técnica que utiliza reguladores de crescimento vegetal e, a partir de uma pequena quantidade de células somáticas, é possível obter um agregado de várias células somáticas, denominado de massa pró-embriônica (MPE), sem que ocorra fusão de gametas (GUERRA et al., 1999; PALOVAARA; HAKMAN, 2008). Essa técnica possui quatro estágios de desenvolvimento: indução, proliferação, maturação e germinação. Na fase de indução obtém-se a MPE, que pode ser proliferada e mantida por longos períodos, caracterizando a fase de proliferação. Na fase de maturação é feita a troca dos reguladores de crescimento vegetal por ácido abscísico e agentes osmóticos, sendo possível obter os embriões somáticos (ES) e, a partir destes, chegar a fase de germinação, onde há a formação de uma nova planta que pode ser reintegrada à natureza (STASOLLA; YEUNG, 2003; VON ARNOLD et al., 2002).

De forma geral, a embriogênese somática vem sendo utilizada em diversos trabalhos na literatura por ser uma estratégia experimental alternativa que fornece importantes informações para estudos de conservação de espécies ameaçadas de extinção (BRADAÏ; SÁNCHEZ-ROMERO, 2021; BRANDT; HOTHORN, 2016; GAIDAMASHVILI; BENELLI, 2021; PRIYADHARSHINI; MANOKARI; SHEKHAWAT, 2020).

Para a araucária, o processo de obtenção de uma cultura embriogênica por micropropagação começa com a remoção das células somáticas de pinhões de araucárias fêmeas (ARNOLD; ERIKSSON, 1981). Em seguida, é necessário avaliar o comportamento destas células frente a inibidores ou estimuladores da proliferação, diferentes fontes de carbono e trocas gasosas (ASTARITA & GUERRA, 2000; GUERRA, SILVEIRA, DOS SANTOS, ASTARITA, & NODARI, 2000). A composição dos meios de cultura para obtenção de células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* está bem estabelecida na literatura. O meio de cultura MSG básico (BECWAR; NOLAND; WYCKOFF, 1989) é o mais utilizado e contém em sua formulação geral sacarose, L-glutamina, mio-inositol, vitaminas e Gelrite® (Sigma Aldrich) para solidificação (ASTARITA & GUERRA, 1998; ASTARITA & GUERRA, 2000; DOS SANTOS, JO, SANTA-CATARINA, GUERRA, & FLOH, 2012; ELBL et al., 2015; JO et al., 2014; SANTA-CATARINA, C SILVEIRA et al., 2006; STEINER, VIEIRA, MALDONADO, & GUERRA, 2005; VALENTE et al., 2012).

As culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* utilizadas nesse estudo foram obtidas e caracterizadas por Jo et al. (2014). Os autores investigaram a competência das culturas em formar embriões somáticos (ES), estágio posterior a etapa proliferativa, na qual as células se encontram como massas pró-embriônicas (MPE). Para isto, utilizaram células obtidas de diferentes plantas mãe de araucária e as cultivaram em meio contendo agentes osmóticos (polietilenoglicol), de indução (maltose) e de maturação (ácido abscísico). Ao microscópio óptico, nas MPE de ambas as linhagens celulares são observadas as células embriônicas e suspensoras. As células embriônicas, relacionadas com a competência para o desenvolvimento celular, são arredondadas, isodiamétricas e possuem citoplasma denso. São coradas em vermelho pelo carmin acético. As células suspensoras, relacionadas com o

crecimento e suporte, são altamente vacuoladas, alongadas e coradas em azul pelo corante azul de Evans (ASTARITA; GUERRA, 2000; STEINER et al., 2005; VALENTE et al., 2012).

As linhagens SE1 e SE6 foram classificadas de acordo com seu potencial embriogênico, ou seja, as células que tinham a competência para formar embriões somáticos e desenvolvimento cotiledonar foram classificadas como linhagem responsiva SE1, já as células que não tiveram esta competência foram classificadas como linhagem bloqueada, SE6 (JO et al., 2014). Esta nomenclatura (células SE1 e SE6) é também utilizada no presente estudo.

Ainda, para as linhagens SE1 e SE6 foram descritas outras características distintas, possivelmente associadas a seus potenciais embriogênicos. Estudos de proteômica evidenciaram nas células SE1 a expressão da enzima S-adenosil-metionina sintase, envolvida na via de biossíntese de etileno (BARON; STASOLLA, 2008). Por este motivo, segundo os autores, os níveis de etileno são maiores nesta linhagem. Jo et al. (2014), sugeriram que a menor produção de etileno na linhagem SE6 pode estar associada ao bloqueio da formação de embriões somáticos (ES) nestas células. Ainda neste contexto, sabe-se que a S-adenosil metionina (SAM) pode servir como fonte de grupamentos metil para metiltransferases. De acordo com Stasolla e colaboradores (2004), altos níveis de metilação do DNA no decorrer da embriogênese estão relacionados a modelagem da cromatina e seletividade para o desenvolvimento de ES.

SAM também está envolvida na síntese e conversão de poliaminas, atuando como doadora de grupos aminopropil utilizados para a conversão de putrescina (Put) a espermidina (Spd), e de Spd a espermina (Spm) (BARON; STASOLLA, 2008). Isto também poderia justificar os maiores níveis da poliamina Put na linhagem SE6 (JO et al., 2014), sugerindo que nesta linhagem SAM participe preferencialmente na via de síntese de poliaminas, em detrimento da via envolvida na síntese de etileno.

A linhagem SE1 apresenta maiores níveis ERO (JO et al., 2014) e maior expressão das enzimas antioxidantes APX e DHAR (SANTOS et al., 2016). Já para a linhagem SE6 foi identificada a subunidade F da NADH desidrogenase, o

complexo I da cadeia respiratória. Segundo Jo e colaboradores (2014), a expressão desta proteína estaria relacionada aos menores níveis de ERO nessa linhagem, uma vez que a atividade aumentada da cadeia respiratória mitocondrial faz com que o vazamento de elétrons seja reduzido e, consequentemente, a produção de ERO seja menor (CARRERAS et al., 2004).

Ainda, entre as características distintas entre SE1 e SE6, destaca-se a expressão diferencial do gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*). Segundo Jo (2012), o homólogo *AaSERK1* é mais expresso na linhagem SE1 e pode ser usado como um marcador para linhagens com alto potencial embriogênico.

Análises proteômicas realizadas por dos Santos e colaboradores (2016) evidenciaram diferenças na abundância de 106 proteínas entre as linhagens. A linhagem SE1 apresentou maior abundância de proteínas relacionadas a defesa celular, a resposta ao estresse oxidativo e ao estoque de material de reserva. Já para a linhagem SE6 foram encontradas proteínas relacionadas a formação de sementes durante os estágios de proliferação, que estariam, segundo os autores, associadas com genótipos que apresentam baixa responsividade a formação de embriões (DOS SANTOS et al., 2016).

Furlanetto et al. (2021) buscaram estabelecer potenciais biomarcadores para seleção de linhagens competentes para formação de embriões somáticos na fase proliferativa. Os autores demonstraram que na linhagem SE1, responsiva, as enzimas glutathione redutase (GR), monodehidroascorbato redutase (MDHR) e peroxidase (POX) tiveram atividade significativamente maior, quando comparada a linhagem SE6. Por sua vez, na linhagem SE6, não responsiva, apenas a enzima dehidroascorbato redutase (DHR) teve sua atividade aumentada em relação as células SE1. A linhagem SE6 também apresentou maior atividade respiratória e densidade mitocondriais, para a linhagem SE1 observou-se maior atividade da enzima NAD(P)H desidrogenase interna, porém, não houve diferenças significativas nos níveis de ATP. Além disso, a linhagem SE6 teve maior atividade das enzimas AOX, UCPs e NDs. Os autores sugeriram que os resultados diferenciais entre as linhagens estão correlacionados ao seu potencial embriogênico e capacidade proliferativa (FURLANETTO et al., 2021).

2.2 Variações de temperatura e desenvolvimento de plantas

Além do desmatamento excessivo, fatores abióticos, como a elevação da temperatura global prevista para os próximos anos, podem afetar o desenvolvimento da araucária (CHOU et al., 2014; FONTOURA; GANADE; LAROCCA, 2006; NASA, 2014).

Do Amarante et al. (2007) demonstraram que em pinhões armazenados a temperaturas mais elevadas, de 37 a 50 °C por 26 dias, com auxílio de um cromatógrafo gasoso os autores verificaram que há uma diminuição significativa nas taxas respiratórias. A taxa de germinação também foi reduzida em cerca de 9% e a menos de 1% nos tratamentos a 30 e 50 °C, respectivamente, após 26 dias. De acordo com os autores, temperaturas mais baixas ajudam as sementes a ter uma melhor germinação e menor perda de massa fresca já que a desidratação é menor.

Na literatura, inúmeros trabalhos demonstram os efeitos do estresse térmico no desenvolvimento de embriões de diversas espécies. Ajijah e colaboradores (2020) demonstraram que o estresse térmico por temperaturas de 40, 35 a 45 e 45 °C, por períodos de 16, 5 e 3 dias, respectivamente, foi capaz de causar a morte de embriões de cacau (*Theobroma cacao* L.). Em células embriogênicas de pinus (*Pinus radiata* D. Don) foram observadas diferenças morfológicas, morte celular programada (MCP) e perda do potencial embriogênico após tratamento por choque térmico de 40, 50 e 60 °C, por tempos de 4h, 30 min e 5 min, respectivamente (CASTANDER-OLARIETA et al., 2019). Ainda, alguns trabalhos sugerem que o estresse pelo aumento de temperatura pode ser responsável pela indução da MCP em plantas (DAMATTA; COCHICHO RAMALHO, 2006; NGCALA et al., 2020; POUDEL; POUDEL, 2017).

Venios et al., (2020) relataram que mesmo a videira, que possui mecanismos de proteção contra o estresse térmico, será afetada pelo aumento de temperatura nos próximos anos, o que poderá implicar uma grande ameaça para a viticultura. Da mesma forma, plantas com mecanismos similares de defesa contra o estresse térmico, também serão afetadas. Os autores apontam

para a necessidade de intensificar os estudos de melhoramento e desenvolvimento de genótipos tolerantes ao estresse térmico.

Efeitos do estresse pelo aumento de temperatura em células embriogênicas de *A. angustifolia* também foram descritos (KAZIUK, 2017). O estudo investigou a resposta de células embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, SE1 e SE6, submetidas ao estresse a 30 °C por 24, 48 e 72 h. De acordo com o autor, esta condição nos tempos avaliados (24, 48 e 72h), aparentemente, não alterou a morfologia das linhagens SE1 e SE6. Porém, houve redução na viabilidade celular, em todos os tempos de estresse para linhagem SE1 e, para SE6 a partir de 48h. Também foram encontrados altos níveis de H₂O₂ no tempo de 24h para as linhagens SE1 e SE6, sendo maior para a linhagem SE6. No entanto, nos tempos de 48 e 72h houve diminuição nos níveis de H₂O₂ na linhagem SE1, enquanto que nas células SE6 os níveis retornaram aos do controle (25 ± 1°C). De acordo com Kaziuk (2017), a diminuição dos níveis de peróxido na linhagem SE1 possivelmente está associada ao aumento da respiração no estado basal em 24h e a elevada atividade das enzimas antioxidantes (Prxs, SOD, APX, GR, DHAR e MDHAR). Já para linhagem SE6, houve uma inibição da respiração celular, compatível com os maiores níveis de H₂O₂ e de lipoperoxidação em 72h de exposição a temperatura de 30 °C, embora as enzimas antioxidantes Prxs, SOD, CAT, APX, GR, DHAR e MDHAR tenham sido ativadas também nestas células. Uma diferença interessante entre as linhagens, em relação ao sistema de defesa enzimático, foi a maior ativação das enzimas do ciclo glutatona/ascorbato na linhagem SE1, enquanto que na linhagem SE6 as enzimas CAT e SOD foram as mais ativas. Considerando estes resultados, o autor sugere que o estresse por alta temperatura foi capaz de promover o estresse oxidativo nas linhagens SE1 e SE6 de *Araucaria angustifolia*, que responderam de forma diferenciada a esta condição, particularmente em relação ao sistema enzimático antioxidante (KAZIUK, 2017).

Furlanetto et al. (2019b), investigaram os efeitos do tratamento de choque térmico em células embriogênicas de *Araucaria angustifolia*, não diferenciadas quanto ao potencial embriogênico. Os autores submeteram as células por períodos de 24 e 48h a 30 °C, 6h a 37 °C, 2h a 40 ou 42 °C e evidenciaram uma redução de cerca de 40% na viabilidade das culturas, após

os tratamentos de 30 e 37°C e, de aproximadamente 95%, nas temperaturas mais elevadas de 40 e 42 °C. Além disso, foram relatadas diminuições no consumo de oxigênio nos tratamentos por 40 e 42 °C e inativação de vias de reparo por excisão de base (BER) no tratamento a 42 °C, sugerindo que temperaturas mais elevadas podem prejudicar o desenvolvimento dos embriões dessa espécie, tornando-a vulnerável a elevações de temperatura previstas em curto prazo.

Wilson e colaboradores (2019) conduziram um trabalho de modelagem de conjunto para prever a resposta da araucária perante as mudanças climáticas que estão por vir. Para isto, utilizaram mapas de vegetação de pequena escala, dados climáticos e topografia de alta resolução. Os resultados sugeriram que as mudanças climáticas poderão causar perdas significativas na espécie por mais de um século subsequente. Neste contexto, Castro et al., (2020) realizaram projeções para araucária presente na mata atlântica, utilizando modelagem de ambiente adequado para sua sobrevivência (COSTION et al., 2015). As projeções indicaram que as mudanças climáticas podem causar uma redução de 60% dos nichos climáticos adequados para o desenvolvimento da espécie até o ano de 2070 e que apenas áreas de montanha permanecerão favoráveis para seu crescimento (CASTRO et al., 2020). O cenário também não é diferente em outro estudo que utilizou projeções por software para entender como as mudanças climáticas e o uso da terra podem afetar a distribuição da araucária. Os autores projetam que nas próximas décadas pode ocorrer uma redução de até 77% nas áreas adequadas para o crescimento da araucária, o que reforça que o desenvolvimento de estratégias para a conservação da espécie são de extrema urgência e importância (MARCHIORO; SANTOS; SIMINSKI, 2021).

Desta forma, considerando os relatos da literatura, é evidente a necessidade de compreender os eventos decorrentes da variação de temperatura no desenvolvimento da araucária, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento desta espécie.

2.3 Marcadores bioquímicos em embriões somáticos

2.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN)

O termo ERO inclui espécies derivadas do O_2 que sejam mais reativas que o mesmo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). De importância nos sistemas biológicos, destacam-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) e o oxigênio singlete (1O_2) (NAVROT et al., 2007).

As ERO são geradas especialmente nos peroxissomos, cloroplastos e mitocôndrias (MITTLER, 2017), sendo um subproduto associado ao metabolismo aeróbico (FOYER; NOCTOR, 2013). Em alguns casos de estresse, as elevações nos níveis de ERO podem ser tóxicas, levando a oxidação de proteínas, lipídeos, DNA e RNA (FOYER; NOCTOR, 2013; KÖNIG; MUTHURAMALINGAM; DIETZ, 2012). Por outro lado, o aumento nos níveis de ERO pode ser combatido pela ativação de diversas enzimas antioxidantes (MITTLER et al., 2004).

O sistema enzimático para eliminação de ERO inclui a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e as enzimas do ciclo da glutathiona/ascorbato: a ascorbato peroxidase (APX), glutathiona redutase (GR), Glutathiona peroxidase (GPX), Glutathiona S-transferase (GST), peroxidases (Prxs), dehidroascorbato redutase (DHAR) e monodehidroascorbato reductase (MDHAR) (FOYER; NOCTOR, 2011; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Além disso, também importante é o sistema não enzimático constituído pela glutathiona (GSH), ácido ascórbico (ASA), tocoferóis (TOC) e os compostos fenólicos (AHMAD; SARWAT; SHARMA, 2008; JALEEL et al., 2009).

Diferentemente das mitocôndrias de animais, as mitocôndrias de vegetais apresentam enzimas adicionais na cadeia transportadora de elétrons, nomeadamente: as NADP(H) desidrogenases alternativas (NADin e NADex), a proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (UCP) e a oxidase Alternativa (AOX), que auxiliam na modulação dos níveis de ERO (MØLLER, 2001; VALENTE et al., 2012; VERCESI et al., 1995; VERCESI et al., 2006).

Particularmente para mitocôndrias isoladas de células embriogênicas de *A. angustifolia*, Valente e colaboradores (2012) caracterizaram a presença de AOX e UCP. Neste trabalho, os autores estressaram as células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* por baixas temperaturas (4°C por 24 ou 48h) e, após o isolamento de mitocôndria dessas culturas, avaliaram a atividade da UCP e da AOX, demonstrando um aumento de 45% na atividade da UCP e uma pequena elevação na atividade da AOX. Ensaio de *western blot* ainda evidenciaram um aumento da UCP de 40 e 150%, nos tempos de 24 e 48h. A viabilidade das células não foi alterada nas condições de estresse. Os autores sugeriram que a presença da AOX e UCP em gimnospermas pode estar associada com o controle de ERO e a resistência ao estresse abiótico.

De acordo com Mittler et al. (2004) existe um balanço entre a geração de ERO e a atividade das defesas antioxidantes a fim de manter um nível não tóxico destas espécies. Ainda neste contexto, alterações dos níveis basais de ERO estão envolvidas na sinalização de processos celulares. O papel de sinalização por ERO é amplo, podendo atuar na expressão de genes em resposta a estímulos bióticos e abióticos, no crescimento e desenvolvimento de plantas e na ativação de morte celular programada, entre outros (MITTLER, 2017; MITTLER et al., 2004; NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018; PARENT; CAPELLI; DAT, 2008).

No presente estudo, buscou-se relacionar o papel das ERO no desenvolvimento de embriões somáticos de *A. angustifolia*, considerando que estas espécies podem resultar na ativação da MCP, que em coníferas pode sinalizar para a diferenciação de massas pró-embriônicas em embriões somáticos (BOZHKOV; FILONOVA; SUAREZ, 2005; FILONOVA; BOZHKOV; VON ARNOLD, 2000; JO et al., 2014).

O óxido nítrico é uma molécula pequena, de meia-vida curta no ambiente celular, por se apolar é altamente lipofílico, tendo a capacidade de transpor membranas lipídicas e de interagir com diferentes moléculas (BEGARA-MORALES et al., 2018). Em plantas, pode estar envolvido na transmissão de sinais para diversas funções, como a germinação de sementes (WANG; ZHU; LANG, 2015), resposta a patógenos (CHANDOK et al., 2003), indução a MCP

(PEDROSO; MAGALHAES; DURZAN, 2000) e resposta ao estresse abiótico (FANCY; BAHLMANN; LOAKE, 2017).

Em condições de estresse podem ocorrer interações entre $\text{NO}^\bullet$ e ERO resultando em compostos intermediários, denominados espécies reativas de nitrogênio (ERN), que podem provocar diversas reações fisiológicas, dependendo do ambiente celular e de sua concentração (GROSS; DURNER; GAUPELS, 2013). Um exemplo é a reação do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) com $\text{NO}^\bullet$, resultando na formação do ânion peroxinitrito (ONOO^-). O ONOO^- é instável e pode interagir com algumas proteínas, causando a nitração da tirosina e, com isso, modificações pós-transcricionais (SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007). Sabe-se também que o $\text{NO}^\bullet$ pode interagir com grupos tiol da cisteína da NADPH oxidase, causando sua nitração, o que pode controlar os níveis de ERO pela modulação negativa desta enzima. A enzima NADPH oxidase catalisa uma das principais reações geradoras de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em situações de estresse (YUN et al., 2011).

O $\text{NO}^\bullet$ é responsável por regular um conjunto de processos fisiológicos em plantas (MUR et al., 2013). No entanto, muitos estudos ainda são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos. Em *Araucaria angustifolia*, Vieira e colaboradores (2012), demonstraram que o incremento nos níveis de $\text{NO}^\bullet$ está associado com o aumento da divisão e diferenciação de células embriogênicas. Silveira et al. (2006) observaram uma maior concentração de $\text{NO}^\bullet$ em células embrionárias de *Araucaria angustifolia* em relação as células suspensoras, sugerindo a importância dessa molécula no desenvolvimento dessa espécie, considerando o papel das células embrionárias no desenvolvimento destas culturas.

2.3.2 Poliaminas

As poliaminas são um grupo de moléculas de estrutura básica e massa molecular baixa (88 – 202 g/mol), encontradas, na forma livre ou conjugada, em todas as células vegetais (SANTA-CATARINA et al., 2006; TSANIKLIDIS et al., 2020). As formas comumente encontradas são a putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) (MATTOO et al., 2010; TSANIKLIDIS et al., 2020). A

síntese dessas moléculas ocorre pela descarboxilação dos aminoácidos metionina, arginina ou ornitina (PAL BAIS; RAVISHANKAR, 2002).

A putrescina é sintetizada a partir da descarboxilação da ornitina e arginina em reações catalisadas pelas enzimas ornitina descarboxilase (ODC) e arginina descarboxilase (ADC), respectivamente. A formação da espermidina ocorre pela ação da enzima espermidina sintase (SPDS) que catalisa a reação de incorporação de um grupo aminopropil na molécula de putrescina e, em seguida, a enzima espermina sintase (SPMS) adiciona um grupo aminopropil na espermidina dando origem a espermina, ambas as enzimas SPMS e SPDS utilizam S-adenosilmetionina descarboxilada originada a partir da metionina (BARON; STASOLLA, 2008).

Nas plantas, as poliaminas podem regular diferentes vias relacionadas a resposta ao estresse abiótico (BITRIÁN et al., 2012), como a defesa contra patógenos (MOUNCE et al., 2017), e ativação da MCP (MOSCHOU; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 2014). São também biomarcadores da proliferação e diferenciação das células vegetais (PAL BAIS; RAVISHANKAR, 2002) e estão diretamente relacionadas com a embriogênese somática (BARON; STASOLLA, 2008). Santa-Catarina et al. (2006), sugeriram que a poliamina putrescina está envolvida nas fases iniciais da embriogênese de *Ocotea catharinensis*, já a espermina é essencial nas fases finais do desenvolvimento embrionário. Em coníferas, as poliaminas são biomarcadores dos estágios de desenvolvimento de embriões somáticos (MINOCHA et al., 1999; SILVEIRA et al., 2004).

Em sementes de araucária as poliaminas parecem ser sinalizadoras do término da germinação (PIERUZZI et al., 2011). Já nas células de araucária, estão envolvidas na diferenciação das culturas embriogênicas (SILVEIRA et al., 2006) e relacionadas com o desenvolvimento de embriões somáticos (ASTARITA; FLOH; HANDRO, 2003). Jo e colaboradores (2014) relataram maiores níveis da poliamina Put em culturas embriogênicas de células SE6 (bloqueadas para desenvolvimento do embrião somático). Os maiores níveis de putrescina podem justificar os baixos níveis de etileno encontrados nesta linhagem, já que a via biossintética de poliaminas e etileno compartilham um precursor comum, a SAM (VALERO; MARTÍNEZ-ROMERO; SERRANO, 2002).

2.3.3 Etileno

Entre os hormônios vegetais, o etileno é um dos mais simples estruturalmente, possui apenas dois átomos de carbono e quatro átomos de hidrogênio, por ser gasoso pode atravessar membranas com facilidade (LIGHT et al., 2016). Sua biossíntese ocorre a partir da metionina que é convertida S-adenosil-metionina (SAM) em reação catalisada pela S-adenosilmetionina sintase. Na reação subsequente, SAM é convertida pela ação da enzima ACC sintase a ácido aminociclopropano carboxílico, que por sua vez é oxidado a etileno pela ação da enzima ACC oxidase (WANG, LI, & ECKER, 2002).

A função mais atribuída ao etileno é a do amadurecimento de frutas (BARRY; GIOVANNONI, 2007; PECH et al., 2012), porém, este fito-hormônio tem funções mais abrangentes. De acordo com Chang et al. (2013), o etileno pode modular cerca de 1000 genes, atuando em todas as fases do desenvolvimento de plantas, desde a germinação, crescimento, amadurecimento e também em resposta ao estresse (LIGHT et al., 2016; PEI et al., 2017).

Em relação a embriogênese somática, o etileno tem efeitos variados em algumas espécies. Em *Daucus carota* (ROUSTAN; LATCHE; FALLOT, 1989), *Picea abies* (WANN et al., 1987), *Hevea brasiliensis* (AUBOIRON; CARRON; MICHAUX-FERRIÈRE, 1990) e *Brassica napus* (LEROUX et al., 2009), o aumento de seus níveis está associado a não formação de embriões somáticos. Por outro lado, em linhagens de *Medicago sativa* (KĘPCZYŃSKA; ZIELIŃSKA, 2011), *Quercus ilex* (MAURI; MANZANERA, 2011), *Pinus sylvestris* (LU; VAHALA; PAPPINEN, 2011) e em linhagens SE1 de *Araucaria angustifolia*, níveis mais elevados de etileno foram associados ao desenvolvimento de embriões somáticos (JO et al., 2014).

2.3.4 Gene *SERK*

Ainda em relação aos fatores que podem interferir na embriogênese somática, destaca-se o gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*).

Segundo Becraft (1998), essa família de genes codifica uma proteína quinase receptora transmembrana rica em sequências de leucina (*LRR-RLKs*), que atua como transdutora de sinais, resultando em respostas específicas no início e ao longo do desenvolvimento da embriogênese somática (SASAKI et al., 2007; YANG; ZHANG, 2010). Diferentes ligantes podem interagir com *LRR-RLKs* resultando na transmissão de uma variedade de sinais para o citosol (KUMAR; VAN STADEN, 2019), que podem desencadear a morte da planta (HE et al., 2007), a diferenciação de tecidos (FISHER; TURNER, 2007) ou a formação de embriões (JO, 2012; NODINE; YADEGARI; TAX, 2007; STEINER et al., 2012).

Sabe-se também que em algumas plantas o gene *SERK* está diretamente associado com o estresse abiótico. O silenciamento desse gene na alface a torna mais suscetível ao ataque de fungos (SANTOS, ROMANO, VIEIRA, BALDONI, & ARAGÃO, 2009). Por outro lado, a super expressão desse gene está associada a resistência pelo ataque de fungos, como demonstrado para o arroz no trabalho de Hu e colaboradores (2005).

De acordo com Steiner et al. (2012), o gene homólogo *AaSERK1*, encontrado em *Araucaria angustifolia*, codifica uma proteína de 630 aminoácidos muito similar a sequência encontrada em membros da família *SERK* de angiospermas. Estes autores sugeriram que a expressão desse gene está associada à competência para formação de embriões somáticos em gimnospermas, como observado em angiospermas (BEN MAHMOUD et al., 2017; CUEVA; CONCIA; CELLA, 2012). Assim, é possível que homólogos do gene *SERK* tenham sido mantidos ao longo da diversificação dessas plantas. Ainda, de acordo com Jo (2012), o homólogo *AaSERK1* pode ser usado como um marcador para culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* com alto potencial embriogênico. Portanto, considerando a importância do gene *AaSERK1* no desenvolvimento de embriões de araucária, é importante compreender se elevações na temperatura podem modular sua expressão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Sacarose, L-glutamina, mio-inositol, tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, glicina, paraformaldeído, glutaraldeído, cacodilato, tetróxido de ósmio, acetato de uranil, etanol, acetona, Epon-812, nitrato de chumbo, citrato de sódio acetato de diclorofluoresceína, Tris-HCl, sacarose, HEPES, EGTA, cisteína, BSA, Percoll®, KCl, MgCl₂, Glutamato, Malato de sódio, succinato, ascorbato, TMPD, FCCP, SHAM, rotenona, cianeto, antimicina A, poliacrilamida, acetonitrila, poliaminas (Put, Spd, Spm) foram adquiridos da Sigma Aldrich® (EUA).

Anticorpo primário para ATPβ, kit Super Signal West Pico (Thermo Scientific), membrana de nitrocelulose (Amershan Hybond PVDF - GE), anticorpo primário para AOX, kit de extração Purelink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific®), DNase I (Fermentas®), kit de reação SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen®), *primer* gene *AaSERK1*, *primer* gene *UBIQUITINA-1*, SYBR Green (QIAGEN®), ácido perclórico, HCl, cloreto de dansil, carbonato de sódio, prolina, clorofórmio, acetonitrila e outros reagentes utilizados, com alto grau de pureza, foram adquiridos da Merck® do Brasil. Todos reagentes utilizados continham alto grau de pureza. Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura obtida em purificador Millipore MilliQ®.

3.2 Cultivo das linhagens embriogênicas de *A. angustifolia*

As linhagens de *Araucaria angustifolia* com diferentes potenciais embriogênicos (SE1 e SE6), cedidas pela professora Dra. Eny lochevet Segal Floh (IBUSP), foram cultivadas em placas de Petri (150 mm x 25 mm) contendo 25 mL de meio básico de cultura MSG (BECWAR; NOLAND; WYCKOFF, 1989), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), L-glutamina (1,46 g L⁻¹), mio-inositol (0,1 g L⁻¹) e vitaminas (tiamina 0,29 µM, piridoxina 2,43 µM, ácido nicotínico 4,06 µM e glicina 26,6 µM) solidificados em Gelrite ® (Sigma Aldrich) (3 g L⁻¹). As linhagens celulares embriogênicas foram mantidas em incubadora (FANEM -

502) a 25 ± 1 ° C no escuro e subcultivadas a cada 20 dias para novas placas contendo meio. Todos os ensaios foram realizados com as células entre 13 e 15 dias de cultura, ou seja, na fase exponencial de crescimento (ASTARITA & GUERRA, 1998; SILVEIRA et al., 2002; STEINER, 2005).

3.3 Condições de estresse

As linhagens celulares (SE1 e SE6) foram expostas ao estresse pelo calor de 30 ± 1 °C em incubadora (TECNAL TE-420), por um período de 24, 48 e 72 h na ausência de luz. As linhagens do grupo controle ficaram mantidas em incubadora a temperatura de 25 ± 1 °C, também na ausência de luz.

3.4 Análise morfológica

Para os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão (MET), as células (100 mg de peso fresco) foram fixadas inicialmente em tampão Karnowski (paraformaldeído a 2%, glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 mM) (KARNOVSKY, 1965), pH 7,2, a 4 °C. Após a fixação, as células foram lavadas com tampão cacodilato 0,1 mM, pH 7,2, a 4 °C e pós-fixadas por 1 h no mesmo tampão contendo tetróxido de ósmio a 2%. Em seguida, as células foram incubadas por 2 h em acetato de uranil a 2% para coloração em bloco. Para a desidratação das células, uma série de adições de etanol foi utilizada em concentrações crescentes (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), seguida pela desidratação com acetona. A resina Epon-812 (LUFT, 1961) foi utilizada para impregnação e inclusão e seções ultrafinas foram feitas por lâminas de vidro e diamante no ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2, que foram contrastadas em solução aquosa contendo 2% de acetato de uranila (WATSON, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (nitrato de chumbo 2,7% e citrato de sódio 2,8%) (REYNOLDS, 1963). Finalmente, as imagens foram obtidas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR no microscópio eletrônico de transmissão modelo JEOL 1200EX II.

3.5 Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Para analisar os níveis de ERO, foi utilizada a sonda acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), capaz de atravessar as membranas celulares e no interior das células ser convertida em DCFH por esterases. O DCFH, por sua vez, pode ser oxidado na presença de ERO à diclorofluoresceína (DCF) (JAMBUNATHAN, 2010), que emite fluorescência proporcional à quantidade de ERO (LIU et al., 2010).

Neste ensaio, as células (400 mg de peso fresco) foram homogeneizadas em nitrogênio líquido, seguido pela adição de 1 mL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2. Esta suspensão foi centrifugada (12.000 x g) por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. Este procedimento foi realizado até que um sobrenadante límpido fosse obtido. Em seguida, para 100 µL de sobrenadante foram adicionados 900 µL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2. Na sequência, a fluorescência foi determinada após a adição de 10 µL de DCFH-DA 1 mM (concentração final 10 µM) em leitor de microplacas, usando comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 530 nm (emissão). Os resultados foram expressos em porcentagem de fluorescência em relação ao controle (100%).

3.6 Isolamento de mitocôndrias

Para obtenção das mitocôndrias, com ajuda de uma tesoura, cerca de 45 g (peso fresco) de células foram homogeneizadas em 200 mL de meio de extração (sacarose 250 mM, HEPES 10 mM (pH 7,6), EGTA 2 mM, cisteína 3 mM e BSA 0,2 g% (m/v)). Em seguida, com o auxílio de um homogeneizador van Potter–Elvehjem, as células foram fragmentadas por 10 vezes com pistilo frouxo e mais 10 vezes com pistilo mais estreito. Após essa etapa as células ainda passaram por um pulso de fragmentação no equipamento Turratrec. O homogenato obtido foi filtrado tecido gabardine para separar as partes sólidas, na fração líquida o pH foi ajustado para 7,2 (FURLANETTO, 2018; VALENTE et al., 2012).

Para a obtenção das mitocôndrias o homogenato celular passou por uma série de centrifugações como descrito por Mariano et al. (2004, 2008).

Inicialmente o homogenato foi centrifugado por 10 min a 1.000 x g e o sobrenadante separado e centrifugado a 15.000 x g por 10 min. Com a ajuda de um pincel o precipitado foi ressuspenso cuidadosamente em meio de isolamento, constituído de sacarose 250 mM, HEPES 10 mM pH 7,2, EGTA 0,25 mM, BSA 0,2 g% (m/v) e centrifugado a 1000 x g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e realizou-se outra centrifugação a 15.000 x g por 10 min. O precipitado contendo as mitocôndrias foi ressuspenso em 1 mL de meio de isolamento. Para purificação, a fração mitocondrial foi submetida a ultracentrifugação a 40.000 x g por 40 min em gradiente descontínuo de Percoll® (13,5%, 21% e 45% (v/v)) (JACKSON et al., 1979; MILLAR; LIDDELL; LEAVER, 2007). A fração presente entre as concentrações de 21% e 45%, correspondente as mitocôndrias foi coletada e diluída em meio de isolamento.

Para remoção do Percoll foi realizada uma centrifugação a 15.000 x g por 15 min. Finalmente, o precipitado contendo as mitocôndrias foi ressuspenso em meio de isolamento e as proteínas mitocondriais quantificadas pelo método de Bradford (1976).

3.7 Respiração mitocondrial

Para avaliar a respiração mitocondrial, as organelas foram isoladas das células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* como descrito no item anterior (MARIANO et al. 2004, 2008) e o consumo de oxigênio determinado em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k- Oroboros®), em câmaras de 2 mL, a 28°C, sob agitação constante. O meio de reação continha sacarose 250 mM, tampão Hepes 10 mM, pH 7,2, KCl 2 mM, BSA 0,2% (v/v) e MgCl₂ 500 mM (VALENTE et al., 2012). Foram utilizados como substratos oxidáveis: Glutamato de sódio 10 mM e Malato de sódio 10 mM (Complexo I), succinato 10 mM (Complexo II), ascorbato 2 mM e TMPD 0,5 mM (Complexo IV), na presença de 0,5 mg de proteína mitocondrial. De acordo com o desenho experimental foram adicionados: o desacoplador FCCP (0,5 µM) e os inibidores ácido salicilhidroxâmico (SHAM) 4 mM, rotenona 2 µM, cianeto 0,5 mM e a antimicina A (AA) 0,5 µM. Os resultados foram expressos como fluxo de oxigênio em pmol de O₂ consumido/seg/mg proteína mitocondrial.

3.8 Respiração celular via AOX

Para determinar o consumo de oxigênio pela via da AOX, em 1 mL de meio de reação (sacarose 250 mM, EGTA 0,25 mM, BSA a 0,2% (g/v) e HEPES 10 mM (pH 7,2)) (MARIANO *et al.*, 2008; VALENTE *et al.*, 2012) foram adicionados 150 mg de células (peso fresco), em seguida o meio contendo as células foi homogeneizado em van Potter–Elvehjem por 10 vezes com pistilo frouxo e mais 10 vezes com pistilo mais estreito. Após a obtenção do homogenato celular, a atividade da AOX foi determinada em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k- Oroboros®), em câmaras de 2 mL, temperatura de 28 °C e agitação constante. Nos ensaios foram utilizados 1 mL da suspensão celular correspondente a 150 mg (peso fresco) de células em volume final de 2 mL. Foram adicionados: o desacoplador FCCP (0,5 µM) e os inibidores ácido salicilhidroxâmico (SHAM) 4 mM e a antimicina A (AA) 0,5 µM. Os resultados foram expressos como fluxo de oxigênio em pmols de O₂ consumido min⁻¹ mg peso fresco de célula.

3.9 Western blot

Para os ensaios de Western Blot para a detecção da enzima ATP sintase (subunidade β), proteínas (100µg), obtidas a partir de mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia* (25 ± 1 °C) como descrito no item 3.6, foram utilizadas para realização de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Amersham ECL Gel, GE Healthcare). Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond PVDF - GE) e realizou-se o bloqueio de proteínas inespecíficas com solução de BSA 5%, por 1h, em temperatura ambiente. Na sequência, a membrana foi incubada por 24h a 4°C com anticorpo primário para ATPβ (diluição 1:5000), obtido a partir de um peptídeo sintético conjugado, derivado de sequências de plantas, algas (cloroplastos e mitocôndrias) e bacterianas que possuem as subunidades beta da ATPβ-sintase (AS03 030 Agrisera™). Após a ligação do anticorpo primário, a membrana foi lavada 3x por 5 min com tampão TBS-T 1x e incubada por 1h com o anticorpo secundário (Chicken, diluição 1:20000). A presença da proteína ATP

sintase (subunidade β), que possui massa molecular de 53,9 kDa (GELLÉRT et al., 2018), foi visualizada por método de quimioluminescência com o kit Super Signal West Pico (Thermo Scientific).

Para identificação da proteína AOX nas linhagens SE1 e SE6 cultivadas a 25 °C e sob estresse 30 °C, as proteínas (100 μ g), obtidas a partir de células ou mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia*, foram utilizadas para realização de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Amersham ECL Gel, GE Healthcare). Em seguida, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond PVDF - GE) e bloqueio de proteínas inespecíficas com solução de BSA 5%, por 1h, em temperatura ambiente. Na sequência, a membrana foi incubada por 24h a 4°C com anticorpo primário para AOX (diluição 1:1000), obtido a partir de um peptídeo sintético conjugado, derivado do motivo de consenso C-terminal totalmente conservado a partir de isoformas da AOX das plantas *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* e *Oryza sativa* (AS04 054 Agrisera™). Após a ligação do anticorpo primário, a membrana foi lavada 3x por 5 min com tampão TBST 1x e incubada por 1h com o anticorpo secundário para AOX (Rabbit, diluição 1:50000). A presença das proteínas foi visualizada por método de quimioluminescência com o kit Super Signal West Pico (Thermo Scientific).

3.10 Expressão do gene *AaSERK1*

A expressão do gene *AaSERK1* foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR) segundo Jo (2012), como descrito a seguir.

O RNA total foi extraído a partir de 150 mg (peso fresco) de células homogenizadas em nitrogênio líquido, utilizando o kit de extração Purelink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific®) de acordo com as orientações do fabricante. A concentração de RNA total foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Scientific®), em comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A digestão do RNA (1 μ g) foi feita com a enzima DNase I (Fermentas®) como descrito pelo fabricante. Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit de reação SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen®) seguindo-se as instruções do fabricante.

As reações de qRT-PCR foram realizadas em termociclador Rotor-Gene (QIAGEN®). O cDNA obtido foi diluído 1:15 vezes em água ultrapura e foram utilizados 3 µl para a reação, em presença de 800 nM do *primer* do gene alvo *AaSERK1* (Forward 5' - GCAGTGGTGGGGGATTTTG -3' – Reverso 5' - CAAGGTCAAATGCCCCGTTGTC -3') e do gene normalizador *UBIQUITINA-1* (*UBI1*) (Forward 5'- CCT CGT GTG CGA TTT ACG TC -3' – Reverso 5'- GGG CGG CTT CTG GAT TTG -3') e, 2x SYBR Green (QIAGEN®). Os ciclos de amplificação foram de 95 °C por 10 min e 40 ciclos de: 95 °C por 15 seg, 55 °C por 1 min e 72 °C por 30 seg (instante em que acontece a leitura do sinal emitido pelo SYBR Green) (JO, 2012). Os valores foram analisados de acordo com a fluorescência de cada amostra amplificada exponencialmente em cada ciclo “cycle threshold” (ct). Os dados foram normalizados com o gene *UBI1* e os resultados apresentados como expressão do gene *AaSERK1* em relação ao controle.

3.11 Determinação da concentração de proteínas

A concentração das proteínas obtidas nos ensaios foi determinada seguindo o método de Bradford (1976), utilizando curva padrão de albumina.

3.12 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias. Foram considerados significativos os valores que apresentarem $p \leq 0,05$.

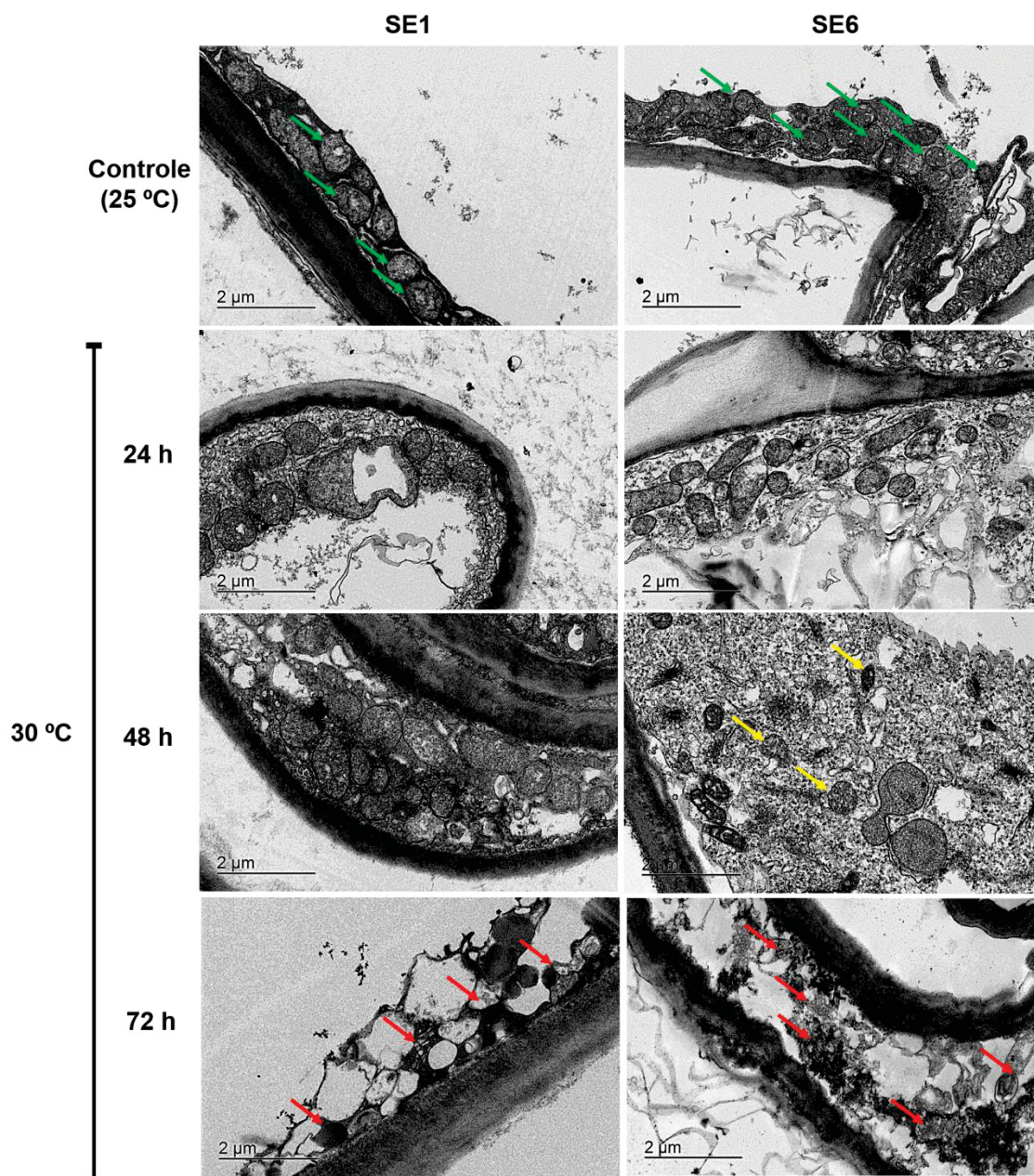
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Morfologia

Os resultados das análises dos ensaios de microscopia eletrônica de transmissão (MET) realizados neste estudo (Figura 1) não evidenciaram diferenças visuais significativas na morfologia das células dos grupos controle das linhagens SE1 e SE6, porém, análises quantitativas não foram realizadas. Entretanto, FURLANETTO et al. (2021) demonstraram, a partir de análises quantitativas de 12 imagens de MET de cada linhagem celular, diferenças em relação ao número, volume e eletrodensidade das mitocôndrias. Os autores evidenciaram que a linhagem SE6 apresentava um maior número de mitocôndrias e que estas organelas eram mais eletrondensas em comparação as presentes na linhagem SE1, o que poderia indicar uma maior quantidade de complexos da cadeia respiratória na linhagem não responsiva. Por outro lado, o volume das mitocôndrias foi menor na linhagem SE6.

Em relação às condições de estresse, para a linhagem SE1 somente após 72h de estresse foram observadas mitocôndrias com morfologia alterada, algumas aparentemente rompidas (setas vermelhas). Para a linhagem SE6, já a partir de 48h observou-se uma redução no tamanho e no número de mitocôndrias (setas amarelas). Já as células estressadas por 72h a 30°C, assim como observado para a linhagem SE1, apresentaram mitocôndrias com morfologia alterada ou rompidas (setas vermelhas), sugerindo que 72h de exposição a 30°C causa significativas alterações na morfologia e na quantidade de mitocôndrias nas duas linhagens estudadas.

Figura 1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS LINHAGENS SE1 E SE6 SUBMETIDAS AO ESTRESSE PELO CALOR



NOTA: As imagens foram obtidas utilizando Microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II com aumento de 3000X como descrito em materiais e métodos (item 3.4). A coluna da esquerda corresponde a linhagem SE1 e a da direita a linhagem SE6. Controle: células cultivadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Estresse: células cultivadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24, 48 e 72h, como especificado nas imagens. As setas verdes indicam mitocôndrias intactas e as setas amarelas e vermelhas mitocôndrias com morfologia alterada ou rompidas, respectivamente.

Estas alterações morfológicas estão de acordo com os resultados de Kaziuk (2017), que observou nas mesmas condições de estresse, (30°C , 72h)

uma redução na viabilidade das células SE1 e SE6 em 50% e 45%, respectivamente. O autor também demonstrou um aumento significativo na lipoperoxidação, de 34% para linhagem SE1 e 77% para a linhagem SE6, quando comparadas com seus respectivos controles (células cultivadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$).

Alterações morfológicas decorrentes do estresse pelo calor foram demonstradas para outras espécies. Para a colza (*Brassica napus* L.), por exemplo, Rashid et al. (2020) demonstraram que em tecidos de sementes expostos ao estresse de 30°C dia e 25°C noite, por quatro dias, houve um rompimento da membrana celular e danos mitocondriais (RASHID et al., 2020), resultados semelhantes aos observados para as culturas de araucária no presente estudo.

Os efeitos da variação de temperatura, mas especificamente de baixa temperatura (4°C), também são descritos para células embriogênicas de *A. angustifolia*, não caracterizadas quanto a responsividade à maturação (FURLANETTO et al., 2019; VALENTE et al., 2012). Não foram observadas alterações da morfologia celular em 24 e 48h de estresse a 4°C . No entanto, Valente et al. (2012) relataram a maior expressão e atividade da proteína desacopladora de plantas (UCP), sugerindo o envolvimento desta proteína em situações de estresse por temperatura e relacionando sua atividade com o controle da formação de ERO. Ainda neste contexto, Furlanetto et al. (2019), demonstraram o aumento na atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APx) e dehidroascorbato redutase (DHAR), aumento na lipoperoxidação de membranas, redução da atividade da enzima catalase (CAT) e da enzima NAD(P)H desidrogenase alternativa externa, demonstrando que o estresse pelo frio é capaz de promover o estresse oxidativo em células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* e, que o estresse é acompanhado pela maior ativação das vias antioxidantes nessa espécie. Outra informação importante dos estudos de Valente et al. 2012 e Furlanetto et al. (2019) é o fato de que a ausência de alterações morfológicas não excluiu efeitos em parâmetros bioquímicos, como a atividade das enzimas antioxidantes celulares e mitocondriais.

4.2 Níveis de ERO

De forma geral, as ERO têm sido consideradas como “vilãs” para as células de plantas, porém, atualmente sua importância fisiológica é reconhecida (MITTLER, 2017). De fato, seus efeitos benéficos ou maléficos dependerão de sua forma química (H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, HO° ou $\text{O}_2^{\bullet-}$), quantidade, ambiente celular em que se encontram e das moléculas com as quais interagem, podendo assim, desencadear reações de sinalização, crescimento, diferenciação, proteção ou morte celular (FOYER; RUBAN; NOCTOR, 2017). De acordo com Mittler (2017), deve haver um nível basal de ERO para o crescimento adequado da planta e o desequilíbrio desses níveis pode prejudicar seu desenvolvimento. Os níveis adequados, não tóxicos de ERO, são mantidos por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (FOYER; NOCTOR, 2011).

Situações de estresse, como o aumento de temperatura, são capazes de causar o aumento de ERO a níveis tóxicos nas plantas (NAVROT et al., 2007), o que, por sua vez, pode promover danos ao RNA, DNA, lipídeos de membranas e proteínas, levando a morte celular (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER et al., 2004).

Neste estudo, para analisar os níveis de ERO, foi utilizada a sonda acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), capaz de permeabilizar as membranas celulares e, após a ação de esterases, é convertida a diclorofluoresceína reduzida (DCFH). Esta, por sua vez, é oxidada na presença de ERO a diclorofluoresceína (DCF) (JAMBUNATHAN, 2010), que emite fluorescência proporcional à sua quantidade (LIU et al., 2010).

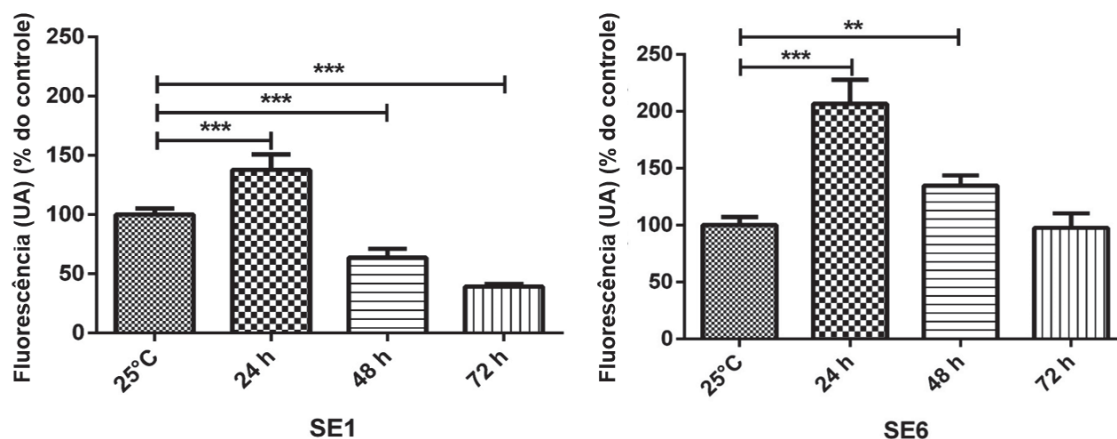
Na Figura 2 estão apresentados os resultados destes ensaios. Nota-se que houve diferença nos níveis de ERO já entre os grupos controle (25°C) das linhagens SE1 e SE6 (vide legenda da Figura 2), sendo que para a linhagem SE1 este aumento foi de 79% em relação ao controle da linhagem SE6. Este resultado está de acordo com os descritos por Jo et al. (2014). para estas culturas mantidas a 25 °C. Os autores demonstraram que os níveis de ERO, monitorados por 6 h, aumentaram significativamente na linhagem SE1, já para a

linhagem SE6 não foram observadas diferenças significativas nos níveis de ERO.

JO et al. (2014) sugeriram que os maiores níveis de ERO na linhagem SE1 podem resultar de seu elevado metabolismo energético, uma vez que foi identificada a proteína mitocondrial ATPase subunidade beta para essa linhagem. Ainda, sugerem que os maiores níveis de ERO na linhagem SE1 podem ter papel sinalizador para diferenciação dessas células, já que podem atuar como ativadores da morte celular programada que é um dos eventos responsáveis pela diferenciação de massas pró-embrionárias a embriões somáticos (BOZHKOVA; FILONOVA; SUAREZ, 2005). Quanto a linhagem SE6, segundo os autores, os menores níveis de ERO podem estar relacionados com a presença da proteína subunidade F de NADH desidrogenase, que pode atuar no controle dos níveis de ERO (JO et al., 2014).

Quando as culturas foram submetidas ao estresse a 30°C, houve uma grande elevação nos níveis de ERO (Figura 2), em 24h de ~37% para a linhagem SE1 e ~106% para linhagem SE6. No tempo de 48h, para a linhagem SE1 observou-se uma diminuição dos níveis de ERO em ~37% e, para a linhagem SE6, embora menor em relação ao tempo de 24h, ainda persistiu um aumento de ~36%. No maior tempo de estresse (72h), os níveis de ERO foram reduzidos significativamente na linhagem SE1 (~61%), enquanto que para a linhagem SE6 retornaram aos níveis do controle.

Figura 2 – NÍVEIS DE ERO DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS SE1 E SE6 ESTRESSADAS PELO AUMENTO DE TEMPERATURA



NOTA: Os níveis de ERO foram estimados a partir de medidas de fluorescência da sonda acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) como descrito em materiais e métodos (item 3.5). Controle: células cultivadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os tempos de estresse ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) estão especificados no gráfico. Os resultados, expressos como % do controle, representam a média $\pm$ SD de três experimentos independentes em duplicata. Para SE1, 100% corresponde a fluorescência de 32639 ± 1648 UA, e para SE6, 100% corresponde a fluorescência de 18209 ± 1302 UA. Valores estatisticamente diferentes do Controle *** $p < 0,0001$. ** $p < 0,004$.

Kaziuk (2017) demonstrou um aumento significativo nos níveis de H_2O_2 em 24h de estresse a 30°C para a linhagem SE1 e uma diminuição significativa nos tempos de 48 e 72h. No presente estudo, o mesmo perfil foi encontrado para os níveis de ERO total para linhagem SE1, ou seja, um aumento significativo em 24h, seguido de uma diminuição nos tempos de 48 e 72h. Para linhagem SE6, o autor evidenciou o aumento significativo nos níveis de H_2O_2 no tempo de 24h de estresse, e uma discreta tendência de aumento nos tempos de 48 e 72h, porém, não foi estatisticamente significativa. Os níveis de ERO total para a linhagem SE6, no presente estudo, foram significativamente aumentados nos tempos de 24h e 48h, sendo que em 72h, retornaram aos níveis do controle.

A redução nos níveis de ERO nos tempos de 48 e 72h pode estar relacionada com a elevada atividade das enzimas do ciclo Glutathiona/Ascorbato composto pelas enzimas: Ascorbato peroxidase (APX), glutathiona redutase (GR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e monodehidroascorbato reductase (MDHAR) (FOYER; NOCTOR, 2011; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Kaziuk (2017), demonstrou que nas linhagens SE1 e SE6, quando estressadas (30°C),

houve um aumento significativo da atividade das enzimas do ciclo glutatona/ascorbato no tempo de 24h, porém, após 48h e 72h de estresse, observou-se maior aumento na atividade das enzimas GR, DHAR e MDHAR. Estas três enzimas trabalham de forma ordenada para o fornecimento de ascorbato (AsA), que atua como doador de elétrons para a enzima APX, responsável pela redução do H_2O_2 . Esses resultados sugerem que a alta atividade dessas enzimas pode estar relacionada com a diminuição dos níveis de ERO nos tempos de 48 e 72h, uma vez que a metodologia para análise de ERO é inespecífica e pode detectar também o H_2O_2 . É importante ressaltar que o perfil dos resultados dos níveis de ERO e H_2O_2 é semelhante na linhagem SE1 e na linhagem SE6 apenas nos tempos de 24 e 72h. Dessa forma, os resultados obtidos para os níveis de ERO sugerem que o estresse por temperatura (30°C) foi capaz de promover o estresse oxidativo nas linhagens SE1 e SE6 no tempo de 24h e em 48h apenas para linhagem SE6.

Efeitos deletérios do estresse pelo aumento de temperatura e sua relação com o aumento de ERO também foram observados em outras espécies. Vacca et al. (2004) investigaram os efeitos do estresse térmico em alguns parâmetros do metabolismo de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Para isto as células foram expostas a altas temperaturas (37, 45, 55, 60 e 65 °C) por 5 ou 10 min. Os autores observaram que a partir de 55 °C, ocorreu o processo de morte celular programada (MCP), acompanhada de elevações significativas nos níveis de ERO, inibição parcial da oxidação da glicose e comprometimento da fosforilação oxidativa. A partir destes estudos os autores sugeriram que o estresse térmico reduziu as defesas antioxidantes e causou o comprometimento de funções metabólicas importantes, resultando no aumento de ERO e indução da MCP.

Wang et al. (2012), investigaram os efeitos da exposição de plantas de soja ao estresse pelo calor e umidade (40 °C / 30 ° C, 100%/ 70% umidade, claro/escuro). Os autores observaram que as condições de estresse foram capazes de promover a deterioração das sementes, principalmente pelo acúmulo de ERO, especialmente de peróxido de hidrogênio. Observaram também um aumento significativo na peroxidação lipídica. Ainda neste contexto, Rashid e colaboradores (2020), observaram que o aumento de temperatura (30

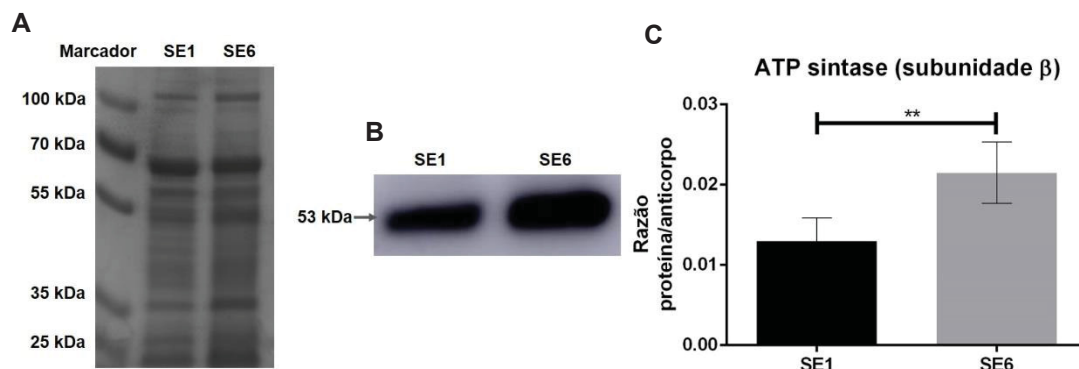
°C dia e 25 °C noite por 4 dias) causou um aumento de até 50% nos níveis de peróxido de hidrogênio acompanhado de um aumento significativo na peroxidação lipídica.

4.3 Identificação da ATP sintase (subunidade β)

Como demonstrado por Kaziuk (2017), a diminuição de ERO observada para a linhagem SE1 pode estar relacionada com a elevada atividade das enzimas antioxidantes do ciclo glutational/ascorbato. Também neste contexto, Jo et al. (2014), ao realizar a análise proteômica do extrato celular nas linhagens SE1 e SE6 evidenciaram uma maior quantidade de proteína para enzima ATP sintase (subunidade β) na linhagem SE1. A partir deste resultado, os autores sugeriram que a maior quantidade dessa proteína estaria relacionada a uma maior atividade metabólica da linhagem SE1 em comparação a SE6. No presente estudo foram realizados ensaios para identificar e quantificar esta proteína em mitocôndrias isoladas destas células.

Os resultados apresentados na Figura 3 evidenciam a presença da proteína ATP sintase (subunidade β) como uma banda correspondente a massa molecular de 53 kDa nas duas linhagens SE1 e SE6 (Figura 3 B). Para quantificar esta proteína foi necessário normalizar os resultados em função da quantidade total de proteínas no gel (coloração de azul de bromofenol) (Figura 3 A). Para isto utilizou-se o software ImageJ, que possibilitou o escaneamento das proteínas do gel e também das bandas marcadas com o anticorpo. Assim, considerou-se como 100% o valor correspondente a todas as proteínas aplicadas em determinado poço (proteínas totais) e a banda marcada apenas com o anticorpo como correspondente a ATP sintase (subunidade β) (EATON et al., 2013; FOSANG; COLBRAN, 2015; WELINDER; EKBLAD, 2011). Os resultados após esta normalização estão representados na Figura 3 C.

Figura 3 – DETECÇÃO DA PROTEÍNA ATP β EM CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*



Nota: A detecção da proteína ATP β foi realizada em mitocôndrias isoladas como descrito em materiais e métodos (item 3.6) por quimioluminescência utilizando anticorpo específico para essa proteína como descrito em materiais e método (item 3.9). A) quantidade total de proteínas no gel (coloração de azul de bromofenol). B) Membrana com as proteínas da ATP β marcadas com seu anticorpo específico e sua massa molecular em kDa. C) Gráfico de normalização comparando as linhagens SE1 e SE6 de acordo com a razão proteína/anticorpo. Os resultados representam a média $\pm$ SD de três experimentos independentes. Valores estatisticamente diferentes ** $p < 0,0015$.

Na Figura 3 C é possível observar que a enzima ATP sintase (subunidade β) é mais abundante na linhagem SE6. Este resultado está em desacordo com a análise proteômica realizada anteriormente (JO et al., 2014), que evidenciou maior abundância da proteína na linhagem SE1. No entanto, vale ressaltar que no presente estudo as células encontram-se em fase de proliferação enquanto que no trabalho de Jo et al. (2014) as células foram provenientes de culturas em fase de maturação, ou seja, cultivadas em presença de ácido abscísico (ABA). Sabe-se que o ABA é utilizado para maturação por inibir a proliferação das culturas embriogênicas e induzir a formação e propagação de embriões somáticos (STASOLLA; YEUNG, 2003; VON ARNOLD et al., 2002), o que talvez possa alterar a expressão dessa enzima. Silveira e colaboradores (2008) sugeriram que a presença dessa proteína em maior quantidade na linhagem SE1, poderia ser utilizada como marcador de embriões capazes de chegar ao estado de maturação. Jo et al. (2014), em um estudo de proteômica das mesmas linhagens de *A. angustifolia* em estágio de proliferação, salientaram que a presença da ATP sintase (subunidade β) na linhagem SE1, pode ser utilizada como marcador para linhagens responsivas a fatores de maturação.

Ainda neste contexto, para o espinafre (*Spinacia oleracea* L.), Ito et al. (1997) relataram que durante a germinação de sementes há uma maior expressão de genes que codificam proteínas de subunidades da ATPase. Gellért et al. (2018) demonstraram que a inoculação com o vírus que causa a doença chamada mosaico do pepino em *Nicotiana clevelandii*, poderia levar a apoptose e a morte celular. Nesse caso, o vírus tem uma mutação pontual que favorece sua interação com o fator F1 da ATP sintase, bloqueando a rotação do complexo enzimático, o que evidencia a importância da enzima para sobrevivência dessas plantas.

Com base nas diferenças na expressão da ATP sintase (subunidade β) entre as linhagens e a importância desta enzima no metabolismo oxidativo, optou-se por realizar ensaios de respiração em mitocôndrias isoladas das linhagens SE1 e SE6, a fim de caracterizar possíveis diferenças entre atividade dos complexos da cadeia respiratória.

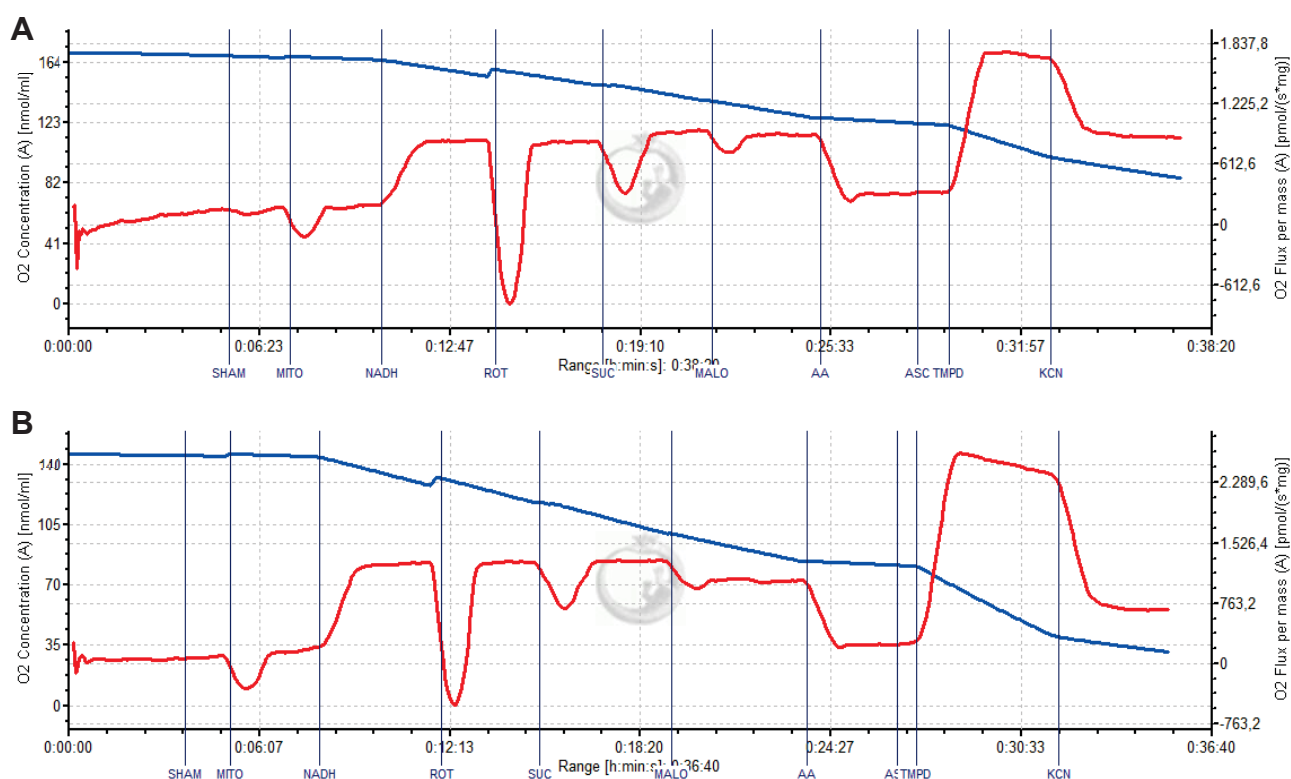
4.4 Respiração

Para a realização destes ensaios foram utilizadas mitocôndrias isoladas das células embriogênicas de *A. angustifolia* como descrito por (MARIANO et al., 2004), rompidas por três ciclos de congelamento -196°C e descongelamento a temperatura ambiente. Para o monitoramento do consumo de oxigênio foram realizadas adições sucessivas: do inibidor da oxidase alternativa (AOX), o ácido salicilhidroxâmico (SHAM); de NADH (substrato para o complexo I e NADH desidrogenases alternativas), do inibidor do complexo I, a rotenona; succinato de sódio (substrato para o Complexo II); do inibidor do complexo II, o malonato; do inibidor do complexo III, a antimicina A; ascorbato mais TMPD (substratos para o citocromo c - Complexo IV) e, por fim, do inibidor do complexo IV, o cianeto (KCN). Os resultados são expressos como fluxo de oxigênio em pmol de $\text{O}_2/\text{seg}/\text{mg}$ proteína mitocondrial.

Um traçado demonstrativo destes experimentos está representado na Figura 4, em que a linha azul corresponde a concentração de oxigênio e a vermelha, ao fluxo de oxigênio. É possível observar que as mitocôndrias isoladas

de células das culturas SE1 e SE6 estão funcionais e respirando em níveis adequados após a adição dos substratos e inibidores específicos.

Figura 4 – PERFIL DA RESPIRAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE CELULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*

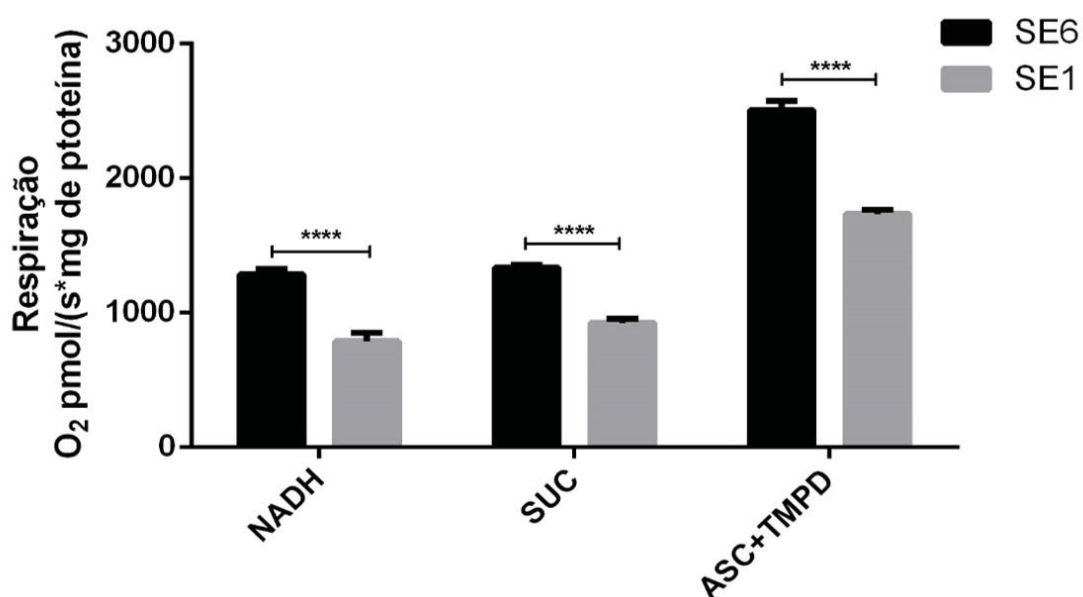


NOTA: A respiração mitocondrial foi avaliada em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k-Oroboros®), a 28°C, sob agitação constante como descrito em materiais e métodos (item 3.7). A linha azul corresponde a concentração de oxigênio e a linha vermelha corresponde ao fluxo de oxigênio. A) Respiração mitocondrial - linhagem SE1. B) Respiração mitocondrial - linhagem SE6. Adições: SHAM - ácido salicilhidroxâmico, inibidor da oxidase alternativa (AOX); MITO – suspensão de mitocôndrias; NADH, substrato para o complexo I e NADH desidrogenases alternativas, ROT - rotenona, inibidor do complexo I; SUC - succinato de sódio, substrato para o complexo II; MALO – malonato de sódio, inibidor do complexo II; AA – antimicina, inibidor do complexo III; AS-TMPD - ascorbato e TMPD, substratos para o complexo IV; KCN, inibidor do complexo IV.

Como demonstrado na Figura 3, observou-se maiores níveis da ATP sintase (subunidade β) para a linhagem SE6, sugerindo que a atividade mitocondrial, particularmente a fosforilação oxidativa, poderia ser diferente entre as linhagens (SANTOS et al., 2016). Na Figura 5 observa-se que há uma significativa diferença na atividade dos complexos respiratórios mitocondriais entre as linhagens estudadas. Em todos os casos, quando a via de entrada dos

elétrons foi o complexo I/NADH desidrogenases alternativas (após a adição de NADH), ou o complexo II (após a adição de succinato) ou o complexo IV (após adição de ascorbato e TMPD), a respiração foi maior para linhagem SE6. Resultados semelhantes foram encontrados por Furlanetto et al. (2021) em mitocôndrias intactas. Os autores demonstraram um aumento na respiração destas organelas para a linhagem SE6, tanto no estado 3 (na presença de ADP), quanto no estado 4 (conversão de ADP a ATP) da respiração. É importante ressaltar que no presente estudo as mitocôndrias foram rompidas e, desta forma, não é possível observar o processo de fosforilação oxidativa. Nesse caso, o consumo de oxigênio reflete a velocidade do transporte de elétrons na cadeia respiratória. Desta forma, estes resultados podem justificar os menores níveis de ERO nas células SE6 em comparação a SE1 em condições padrão de cultivo (25 °C – Figura 2), uma vez que quanto maior a velocidade do transporte de elétrons na cadeia respiratória, menor será o vazamento de elétrons e a formação de ERO (CARRERAS et al., 2004). Um fato interessante é que mesmo com uma taxa respiratória mais elevada, a linhagem SE6 apresenta os mesmos níveis de ATP que a linhagem SE1 (FURLANETTO et al., 2021).

Figura 5 – COMPARAÇÃO ENTRE A RESPIRAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE CELULAS EMBRIOGÊNICAS SE1 E SE6 DE *A. angustifolia*



NOTA: A respiração foi monitorada em oxígrafo de alta resolução, como descrito em materiais e métodos (item 3.7). Primeiramente, foi adicionado o inibidor da oxidase alternativa (AOX), o ácido salicilhidroxâmico (SHAM); NADH (substrato para o complexo I e NADH desidrogenases alternativas), succinato de sódio (substrato para o Complexo II) em presença de rotenona; Malonato; ascorbato mais TMPD (substratos para o Complexo IV) na presença de antimicina A. Os resultados representam a média $\pm$ SD de três experimentos independentes em triplicata. Valores estatisticamente diferentes **** $p < 0,0001$.

Furlanetto et al. (2021) também avaliaram a atividade da oxidase alternativa (AOX), responsável pela redução do O_2 a H_2O , de maneira independente do gradiente eletroquímico de prótons e, conseqüentemente, da síntese de ATP (MILLENAAR; LAMBERS, 2003). Utilizando como modelo experimental mitocôndrias isoladas, a autora demonstrou que a AOX da linhagem SE6, foi significativamente mais ativa, quando comparada a linhagem SE1. A maior atividade da AOX em células da linhagem SE6 também foi demonstrada por Kaziuk (2017). Quando considerados estes resultados e o fato de que as duas linhagens apresentaram os mesmos níveis de ATP (FURLANETTO et al., 2021), é possível sugerir que as maiores velocidades respiratórias encontradas para SE6 devem-se também a maior atividade da AOX nestas células.

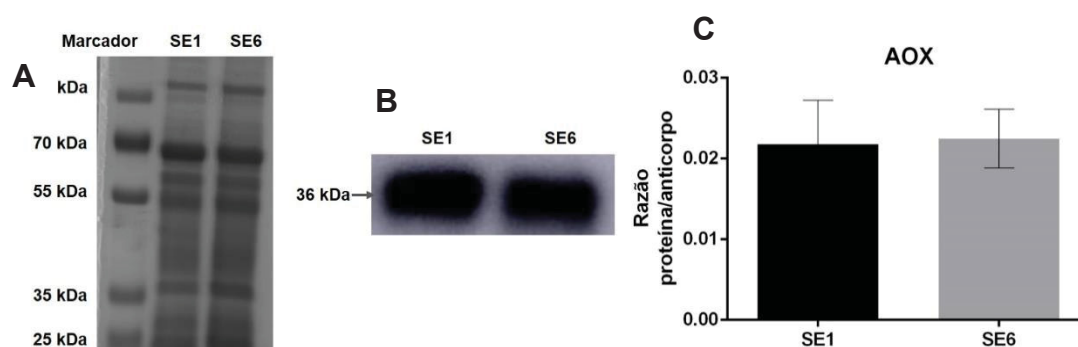
A enzima AOX está diretamente relacionada com mudanças de temperatura. Nesse contexto Fiorani e colaboradores (2005), avaliaram o efeito do estresse pelo frio (12°C - 42 dias) após a germinação em tecidos de *Arabidopsis thaliana*, com mutações para super expressar a enzima AtAOX1a. Os autores demonstraram que a enzima AOX desempenha um papel na aclimação da planta ao frio, devido a prevenção da formação descontrolada de ERO. Valente e colaboradores (2012) caracterizaram a presença da AOX em mitocôndrias de *A. angustifolia* (não caracterizadas quanto a seu potencial embriogênico) e ainda demonstraram um discreto aumento em sua atividade quando as células eram submetidas ao estresse pelo frio (4°C por 24 ou 48h), sugerindo que essa enzima poderia contribuir para superar condições de estresse oxidativo, devido a sua capacidade de controlar os níveis de ERO. Dessa forma, no presente estudo, também foram avaliadas expressão e atividade da AOX nas células das linhagens SE1 e SE6, submetidas ao estresse pelo aumento de temperatura. Os resultados são descritos a seguir.

4.5 Atividade e expressão da enzima AOX

A presença da AOX na cadeia respiratória de plantas é descrita para diferentes espécies, entre essas: *Arabidopsis thaliana* (ZUBO et al., 2014), *Nicotiana tabacum* (BARRETO et al., 2014), *Nicotiana clevelandii* (WANG; VANLERBERGHE, 2013), *Araucaria angustifolia* (VALENTE et al., 2012) e tomate (TSANIKLIDIS et al., 2014). Neste estudo a presença desta proteína nas linhagens SE1 e SE6 cultivadas a 25°C foi verificada através da técnica de Western Blot.

Os resultados da Figura 6 A evidenciam a presença da AOX de massa molecular de 36-40 kDa (BOROVIK; GRABELNYCH, 2018), nas duas linhagens (SE1 e SE6). Após a normalização dos resultados (Figura 6 B e 6 C), realizado como descrito anteriormente para ATP sintase, não foi constatada diferença nos níveis desta proteína entre as linhagens. Este resultado evidencia que maior atividade da AOX na linhagem SE6, descrita por Furlanetto et al. (2020) não está relacionada ao aumento de sua expressão.

Figura 6 – DETECÇÃO DA PROTEÍNA AOX EM CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*



Nota: A detecção da proteína AOX foi realizada em mitocôndrias isoladas como descrito em materiais e método (item 5.6) por quimioluminescência utilizando anticorpo específico para essa proteína como descrito em materiais e método (item 3.9). A) quantidade total de proteínas no gel (coloração de azul de bromofenol). B) Membrana com a proteína AOX marcadas com seu anticorpo específico e sua massa molecular em kDa. C) Gráfico de normalização comparando as linhagens SE1 e SE6 de acordo com a razão proteína/anticorpo. Os resultados representam a média $\pm$ SD de três experimentos independentes.

Como mencionado, o estresse pelo aumento de temperatura (30 °C) por 24h causou um aumento significativo dos níveis de ERO em ambas as linhagens. Quando o tempo de estresse foi prolongado para 48h, para a linhagem SE1 observou-se uma diminuição dos níveis de ERO e para a linhagem SE6, embora menor, ainda persistiu um aumento de ~36%. Sendo assim, tornou-se essencial avaliar a atividade da AOX nestas condições. A atividade da enzima, como no caso de sua expressão, foi determinada em células rompidas, uma vez que ensaios com mitocôndrias isoladas exigiriam uma grande quantidade, o que os tornou inviáveis.

Dessa forma, inicialmente foram feitos ensaios com o objetivo de comparar a atividade da AOX entre os controles das linhagens SE1 e SE6. De acordo com a Figura 7 A, há uma diferença significativa na atividade da AOX entre as linhagens, sendo mais elevada para a linhagem SE6, em comparação a linhagem SE1. Este resultado reforça a hipótese de que a maior atividade da AOX seja, pelo menos em parte, responsável pelo maior consumo de oxigênio observado na Figura 5 para nessa linhagem.

Para entender melhor o comportamento dessa enzima em condições de estresse, sua atividade foi analisada em células cultivadas a 30°C. Os resultados evidenciaram que para a linhagem SE1 houve um aumento significativo (~93%) na atividade dessa enzima, no tempo de 24h de exposição ao calor, já nos demais tempos não houve diferenças significativas (Figura 7 B e D). Em células da linhagem SE6 uma redução significativa na atividade da AOX foi observada em todos os tempos de exposição ao calor quando comparado a condições controle (25°C).

Com base nos resultados sugere-se que embora a atividade da AOX seja maior na linhagem SE6 na ausência de estresse (Figura 7 A), em condições de estresse, essa linhagem apresenta uma redução em todos os tempos analisados, evidenciando a maior sensibilidade desta enzima a esta condição. Estes resultados motivaram a realização de ensaios de detecção da presença da AOX para investigar se sua atividade estaria sendo compensada por uma

maior presença desta proteína nos tempos de maior exposição a temperatura elevada.

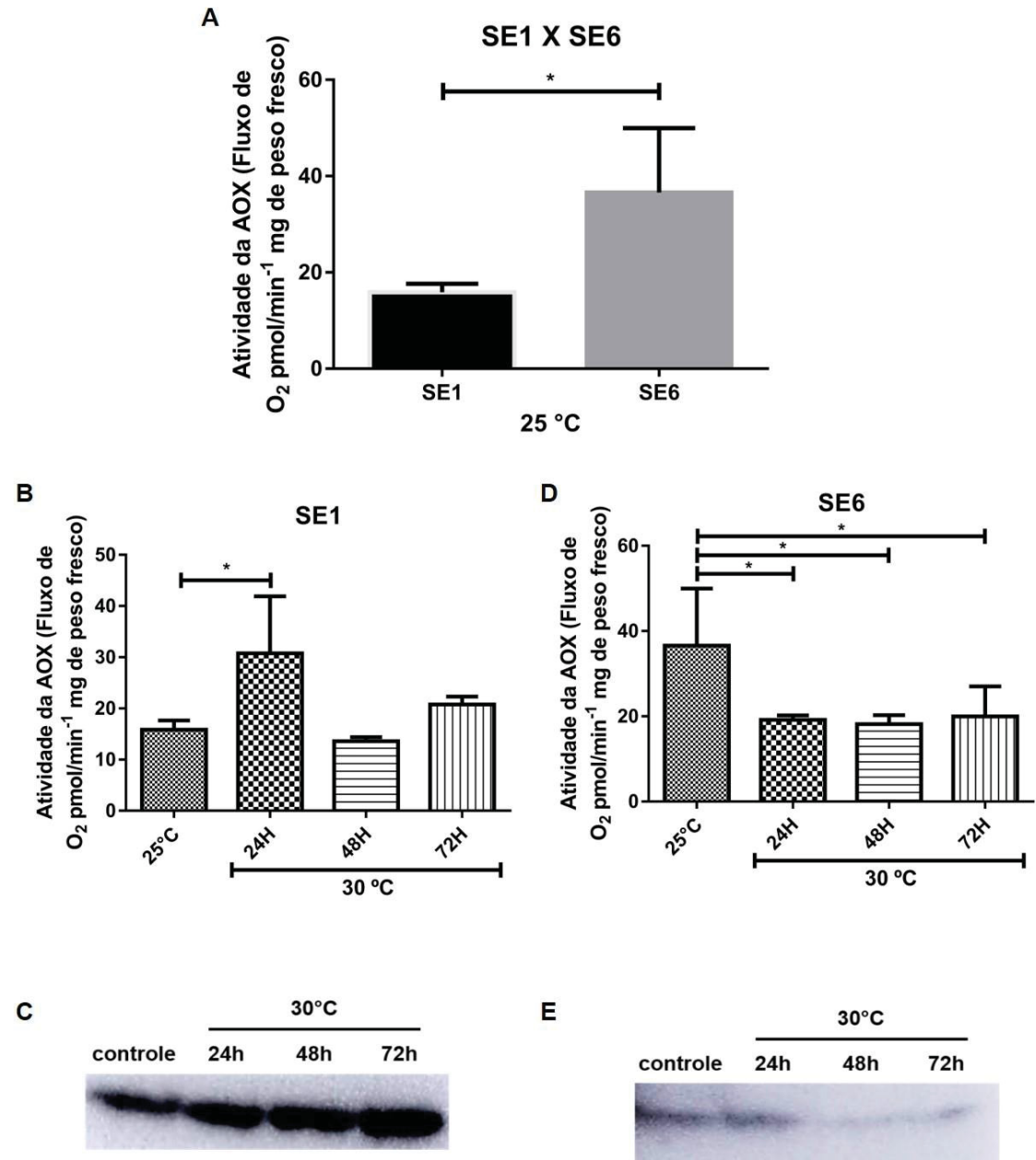
As análises de western blot (Figuras 7 B e C) foram realizadas com proteínas totais extraídas das células SE1 e SE6 e não a partir de mitocôndrias isolada, isto porque seria necessária uma grande quantidade de células para obtenção de uma suspensão mitocondrial com concentração suficiente para os ensaios.

A presença da AOX aparentemente aumentou de forma tempo-dependente em resposta ao estresse na linhagem SE1 (Figura 7 C). Estes resultados são compatíveis aos obtidos para a atividade da enzima apenas para o tempo de 24h (Figura 7 B). A linhagem SE6 é aparentemente mais sensível a condições de estresse (Figura 7 D e E). Uma aparente redução tempo-dependente da AOX foi observada (Figura 7 E), resultado compatível a redução de atividade da enzima nas mesmas condições de estresse (Figura 7 D). Neste contexto, Furlanetto et al., (2020) demonstraram através de análises de microscopia de eletrônica de transmissão, que as células da linhagem SE6 possuem mitocôndrias com menor eletrondensidade e volume, o que poderia refletir a menor quantidade de proteínas na cadeia respiratória mitocondrial. Assim, é possível que na linhagem SE6 a quantidade de AOX seja realmente menor a respeito da maior atividade da enzima (Figura 7 A). No entanto, ensaios complementares da expressão da AOX em condições de estresse devem ser realizados para que os resultados sejam confirmados.

Ainda em relação aos resultados apresentados na Figura 7 tornam-se evidentes as diferenças nos perfis das linhagens, sugerindo que em condições de estresse, as respostas se invertem. Nos grupos controle há a prevalência de maior atividade para a linhagem SE6, mas, no estresse há aumento significativo na atividade da AOX em 24h para a linhagem SE1 e aumento na presença da AOX em todos os tempos analisados. Estes resultados somados a um sistema antioxidante mais efetivo na linhagem SE1 (KAZIUK, 2017) podem contribuir para os níveis reduzidos de ERO nesta linhagem em comparação as células SE6 em condições de estresse (Figura 2). Por outro, a menor atividade da AOX e um sistema antioxidante menos efetivo na linhagem SE6, em condições de estresse,

podem resultar em níveis elevados de ERO e de lipoperoxidação nestas células (Figura 2) (KAZIUK, 2017).

Figura 7 – ATIVIDADE E PRESENÇA DA AOX EM CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia* SUBMETIDAS AO ESTRESSE PELO AUMENTO DE TEMPERATURA



NOTA: A) Comparação da atividade da AOX entre as linhagens SE1 e SE6 a 25 °C foi medida como descrito em materiais e métodos (item 3.8). A média dos controles SE1 e SE6 corresponde a 15,8 e 36,5 pmols de O_2 consumido min⁻¹ mg peso fresco de célula, respectivamente. Valores

estatisticamente diferentes do Controle $*p < 0,01$. A atividade da AOX foi estimada pela subtração do valor da respiração após a adição do FCCP do valor obtido após a adição de SHAM (FCCP – SHAM). Os valores de consumo de oxigênio devido a reações independentes da cadeia respiratória (após a adição da antimicina A) foram descontados de todos os estados da respiração. B) Efeito do estresse por temperatura na atividade da AOX na linhagem SE1 e C) a presença da sua proteína para linhagem SE1 submetida ao estresse por temperatura. D) Efeito do estresse por temperatura na atividade da AOX na linhagem SE6 e E) a presença da sua proteína para a linhagem SE6 submetida ao estresse por temperatura. Controle: células cultivadas a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A condição de estresse foi a exposição a temperatura de $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pelos tempos indicados. Os resultados representam a média $\pm$ SD de três experimentos independentes em duplicata. A detecção da proteína AOX foi realizada por quimioluminescência utilizando anticorpo específico para essa proteína, como descrito em materiais e métodos (3.9). Os resultados de western blot são representativos e correspondem a dois ensaios independentes.

Não somente a elevação de temperatura promove alterações na atividade da AOX. Zhang e colaboradores (2021), avaliaram a atividade da enzima em raízes de batata doce condicionadas a baixa temperatura (4°C por 35 dias) para saber se esse método ajudaria na conservação das raízes em armazenamento. O tratamento pelo frio reduziu significativamente o acúmulo de ERO e os níveis de malondialdeído quando comparado ao tratamento com o inibidor da AOX o ácido salicilhidroxâmico (SHAM), nas mesmas condições. Demonstrando que o armazenamento das raízes em condições mais frias favorece e prolonga a qualidade das raízes, e de acordo com os autores estes efeitos seriam pela atividade da AOX, uma vez que na adição de SHAM, os efeitos foram reversos. Também como mencionado, no estudo de Valente e colaboradores (2012) esta enzima foi caracterizada em mitocôndrias de *A. angustifolia* (não caracterizadas quanto a seu potencial embriogênico). Um discreto aumento da atividade da AOX ocorreu em resposta ao estresse pelo frio (4°C por 24 ou 48h), o que levou os autores a sugerirem que a enzima poderia contribuir para superar condições de estresse oxidativo, devido a sua capacidade de controlar os níveis de ERO.

Dando continuidade a este estudo, buscou-se avaliar a influência da temperatura na expressão do gene *AaSERK1*, um dos principais sinalizadores para a formação de embriões somáticos em araucária (JO, 2012; SANTA-CATARINA et al., 2004; STEINER et al., 2012; YAZICILAR; BEZIRGANOGLU, 2021).

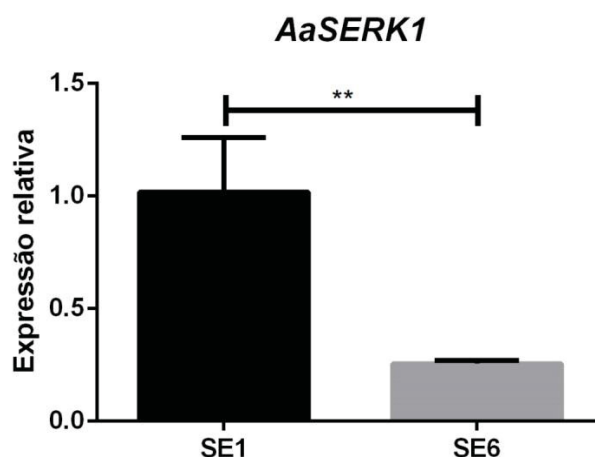
4.6 Expressão do gene *AaSERK1*

A família de genes *SERK* pode participar de diferentes vias de sinalização celular (KUMAR; VAN STADEN, 2019), porém, no presente estudo, o foco principal foi a sinalização para a formação de embriões (JO, 2012; NODINE; YADEGARI; TAX, 2007; STEINER et al., 2012). Sabe-se que *SERK* pode atuar na reprogramação e divisão celular (Santos & Aragão, 2009). Além disso, está diretamente relacionado com a indução de auxinas, uma importante estimuladora de embriogênese somática (NOLAN; IRWANTO; ROSE, 2003). De acordo com Santa-Catarina et al. (2004), o gene *SERK* pode ser utilizado como marcador molecular de células com potencial embriogênico.

A expressão do gene *AaSERK1* foi analisada por PCR em tempo real (qRT-PCR) e, para a normalização dos resultados foi utilizada a expressão do gene endógeno *UBIQUITINA-1 (UBI1)*. Os resultados de expressão relativa do gene *AaSERK1* estão apresentados nas Figuras 8 e 9. Observa-se uma grande diferença na expressão do gene *AaSERK1* entre as linhagens SE1 e SE6, sendo que a linhagem responsiva SE1 possui a expressão significativamente mais elevada.

Estes resultados estão de acordo com os estudos de Jo (2012) e Steiner et al. (2012). O trabalho de Steiner e colaboradores (2012), caracterizou o gene *SERK* em embriões de *Araucaria angustifolia*, padronizando sua clonagem e padrão de expressão. Demonstraram, ainda, a maior expressão desse gene em células periféricas das massas pró-embrionárias (MPE), sugerindo que esse mecanismo tem sido conservado entre as espécies de plantas. Jo (2012) demonstrou que culturas de *Araucaria angustifolia* responsivas (SE1), quando cultivadas em meios na presença de agentes de maturação, possuem uma elevada taxa de expressão do gene *AaSERK1*. Já as culturas não responsivas (SE6) não apresentaram diferenças na sua expressão. Dessa forma, o presente trabalho evidencia as mesmas diferenças para as culturas SE1 e SE6 (Figura 8), reforçando que a expressão mais elevada deste gene está diretamente relacionada com linhagens competentes e responsivas a agentes de maturação e a formação de ES (JO, 2012; STEINER et al., 2012).

Figura 8 – EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *AaSERK1* EM CULTURAS SE1 E SE6



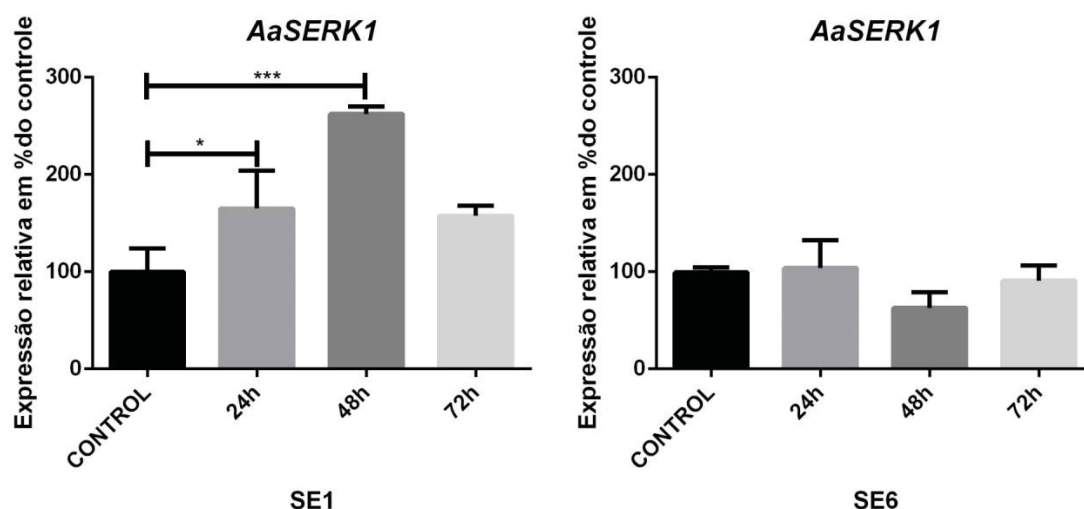
Nota: Expressão relativa do gene *AaSERK1* em condições controle: células cultivadas a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O ensaio foi realizado como descrito em materiais e métodos (item 3.10). Os resultados representam a média $\pm$ SD de três experimentos independentes em duplicata. Valores estatisticamente diferentes $**p < 0,005$.

As diferenças na expressão e a relação do gene *AaSERK1* com a embriogênese são bem conhecidas (KUMAR; VAN STADEN, 2019). Porém, até o momento não se conhece a relação entre as elevações na temperatura e a formação de embriões em gimnospermas, bem como qual seria a sua influência na expressão desse gene. No presente estudo foi realizada esta avaliação e, para isso, as culturas embriogênicas de araucária foram submetidas ao estresse $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24, 48 e 72h e a expressão do gene *AaSERK1* foi determinada em ambas as linhagens.

Na Figura 9, para a linhagem SE1, observa-se diferenças no perfil de expressão do gene *AaSERK1*. Curiosamente, houve um aumento significativo nos níveis de expressão nos tempos de 24 e 48h de estresse, sendo de ~ 65 e $\sim 162\%$, respectivamente. No entanto, no tempo de 72h não houve diferença em relação ao controle (25°C). Esses resultados são interessantes pois sugerem

que o gene *AaSERK1* tenha um papel importante em situações de estresse, pelo menos nos tempos iniciais de 24 e 48h. Para a linhagem bloqueada SE6, observa-se na Figura 9 que não houve diferença na expressão do gene em nenhum dos tempos de estresse, sugerindo que em linhagens bloqueadas à indução por fatores de maturação o gene *AaSERK1* não é sensível a elevações de temperatura.

Figura 9 – EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *AaSERK1* EM CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia* SUBMETIDAS AO ESTRESSE PELO AUMENTO DE TEMPERATURA 30°C



Nota: Expressão relativa do gene *AaSERK1* em porcentagem do controle 100% foram realizados como descrito em materiais e métodos (item 3.10). Controle: células cultivadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os tempos de estresse ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) estão especificados no gráfico. Os resultados, expressos como % do controle, representam a média $\pm$ SD de três experimentos independentes em duplicata. Valores estatisticamente diferentes * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0005$.

Os aumentos na expressão do gene *AaSERK1* para linhagem SE1 podem ter relação com os maiores níveis de ERO nestas células em condições controle (25°C) e no estresse de 24h (Figura 2). Este é um resultado interessante uma vez que não há estudos na literatura que estabeleçam esta relação para *A. angustifolia*.

Em embriões somáticos de abacaxi (*Ananas comosus*), Ma et al. (2012), analisaram a expressão do gene *AcSERK2* em diferentes condições de estresse por temperatura, de 4°C e 40°C, por 24h. O estresse por baixa temperatura aumentou os níveis de expressão do gene *AcSERK2*, enquanto que a alta temperatura causou uma diminuição. Os autores ressaltaram que por se tratar de uma espécie tropical, o abacaxi poderia apresentar maior resistência a alta temperatura do que ao frio, sugerindo que o gene *SERK* também pode ser utilizado como um indicativo de estresse abiótico (MA et al., 2012).

Em relação ao estresse salino, Li et al. (2017) demonstraram que foi capaz de aumentar a expressão dos genes *HvSERK1* e *HvSERK3* em cevada (*Hordeum vulgare* L.). Assim, os autores consideraram essa família de genes importante nas vias de tolerância ao estresse hídrico. YAZICILAR et al. (2021) demonstraram que em culturas embriogênicas de alfafa (*Medicago Sativa* L.), o estresse salino (50 mM NaCl) promoveu um aumento significativo na expressão do gene *SERK*. Os autores sugeriram que o gene *SERK* é eficaz na promoção e crescimento de células embriogênicas de alfafa submetidas a este tipo de estresse (YAZICILAR; BEZIRGANOGLU, 2021).

Zheng e colaboradores (2018), analisaram o perfil de expressão de doze genes *SERK* de maçã (*Malus hupehensis*) *MdSERK*, submetidos ao estresse por NaCl, jasmonato de metila, ácido salicílico e abscísico. Os autores observaram que oito dos doze genes analisados eram responsivos as condições de estresse avaliadas, sugerindo que os genes *SERKs* podem estar envolvidos na adaptação de condições ambientais.

O papel do gene *SERK* em relação ao estresse biótico também foi relatado. O silenciamento do gene *LsSERK* em alface está relacionado com uma redução na embriogênese somática, além de deixar as plantas mais suscetíveis a ataques do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (SANTOS, ROMANO, VIEIRA, BALDONI, & ARAGÃO, 2009). Quando ocorre a superexpressão do gene *OsSERK1* no arroz, as plantas adquirem maior resistência ao ataque de fungos *Magnapothae grisea* (HU; XIONG; YANG, 2005).

Dessa forma, pode-se sugerir que o gene *AaSERK1* não está ligado apenas com o potencial embriogênico nas linhagens de araucária, pois também pode servir como um indicador de linhagens com perfil de maior tolerância ao estresse, porém, essa possibilidade deve ser melhor investigada.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo evidenciam que o estresse pelo aumento de temperatura altera a morfologia celular, sendo as mitocôndrias as organelas mais afetadas nas duas linhagens celulares, porém, a linhagem responsiva (SE1) é menos sensível a esta condição. Os danos observados nas mitocôndrias estão possivelmente relacionados aos aumentos nos níveis de ERO nas duas linhagens. Nas células não responsivas (SE6), os níveis de ERO aumentaram significativamente após 24h de estresse, o que poderia estar associado ao aumento da lipoperoxidação nestas células, como demonstrado por Kaziuk (2017). O retorno dos níveis de ERO aos do controle (células cultivadas a 25°C), após 72h de estresse, pode ser justificado pela ativação do sistema antioxidante, principalmente pelo aumento das atividades de SOD, catalase e GR (KAZIUK, 2017). Por sua vez, nas células SE1 (responsivas) a diminuição dos níveis de ERO em relação a condição controle (25°C), nos tempos de 48 e 72h de estresse, pode estar associada a maior atividade das enzimas do ciclo da glutathione (APX e MDHAR) (KAZIUK, 2017).

Para todos os segmentos da cadeia respiratória avaliados, a velocidade do consumo de oxigênio foi maior para as células da linhagem não responsiva (SE6), quando cultivadas a 25°C, justificando os menores níveis de ERO nestas células. Uma maior eficiência da fosforilação oxidativa na linhagem SE6, nestas condições, é sugerida pela maior expressão da ATP sintase (subunidade β). Por outro lado, a redução na velocidade do transporte de elétrons, em resposta ao estresse térmico, pode ter contribuído para o aumento nos níveis de ERO, que não foram reduzidos nos maiores tempos de estresse, como observado para as células SE1. Ainda, com relação a respiração, a maior expressão da AOX na linhagem SE6, nas células cultivadas a 25°C, também reforça a hipótese de que a maior atividade da AOX seja, pelo menos em parte, responsável pelo maior consumo de oxigênio nessa linhagem. No entanto, um aumento de atividade foi observado apenas para a linhagem responsiva (SE1) em 24 h de estresse, enquanto sua expressão foi aumentada em todos os tempos (24, 48, 72h). Para as células SE6, o estresse não afetou atividade e, aparentemente, reduziu a expressão desta enzima. Esses resultados evidenciam que a linhagem SE1 apresenta uma resposta inicial mais sensível a variações de temperatura e que

é possível que na linhagem SE6 a quantidade da AOX seja menor, como sugerido por Furlanetto et al. (2021).

A expressão do gene *AaSERK1*, relacionado com o potencial embriogênico, foi significativamente maior na linhagem SE1, reforçando a capacidade responsiva destas células a fatores de maturação, bem como de formar embriões somáticos. Um resultado importante foi o aumento de sua expressão em condições de estresse (30 °C) nos tempos de 24 e 48h, somente nas células SE1, o que pode caracterizar este gene como um marcador de estresse abiótico nestas células.

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que as linhagens SE1 e SE6 respondem de forma distinta quando submetidas ao estresse pelo aumento de temperatura, sugerindo que este fator pode interferir no desenvolvimento de embriões somáticos de *Araucaria angustifolia*. Os resultados evidenciam, ainda, que os mecanismos de resposta ao estresse das células SE1 (responsivas) são mais efetivos em modular os níveis de ERO, que, por sua vez, estão relacionados a capacidade de maturação destas células. Experimentos posteriores para outros marcadores de maturação, como o etileno e óxido nítrico nesta condição de estresse, devem ser realizados para complementar este estudo.

6. REFERÊNCIAS

- ADAN, N. et al. **Local Knowledge, Use and Management of Ethnovarieties of Araucaria angustifolia (Bert.) Ktze. in the Plateau of Santa Catarina, Brazil** *Economic Botany*, 2016.
- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. **Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants** *Journal of Plant Biology*, 2008.
- AHUJA, I. et al. **Plant molecular stress responses face climate change** *Trends in Plant Science*, 2010.
- AJIJAH, N.; SYAFARUDDIN; INOUE, E. Cacao (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos development under heat stress condition . **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, 2020.
- ARNOLD, S. VON; ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta* . **Canadian Journal of Botany**, 1981.
- ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. Induction and maintenance of embryonal-suspensor masses cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 1998.
- ASTARITA, L. V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, 2003.
- ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (coniferae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, 2000.
- AUBOIRON, E.; CARRON, M. P.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1990.
- BARON, K.; STASOLLA, C. **The role of polyamines during in vivo and in vitro development** *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 2008.
- BARRETO, P. et al. Overexpression of UCP1 in tobacco induces mitochondrial biogenesis and amplifies a broad stress response. **BMC Plant Biology**, 2014.
- BARRY, C. S.; GIOVANNONI, J. J. **Ethylene and fruit ripening** *Journal of Plant Growth Regulation*, 2007.
- BECRAFT, P. W. **Receptor kinases in plant development** *Trends in Plant Science*, 1998.
- BECWAR, M. R.; NOLAND, T. L.; WYCKOFF, J. L. Maturation , Germination , and Conversion of Norway Spruce (*Picea abies* L .) Somatic Embryos to Plants Author (s): Michael R . Becwar , Thomas L . Noland and Judith L . Wyckoff Published by : Society for In Vitro Biology Stable URL : <https://www.jstor.org>. v. 25, n. 6, p. 575–580, 1989.
- BEGARA-MORALES, J. C. et al. **Nitric oxide buffering and conditional nitric oxide release in stress response** *Journal of Experimental Botany*, 2018.

- BEN MAHMOUD, K. et al. Molecular investigations of the somatic embryogenesis recalcitrance in the cherry (*Prunus cerasus* L.) rootstock CAB 6P. **Turkish Journal of Biology**, 2017.
- BITRIÁN, M. et al. **Polyamines under abiotic stress: Metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants** *Metabolites*, 2012.
- BOROVİK, O. A.; GRABELNYCH, O. I. Mitochondrial alternative cyanide-resistant oxidase is involved in an increase of heat stress tolerance in spring wheat. **Journal of Plant Physiology**, 2018.
- BOZHKOV, P. V.; FILONOVA, L. H.; SUAREZ, M. F. Programmed Cell Death in Plant Embryogenesis. In: **Current Topics in Developmental Biology**. [s.l.: s.n.].
- BRADAĬ, F.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Effect of cryopreservation on olive (*Olea europaea* L.) plant regeneration via somatic embryogenesis. **Plants**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2021.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976.
- BRANDT, B.; HOTHORN, M. **SERK co-receptor kinases** *Current Biology*, 2016.
- CARRERAS, M. C. et al. **Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease** *Molecular Aspects of Medicine*, 2004.
- CARVALHO, M. M. X. DE. **O desmatamento das florestas de araucária e o Médio Vale do Iguaçu : uma história de riqueza madeireira e colonizações**. [s.l.: s.n.].
- CARVALHO, P. E. . Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. **Brasília: EMBRAPA**, 1994.
- CASSOL, C. A. **Relações entre características do solo, crescimento e produtividade em povoamento implantado de Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze**. [s.l.] Passo Fundo – RS, 1982.
- CASTANDER-OLARIETA, A. et al. Effect of thermal stress on tissue ultrastructure and metabolite profiles during initiation of radiata pine somatic embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, 2019.
- CASTRO, M. B. et al. Will the emblematic southern conifer *Araucaria angustifolia* survive to climate change in Brazil? **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 2, p. 591–607, 2020.
- CHANDOK, M. R. et al. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. **Cell**, 2003.
- CHANG, K. N. et al. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in *Arabidopsis*. **eLife**, 2013.
- CHOU, S. C. et al. Assessment of Climate Change over South America under

RCP 4.5 and 8.5 Downscaling Scenarios. **American Journal of Climate Change**, 2014.

COSTION, C. M. et al. Will tropical mountaintop plant species survive climate change? Identifying key knowledge gaps using species distribution modelling in Australia. **Biological Conservation**, v. 191, p. 322–330, 2015.

CUEVA, A.; CONCIA, L.; CELLA, R. Molecular characterization of a *Cyrtocilum loxense* Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, 2012.

CZARNOCKA, W.; KARPIŃSKI, S. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, n. December 2017, p. 4–20, 2018.

DAMATTA, F. M.; COCHICHO RAMALHO, J. D. **Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review** *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2006.

DEL RÍO, L. A. et al. Plant superoxide dismutases: Function under abiotic stress conditions. **Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants**, p. 1–26, 2018.

DOS SANTOS, A. L. W. et al. **Somatic Embryogenesis in Brazilian pine: establishment of biochemical markers for selection of cell lines with high embryogenic potential**. Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management. **Anais...** 2012 Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/ltziar_Montalban/publication/283511024_A_combined_method_to_increase_somatic_embryogenesis_efficiency_in_valuable_cell_lines_of_Pinus_spp/links/563c9e7d08ae45b5d289539c/A-combined-method-to-increase-somatic-embryogenes>

DOS SANTOS, A. L. W. et al. Quantitative proteomic analysis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze cell lines with contrasting embryogenic potential. **Journal of Proteomics**, v. 130, p. 180–189, 1 jan. 2016.

DUTRA, N. T. et al. Polyamines affect the cellular growth and structure of pro-embryogenic masses in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures through the modulation of proton pump activities and endogenous levels of polyamines. **Physiologia Plantarum**, 2013.

EATON, S. L. et al. Total Protein Analysis as a Reliable Loading Control for Quantitative Fluorescent Western Blotting. **PLoS ONE**, 2013.

ELBL, P. et al. Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2015.

ELIÁŠOVÁ, K. et al. Histological and biochemical response of Norway spruce somatic embryos to UV-B irradiation. **Trees - Structure and Function**, 2017.

ELIÁŠOVÁ, K. et al. The response of *Picea abies* somatic embryos to UV-B radiation depends on the phase of maturation. **Frontiers in Plant Science**,

2018.

FANCY, N. N.; BAHLMANN, A. K.; LOAKE, G. J. **Nitric oxide function in plant abiotic stress***Plant Cell and Environment*, 2017.

FILONOVA, L. H.; BOZHKO, P. V.; VON ARNOLD, S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **Journal of Experimental Botany**, 2000.

FIORANI, F.; UMBACH, A. L.; SIEDOW, J. N. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis* AOX1a transgenic plants. **Plant Physiology**, 2005.

FISHER, K.; TURNER, S. PXY, a Receptor-like Kinase Essential for Maintaining Polarity during Plant Vascular-Tissue Development. **Current Biology**, 2007.

FONTOURA, S. B.; GANADE, G.; LAROCCA, J. Changes in plant community diversity and composition across an edge between *Araucaria* forest and pasture in South Brazil. **Revista Brasileira de Botanica**, 2006.

FOSANG, A. J.; COLBRAN, R. J. **Transparency is the key to quality***Journal of Biological Chemistry*, 2015.

FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, v. 154, n. May, p. 134–142, 2018.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. **Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub***Plant Physiology*, 2011.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. **Redox signaling in plants***Antioxidants and Redox Signaling*, 2013.

FOYER, C. H.; RUBAN, A. V.; NOCTOR, G. **Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage***Biochemical Journal*, 2017.

FRANCO, A. M. S.; DILLENBURG, L. R. Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas jovens de *Araucária angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. **Hoehnea**, 2007.

FRITZSON, E.; WREGE, M. S.; MANTOVANI, L. E. Climatic aspects related to the distribution of Brazilian pine in the state of Santa Catarina. **Floresta**, 2018.

FURLANETTO, A. L. D. M. et al. Short-term high temperature treatment reduces viability and inhibits respiration and DNA repair enzymes in *Araucaria angustifolia* cells. **Physiologia Plantarum**, [s.d.].

FURLANETTO, A. L. D. M. et al. Cold stress on *Araucaria angustifolia* embryogenic cells results in oxidative stress and induces adaptation: implications for conservation and propagation. **Free Radical Research**, v. 53, n. 1, p. 45–56, [s.d.].

FURLANETTO, A. L. D. M. **CARACTERIZAÇÃO DE PARÂMETROS MITOCONDRIAIS EM CÉLULAS DE *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**

COM DIFERENTES POTENCIAIS EMBRIOGÊNIOS E EFEITOS DO ESTRESSE POR VARIAÇÃO DE TEMPERATURA. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2018.

FURLANETTO, A. L. D. M. et al. **Mitochondrial bioenergetics as a biomarker of the responsiveness to the somatic embryo development of embryogenic Araucaria angustifolia cells.** Curitiba, PR.: [s.n.].

GAIDAMASHVILI, M.; BENELLI, C. Threatened woody plants of georgia and micropropagation as a tool for in vitro conservation. **Agronomy**, v. 11, n. 6, p. 1–20, 2021.

GELLÉRT, Á. et al. A single point mutation on the cucumber mosaic virus surface induces an unexpected and strong interaction with the F1 complex of the ATP synthase in Nicotiana clevelandii plants. **Virus Research**, 2018.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 1 dez. 2010.

GROSS, F.; DURNER, J.; GAUPELS, F. **Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses** *Frontiers in Plant Science*, 2013.

GUERRA, M. P. et al. Somatic Embryogenesis in Araucaria angustifolia (Bert) O. Ktze. In: [s.l.: s.n.].

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Gutteridge Free Radicals in Biology and Medicine**, 2007. (Nota técnica).

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** [s.l.: s.n.].

HE, K. et al. BAK1 and BKK1 Regulate Brassinosteroid-Dependent Growth and Brassinosteroid-Independent Cell-Death Pathways. **Current Biology**, 2007.

HU, H.; XIONG, L.; YANG, Y. Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. **Planta**, 2005.

IBGE. **Extração vegetal e Silvicultura 2020.** Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/pesquisa/16/12705?localidade1=41&localidade2=42&ano=2020&indicador=12729&tipo=ranking>>.

ITO, N. et al. Characterization of 26S proteasome α - and β -type and ATPase subunits from spinach and their expression during early stages of seedling development. **Plant Molecular Biology**, 1997.

JACKSON, C. et al. Separation of Mitochondria from Contaminating Subcellular Structures Utilizing Silica Sol Gradient Centrifugation. **Plant Physiology**, v. 64, n. 1, p. 150–153, 1979.

JALEEL, C. A. et al. Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n.

3, p. 427–436, 2009.

JAMBUNATHAN, N. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 2010.

JIN, F. et al. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: Evidence for stress response functions in SE development. **Plant Biotechnology Journal**, 2014.

JO, L. **ESTABELECIMENTO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Araucaria angustifolia***. [s.l.: s.n.].

JO, L. et al. 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.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, 1965.

KAZIUK, F. D. **EFEITO DO ESTRESSE POR ALTA TEMPERATURA EM CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia* RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) À INDUÇÃO DE MATURAÇÃO**. [s.l.] Federal university of paraná, 2017.

KĘPCZYŃSKA, E.; ZIELIŃSKA, S. Disturbance of ethylene biosynthesis and perception during somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. reduces embryos' ability to regenerate. **Acta Physiologiae Plantarum**, 2011.

KÖNIG, J.; MUTHURAMALINGAM, M.; DIETZ, K. J. **Mechanisms and dynamics in the thiol/disulfide redox regulatory network: Transmitters, sensors and targets****Current Opinion in Plant Biology**, 2012.

KOYRO, H. W.; AHMAD, P.; GEISLER, N. Abiotic stress responses in plants: An overview. In: **Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change**. [s.l.: s.n.].

KUMAR, V.; VAN STADEN, J. **Multi-tasking of SERK-like kinases in plant embryogenesis, growth, and development: current advances and biotechnological applications****Acta Physiologiae Plantarum**, 2019.

LEROUX, B. et al. Inhibition of ethylene biosynthesis enhances embryogenesis of cultured microspores of *Brassica napus*. **Plant Biotechnology Reports**, 2009.

LI, Y. et al. Expression analysis of three SERK-like genes in barley under abiotic and biotic stresses. **Journal of Plant Interactions**, 2017.

LIGHT, K. M. et al. **Perception of the plant hormone ethylene: known-knowns and known-unknowns****Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 2016.

LIU, X. et al. Reactive oxygen species are involved in plant defense against a gall midge. **Plant Physiology**, 2010.

LOHANI, N.; SINGH, M. B.; BHALLA, P. L. High Temperature Susceptibility of

- Sexual Reproduction in Crop Plants. **Journal of Experimental Botany**, 2019.
- LU, J.; VAHALA, J.; PAPPINEN, A. Involvement of ethylene in somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2011.
- LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, 1961.
- MA, J. et al. Characterization and expression analysis of AcSERK2, a somatic embryogenesis and stress resistance related gene in pineapple. **Gene**, 2012.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, M. S. DOS. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 787–796, 2004.
- MARCHIORO, C. A.; SANTOS, K. L.; SIMINSKI, A. Present and future of the critically endangered *Araucaria angustifolia* due to climate change and habitat loss. **Forestry**, v. 93, n. 3, p. 401–410, 2021.
- MARIANO, A. B. et al. Improved method for isolation of coupled mitochondria of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2004.
- MATTOO, A. K. et al. **Polyamines and cellular metabolism in plants: Transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine**. *Amino Acids. Anais...*2010
- MATTOS, J. R. DE. **O pinheiro brasileiro**. 2. ed. Lages, SC.: [s.n.]. v. 1
- MAURI, P. V.; MANZANERA, J. A. Somatic embryogenesis of holm oak (*Quercus ilex* L.): Ethylene production and polyamine content. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 3, p. 717–723, 2011.
- MILLAR, A. H.; LIDDELL, A.; LEAVER, C. J. Isolation and Subfractionation of Mitochondria from Plants. **Methods in Cell Biology**, v. 80, n. 06, p. 65–90, 2007.
- MILLENAAR, F. F.; LAMBERS, H. **The alternative oxidase: In vivo regulation and function***Plant Biology*, 2003.
- MINOCHA, R. et al. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. **Physiologia Plantarum**, 1999.
- MITTLER, R. et al. **Reactive oxygen gene network of plants***Trends in Plant Science*, 2004.
- MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11–19, 2017.
- MØLLER, I. M. **PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS : Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species . Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 2001a.
- MØLLER, I. M. **PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS : Electron**

Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 561–591, 2001b.

MONTAGNA, T. et al. A importância das Unidades de Conservação na manutenção da diversidade genética de araucária (*Araucaria angustifolia*) no Estado de Santa Catarina. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 17–24, 2012.

MOSCHOU, P. N.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. **Polyamines and programmed cell death** *Journal of Experimental Botany*, 2014.

MOUNCE, B. C. et al. Polyamines and Their Role in Virus Infection. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2017.

MUR, L. A. J. et al. **Nitric oxide in plants: An assessment of the current state of knowledge** *AoB PLANTS*, 2013.

NASA. **climate International**. Disponível em:
<<http://climateinternational.org/#home>>.

NAVROT, N. et al. **Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria**. *Physiologia Plantarum*. **Anais...**2007

NGCALA, M. G. et al. Heat stress triggers differential protein accumulation in the extracellular matrix of sorghum cell suspension cultures. **Proteomes**, v. 8, n. 4, p. 1–19, 2020.

NOCTOR, G.; REICHHELD, J. P.; FOYER, C. H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 80, p. 3–12, 2018.

NODARI, E. Historia de la devastación del bosque de araucaria en el sur del Brasil. **Areas: Revista internacional de ciencias sociales**, v. 55, n. 35, p. 75–85, 2016.

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**, 2007.

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

OLIVEIRA-FILHO, A. T. et al. Delving into the variations in tree species composition and richness across South American subtropical Atlantic and Pampean forests. **Journal of Plant Ecology**, 2014.

PAL BAIS, H.; RAVISHANKAR, G. A. **Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002.

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

PARENT, C.; CAPELLI, N.; DAT, J. Formes réactives de l'oxygène, stress et

mort cellulaire chez les plantes. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 331, n. 4, p. 255–261, 2008.

PECH, J. C. et al. Ethylene and Fruit Ripening. In: **The Plant Hormone Ethylene**. [s.l.: s.n.].

PEDROSO, M. C.; MAGALHAES, J. R.; DURZAN, D. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. **Plant Science**, 2000.

PEI, H. et al. Regulatory Function of Ethylene in Plant Responses to Drought, Cold, and Salt Stresses. In: **Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress**. [s.l.: s.n.].

PIERUZZI, F. P. et al. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). **Annals of Botany**, 2011.

POUDEL, P. B.; POUDEL, M. R. Heat stress effects and management in wheat. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 37, n. 5, p. 1–6, 2017.

PRIYADHARSHINI, S.; MANOKARI, M.; SHEKHAWAT, M. S. In vitro conservation strategies for the critically endangered Malabar river lily (*Crinum malabaricum* Lekhak & Yadav) using somatic embryogenesis and synthetic seed production. **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 172–180, 2020.

QUINTEIRO, M. M. DA C.; ALEXANDRE, B. DA R.; MAGALHÃES, L. M. S. Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) Ethnoecology in the Mantiqueira Atlantic Forest. **Floresta e Ambiente**, 2019.

RASHID, M. et al. Oxidative damage in forage rape (*Brassica napus* L.) seeds following heat stress during seed development. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 206, n. 1, p. 101–117, 2020.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. *Araucariáceas*. Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues. **Flora ilustrada catarinense**, p. 62, 1966.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, 1963.

ROUSTAN, J. P.; LATCHE, A.; FALLOT, J. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. **Plant Cell Reports**, 1989.

SANTA-CATARINA, C. SILVEIRA, V. et al. The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. **Current Topics in Plant Biology**, v. 13, n. January, p. 103–119, 2006.

SANTA-CATARINA, C. et al. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2004.

SANTA-CATARINA, C. et al. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. **Plant Growth Regulation**, 2006.

SANTOS, M. O. et al. Suppression of SERK gene expression affects fungus tolerance and somatic embryogenesis in transgenic lettuce. **Plant Biology**,

2009.

SANTOS, M. O.; ARAGÃO, F. J. L. Role of SERK genes in plant environmental response. **Plant Signaling and Behavior**, 2009.

SASAKI, G. et al. Multiple receptor-like kinase cDNAs from liverwort *Marchantia polymorpha* and two charophycean green algae, *Closterium ehrenbergii* and *Nitella axillaris*: Extensive gene duplications and gene shufflings in the early evolution of streptophytes. **Gene**, 2007.

SCHEEREN, L. W. et al. Agrupamento de unidades amostrais de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. em função de variáveis do solo, da serapilheira e das acículas, na região de Canela, RS. **Ciência Florestal**, 2000.

SILVEIRA, V. et al. Biotechnology tolls in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. **Cropp Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 463–470, 2002.

SILVEIRA, V. et al. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2004.

SILVEIRA, V. et al. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, 2006.

SILVEIRA, V. et al. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, 2008.

STASOLLA, C. et al. Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. **Tree Physiology**, 2004.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. **Recent advances in conifer somatic embryogenesis: Improving somatic embryo quality** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003.

STEFENON, V. M. et al. Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: A case study of *Araucaria angustifolia*. **Biodiversity and Conservation**, 2009.

STEFENON, V. M. et al. Phylogeography of plastid DNA sequences suggests post-glacial southward demographic expansion and the existence of several glacial refugia for *Araucaria angustifolia*. **Scientific Reports**, 2019.

STEINER, N. et al. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2005.

STEINER, N. et al. A gymnosperm homolog of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (SERK1) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2012.

SUZUKI, N.; KATANO, K. **Coordination between ROS regulatory systems and other pathways under heat stress and pathogen attack** *Frontiers in Plant Science*, 2018.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. **Peroxynitrite: Biochemistry**,

pathophysiology and development of therapeutics *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007.

THOMAS, P. *Araucaria angustifolia*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2013.

TSANIKLIDIS, G. et al. Low temperature storage affects the ascorbic acid metabolism of cherry tomato fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2014.

TSANIKLIDIS, G. et al. Polyamine homeostasis in tomato biotic/abiotic stress cross-tolerance. **Gene**, 2020.

VACCA, R. A. et al. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. **Plant Physiology**, 2004.

VALENTE, C. et al. The involvement of PUMP from mitochondria of *Araucaria angustifolia* embryogenic cells in response to cold stress. **Plant Science**, v. 197, p. 84–91, 1 dez. 2012.

VALERO, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; SERRANO, M. **The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit** *Trends in Food Science and Technology*, 2002.

VENIOS, X. et al. Grapevine responses to heat stress and global warming. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2020.

VERCESI, A. E. et al. Pumping plants. **Nature**, 1995.

VERCESI, A. E. et al. PLANT UNCOUPLING MITOCHONDRIAL PROTEINS. **Annual Review of Plant Biology**, 2006.

VIEIRA, L. DO N. et al. Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. **Plant Science**, 2012.

VON ARNOLD, S. et al. **Developmental pathways of somatic embryogenesis** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002.

WANG, J.; VANLERBERGHE, G. C. A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress. **Physiologia Plantarum**, 2013.

WANG, K. L. C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, 2002.

WANG, L. et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 7, p. 2109–2127, 2012.

WANG, P. et al. TDP-43 induces mitochondrial damage and activates the mitochondrial unfolded protein response. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 5, p. e1007947, 17 maio 2019.

WANG, P.; ZHU, J. K.; LANG, Z. Nitric oxide suppresses the inhibitory effect of abscisic acid on seed germination by S-nitrosylation of SnRK2 proteins. **Plant**

Signaling and Behavior, 2015.

WANN, S. R. et al. Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. **Plant Cell Reports**, 1987.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Cell Biology**, 1958.

WELINDER, C.; EKBLAD, L. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. **Journal of Proteome Research**, 2011.

WILSON, O. J. et al. Cold spot microrefugia hold the key to survival for Brazil's Critically Endangered *Araucaria* tree. **Global Change Biology**, 2019.

WREGE, M. S. et al. **Climate change and conservation of *Araucaria angustifolia* in Brazil**. Unasylva. **Anais...**2009

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 2010.

YAZICILAR, B.; BEZIRGANOGLU, I. Response to Salt Stress with Increasing NaCl in Alfalfa (*Medicago Sativa* L .) Callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 1–21, 2021.

YUN, B. W. et al. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. **Nature**, 2011.

ZANDALINAS, S. I. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 162, n. 1, p. 2–12, 2018.

ZECHINI, A. A. et al. Genetic Conservation of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*) Through Traditional Land Use. **Economic Botany**, 2018.

ZHANG, H. et al. Role of AOX in low-temperature conditioning induced chilling tolerance in sweetpotato roots. **Scientia Horticulturae**, v. 288, n. January, p. 110365, 2021.

ZHENG, L. et al. Genome-wide identification of SERK genes in apple and analyses of their role in stress responses and growth. **BMC Genomics**, 2018.

ZUBO, Y. O. et al. Inhibition of the electron transport strongly affects transcription and transcript levels in *Arabidopsis* mitochondria. **Mitochondrion**, 2014.