

EXPRESSÃO GÊNICA NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA VEGETAL

Elias Terra Werner¹, Andreia Barcelos Passos Lima² e José Augusto Teixeira do Amaral³

1. Doutorando em Produção Vegetal - Universidade Federal do Espírito Santo / UFES - Alto Universitário, s/n, 29500-000, Alegre, ES (elias_werner@ig.com.br).
2. Professora Doutora em Genética e Melhoramento - Universidade Federal do Espírito Santo / UFES - Alto Universitário, s/n, 29500-000, Alegre, ES – Brasil. (albarcelos@hotmail.com).
3. Professor Doutor em Fitotecnia (Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo / UFES - Alto Universitário, s/n, 29500-000, Alegre, ES – Brasil. (jata@cca.ufes.br).

Recebido em: 04/05/2012 – Aprovado em: 15/06/2012 – Publicado em: 30/06/2012

RESUMO

A embriogênese somática é uma das técnicas da cultura de tecidos vegetais que tem sido descrita para uma gama de espécies, partindo-se de uma grande variedade de materiais (explante), tais como micrósporos, protoplastos, embriões imaturos, explantes de tecidos e células cultivadas *in vitro*. O desenvolvimento e a diferenciação vegetal requeridos nesta via de regeneração *in vitro* são regulados direta ou indiretamente por mudanças na expressão gênica. O mecanismo preciso que controla a expressão gênica vegetal e os passos detalhados pelos quais estes genes dirigem o processo específico da embriogênese somática ainda não está completamente entendido, contudo, é conhecido que para a formação do embrião somático vegetal é requisitada a indução e ativação de uma variedade de genes, e muitos estudos moleculares têm empregado diferentes técnicas de “screening” (investigação) para identificá-los. O objetivo desta revisão é descrever algumas famílias de genes atuantes no processo de embriogênese somática vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: cultura de tecidos vegetais, regeneração *in vitro*, regulação gênica.

GENE EXPRESSION IN PLANT SOMATIC EMBRYOGENESIS

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a technique of tissue culture which has been described for a variety of species, starting from a wide variety of materials (explants), such as microspores, protoplasts, immature embryos, tissue explants and *in vitro* cells cultured. The development and differentiation required at this *in vitro* plant regeneration are regulated directly or indirectly by changes in gene expression. The precise mechanisms controlling plant gene expression and the detailed steps by which these genes direct the specific process of somatic embryogenesis is still not completely understood, however, it is known that for the formation of somatic plant embryo is required induction and activation of a variety of genes, and many molecular studies have employed different techniques of "screening" (research) to identify them. The objective of this review is to describe some families of genes active in process plant somatic embryogenesis.

KEYWORDS: Plant tissue culture, *in vitro* regeneration, gene regulation.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia é composta por várias áreas, dentre elas está a cultura de tecidos vegetais, que é extremamente utilizada na propagação de plantas. Um exemplo da versatilidade desta técnica é a regeneração de plantas via organogênese ou embriogênese somática (direta ou indireta) partindo de uma célula, tecido ou ainda por meio de cultura de protoplastos (SANTIAGO, 2003).

Vários métodos de cultura de tecidos, utilizando diversas partes das plantas, foram desenvolvidos com diferentes objetivos. Entre os principais métodos de cultura de tecidos estão a micropropagação, a cultura de meristemas, a microenxertia, a cultura de embriões, a cultura de calos, a suspensão celular, a polinização e fertilização *in vitro*, a cultura de ovários, a cultura de protoplastos e a embriogênese somática. Os principais usos da cultura de tecidos são produção de plantas *in vitro*, recuperação de plantas isentas de vírus (limpeza clonal), conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), obtenção de mutantes *in vitro*, obtenção de organismos haplóides e haplodiplóides e a produção de plantas transgênicas (TORRES *et al.*, 1998).

A utilização dos métodos de cultura de tecidos envolve a separação não convencional de parte do corpo do vegetal pela excisão de um explante. Uma nova planta representando a árvore matriz, ou nova geração, é produzida por organogênese ou por embriogênese somática. Estes processos de propagação vegetativa são adventícios, no sentido de que células ou tecidos não produzem novas plantas normalmente, mas podem ser induzidas a fazê-lo por desdiferenciação, indução e diferenciação (rediferenciação) de células em embriões, gemas ou calos (VENDRAME, 1994) (Figura 1).

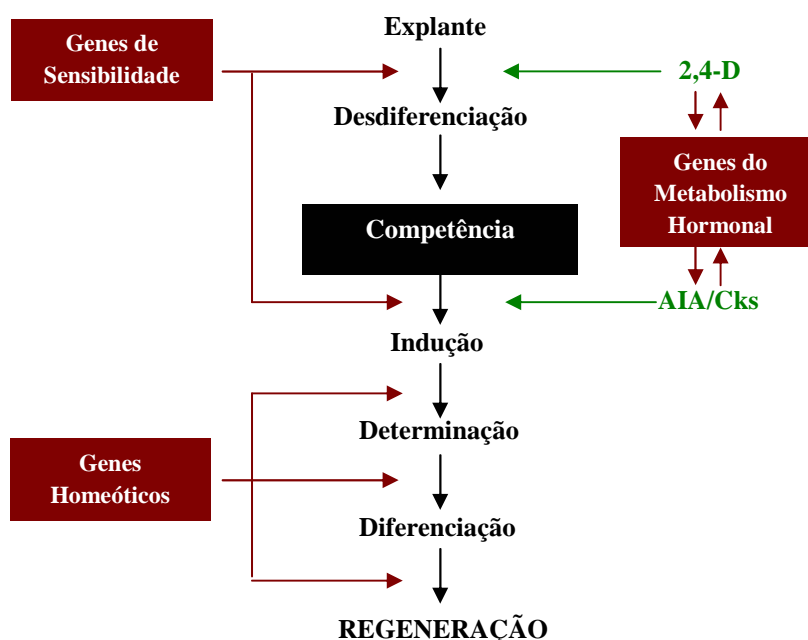


FIGURA 1. Esquema da competência organogenética. Os possíveis estádios onde atuariam diferentes genes que influenciam a regeneração são indicados em vermelho. Os genes de sensibilidade, seriam aqueles envolvidos na percepção (codificação de receptores) e transdução do sinal para auxinas (AIA, 2,4D) e citocininas (Cks). Os genes de

metabolismo hormonal (que codificam enzimas de biossíntese e/ou degradação de hormônios) são os responsáveis pelo estabelecimento de um balanço hormonal endógeno necessário para a regeneração. Genes homeóticos controlam a formação de órgãos e, portanto, podem estar associados à regeneração de novas gemas caulinares ou raízes. A expressão desfavorável de qualquer uma dessas classes de genes seria suficiente para impedir a regeneração de um determinado explante. Fonte: CHRISTIANSON & WARNICK (1988).

Essa capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* para formar gemas, raízes ou embriões somáticos tem despertado a atenção de pesquisadores, devido a sua grande implicação prática e importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica e genética de plantas. Isso só foi possível depois de reconhecida a totipotência das células vegetais, em que as células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados. A totipotencialidade, todavia, não tem sido facilmente demonstrada, conhecendo-se muitas espécies cuja capacidade regenerativa não foi ainda evidenciada na prática. Mesmo aceitando-se em princípio esta afirmação, é bem conhecido o fato de certos tecidos serem mais favoráveis à regeneração de gemas, raízes e embriões somáticos do que outros (KERBAUY, 1998).

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA: ASPECTOS GERAIS

A embriogênese somática é uma das técnicas da cultura de tecidos que tem sido descrita para uma gama de espécies, partindo-se de uma grande variedade de materiais, tais como micrósporos, protoplastos, embriões imaturos, explantes de tecidos e células cultivadas *in vitro* (SCHMIDT *et al.*, 1997).

O termo “somático” refere-se ao fato de o embrião desenvolver-se assexuadamente de tecido vegetativo (somático), em que células somáticas diplóides desenvolvem-se em plantas diferenciadas sem a fusão de gametas (VENDRAME, 1994), num processo morfogenético que se aproxima da seqüência de eventos representativos da embriogênese zigótica (TAUTORUS *et al.*, 1991; ZIMMERMAN, 1993), apresentando, inclusive, estádios de desenvolvimento embrionário similares (Figura 2).

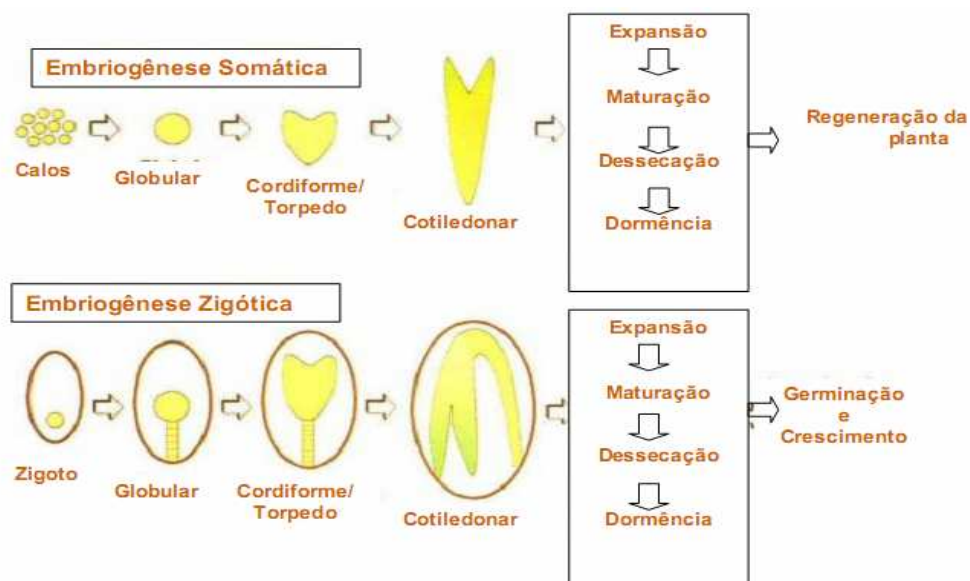


FIGURA 2. Estádios de desenvolvimento do embrião durante a embriogênese somática e zigótica. Fonte: ZIMMERMAN, 1993 (adaptado).

Células capazes de reagir a sinais específicos do desenvolvimento são chamadas de competentes, e determinadas para a embriogênese quando iniciam a transição do estado somático para o embriogênico (SCHMIDT *et al.*, 1997).

A embriogênese somática pode ocorrer de forma direta ou indireta, sendo que na maioria dos sistemas ela ocorre de forma indireta. Na via direta, os embriões surgem de calos apenas cicatriciais, sem passarem pela fase de calo indiferenciado, originando-se, aparentemente, de células embriogênicas pré-determinadas (SÖNDAHL *et al.*, 1985), que são moduladas, aparentemente, por meios ricos em citocininas e desprovidos de auxinas (DUBLIN, 1981). A embriogênese somática indireta, requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). Os embriões surgem de calos primários não diferenciados ou de calos secundários, que são fortemente embriogênicos (DUBLIN, 1984).

BARROS (1999) ressalta que dentre os processos de micropropagação, a embriogênese somática é, teoricamente, a melhor opção para a propagação *in vitro* de frutíferas por apresentar algumas vantagens, tais como: alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação; produção em larga escala pela manutenção da cultura em meio líquido; plantio direto da muda obtida via embriogênese somática sem necessidade de enxertia, com menor custo de produção, além de a planta ser geneticamente semelhante à planta mãe, sem as influências do porta-enxerto, como acontece com as plantas obtidas por métodos de propagação vegetativa convencionais.

Porém, a embriogênese somática também apresenta algumas limitações que têm dificultado sua utilização como sistema de micropropagação. A primeira e maior delas diz respeito à necessidade da obtenção de um sistema de embriogênese reproduzível em larga escala. Outra limitação é quanto à variabilidade genética indesejável (variação somaclonal), às vezes, introduzida pelo processo. Essas anormalidades genéticas, especialmente na forma de poliploidia e aneuploidia, são descritas em geral como resultado da passagem pela fase de calo, quando as células estariam mais sujeitas a sofrerem alterações (AMMIRATO, 1983; KRIKORIAN *et al.*, 1983).

O processo básico para a embriogênese somática consiste de dois ciclos repetitivos característicos evidenciados na figura 3. Este modelo resulta de calos e suspensões celulares depois que o tecido matriz (explante) é submetido a tratamentos que induzem competência embriogenética. Isto significa que é necessário que ocorra a desdiferenciação e posterior rediferenciação celular através de uma reprogramação genética (epigênese – ativação seletiva e diferencial de genes) cujos determinantes básicos são o estágio fisiológico do explante e o tipo e concentração do regulador de crescimento que atuará como sinal químico para a ativação gênica diferencial (CHRISTIANSON & WARNICK, 1988).

No primeiro, um explante da planta matriz é inoculado em meios de cultura contendo hormônio vegetal auxina, sendo a mais utilizada o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Estas culturas geram complexos ou massas celulares pró-embriônicas, que por processos de embriogênese repetitiva, resultam em um ciclo repetitivo de divisões celulares, formando embriões somáticos globulares. No segundo ciclo, chamado de ciclo de maturação, esses pró-embriões são estimulados a prosseguir o seu desenvolvimento pela retirada da auxina do meio de cultura, ou pela inclusão de ácido abscísico (ABA), citocininas e de agentes que promovam estresse osmótico. Nesta fase as culturas são mantidas em condições de luminosidade. Esse ciclo de maturação forma embriões somáticos que podem ser convertidos a plantas (GUERRA *et al.*, 1999).

De maneira geral, a perspectiva de sucesso em extrair resposta embriogenética neste modelo depende da utilização de explantes juvenis ou embrionários e da manipulação adequada de uma auxina forte, como o 2,4-D (KOMAMINE *et al.*, 1992). Esta auxina atua como indutora do processo, contudo sua presença no meio de cultura depois da indução pode causar anormalidades ontogenéticas (DURZAN, 1985). Modelos como estes foram obtidos para o cafeeiro por SONDAHL & MONACO (1981), para palmeiras por TISSERAT (1979), para gramíneas por VASIL & VASIL (1982), para soja por CHRISTIANSON (1985) e para cenoura por LITZ (1987), cujos artigos ampliam e aprofundam detalhes sobre este modelo.

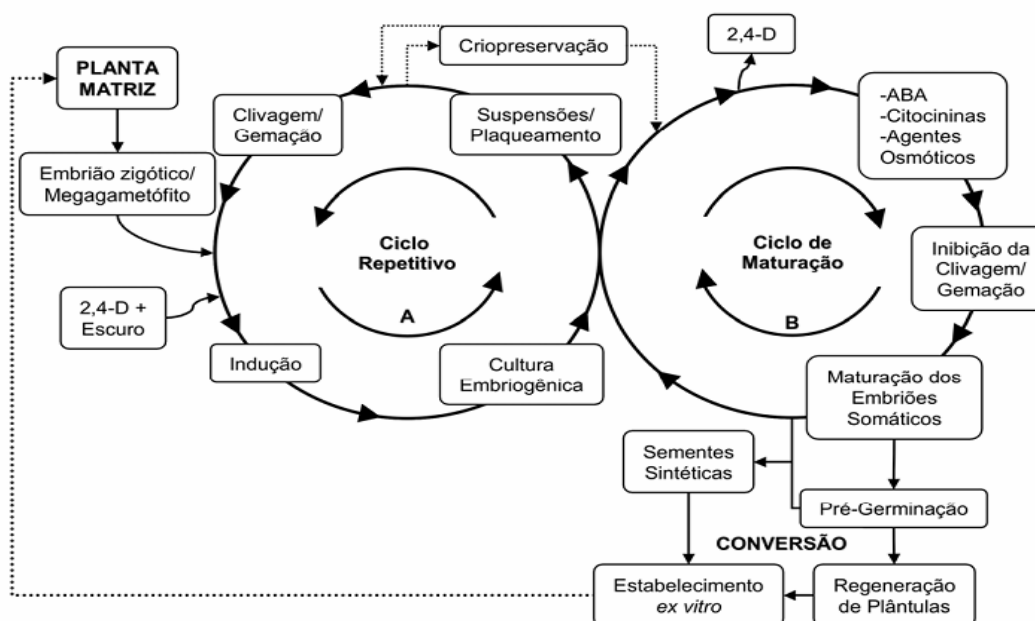


FIGURA 3. Modelo representando os ciclos da embriogênese somática.
Fonte: GUERRA *et al.*, (1999).

EXPRESSÃO GÊNICA NA EMBRIOGÊNSE SOMÁTICA

O desenvolvimento e a diferenciação vegetal são regulados direta ou indiretamente, por mudanças na expressão gênica, especialmente durante a embriogênese (DONG & DUNSTAN, 2000). O mecanismo preciso que controla a expressão gênica vegetal e os passos detalhados pelos quais estes genes dirigem o processo específico da embriogênese vegetal ainda não estão completamente entendidos. É conhecido que para a formação do embrião vegetal é requisitada a indução e ativação de uma variedade de genes, e muitos estudos moleculares têm empregado diferentes técnicas de “screening” (investigação) para identificá-los (SCHMIDT et al., 1997).

Estudos moleculares da embriogênese vegetal começaram na década de 1980, e desde então tem evoluído de forma interessante (JIMENEZ, 2001). Os estudos iniciais, na embriogênese zigótica de sementes em desenvolvimento, em geral, foram desenvolvidos com o intuito de estimar a quantidade, analisar a distribuição espacial e temporal de diferentes RNAs, e também, isolar e caracterizar os genes que codificam proteínas abundantes neste estágio (MEINKE, 1995). No entanto, a estratégia experimental básica para a análise molecular da embriogênese somática, em sua maioria, se baseou na comparação de genes e proteínas, expressos em células embriogênicas e não-embriogênicas, bem como nos diferentes estádios da embriogênese (RAO, 1996).

Estudos da expressão gênica durante os diferentes estádios desse processo tem sido realizados (HENRY et al., 1994; KAWAHARA & KOMAMINE, 1995; MEINKE, 1995; WILDE et al., 1995; DONG & DUNSTAN, 2000; CHE et al., 2006; KISELEV et al., 2009) e sugerem que o número de genes especificamente expressos durante esses eventos sejam bastante limitados. Esta sutil mudança, relatada na expressão gênica durante o processo de embriogênese, confere às células somáticas a habilidade de demonstrarem seu potencial embriogênico (RAGHAVAN, 1997).

Os genes relacionados à regulação da embriogênese somática foram reunidos em grupos funcionais pelas suas características em comum (Figura 4). Embora as funções desses genes se sobreponham, a figura 4 representa uma forma de categorizá-los e, dessa forma, tornar mais lúcida a compreensão da embriogênese somática.

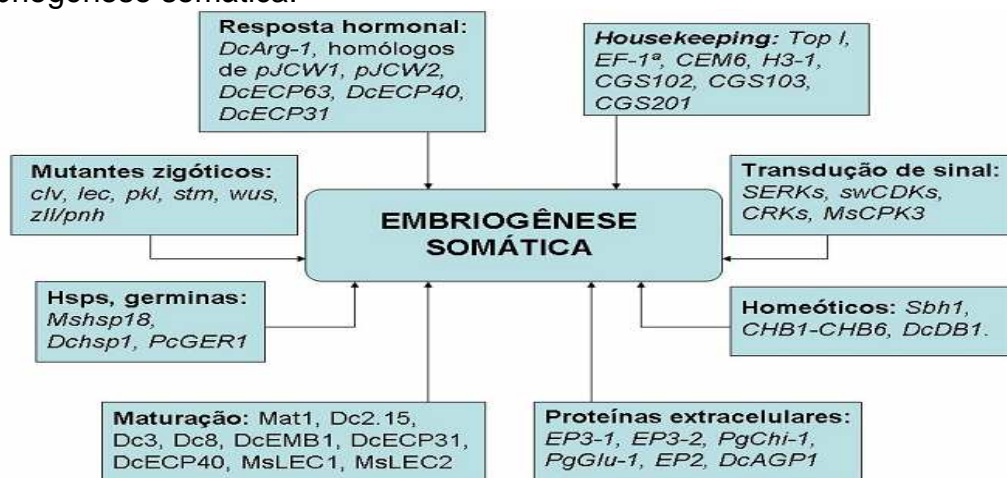


FIGURA 4. Representação esquemática dos vários grupos de genes identificados que influenciam a embriogênese somática nas plantas superiores. Fonte: CHUGH & KHURANA, 2002.

É importante ressaltar que boa parte dos genes investigados na embriogênese somática foram identificados e caracterizados a partir de células embriogênicas de cenoura (organismo modelo para este tipo de estudo).

GENES DE RESPOSTA HORMONAL

A expressão dos genes de resposta hormonal pode ser induzida por hormônios vegetais. Estudos moleculares desses genes durante a embriogênese somática desempenham um importante papel na identificação de vários fatores envolvidos na transdução de sinais (CHUGH & KHURANA, 2002). DODEMAN *et al.*, (1997) relataram que as mudanças nos níveis hormonais na cultura de tecidos vegetais funcionam como sinais e podem modificar a síntese de algumas proteínas específicas da embriogênese somática.

As auxinas são relatadas como fortes iniciadoras da embriogênese somática (KOMAMINE *et al.*, 1992; RAGHAVAN, 1997; EZHOVA, 2003; CHE *et al.*, 2006). Segundo THEOLOGIS (1986), é evidente que as auxinas induzem o crescimento e o desenvolvimento a partir de alterações na expressão gênica.

A exposição a uma grande quantidade de auxina serve como um gatilho, induzindo a divisão celular nas células da epiderme e promovendo uma maior diferenciação em embriões somáticos (BONACIN *et al.*, 2000). MASHAYEKHI *et al.*, (2008) relatam também que baixas concentrações de auxina induzem a embriogênese somática. Assim, mesmo uma pequena concentração de auxina é suficiente para indução de células competentes para desencadear a embriogênese somática (DE KLERK *et al.*, 1997).

Possivelmente, auxinas exógenas alteram os níveis de metilação em células embriogênicas de cenoura e aparentemente um nível ótimo de metilação é necessário para um desenvolvimento normal do embrião somático (LELJAK-LEVANIC *et al.*, 2004). Uma hipometilação ou hipermetilação pode causar um imediato e irreversível bloqueio da embriogênese somática (VYSKOT *et al.*, 1993).

Outra classe de hormônios vegetais que regula vários processos durante a embriogênese zigótica e somática, além da formação de sementes, é o ácido abscísico (ABA) (GASPAR *et al.*, 1996). A produção e acúmulo deste hormônio em várias outras partes da planta ocorrem em resposta a estresses abióticos, tais como seca, frio e estresse salino (TABAEIZADEH, 1998).

O mecanismo pelo qual o ABA regula a expressão gênica envolve eventos transcricionais bem como pós-transcricionais, como o processamento do transcrito, estabilidade do mRNA, controle da tradução e da atividade protéica (CHUGH & KHURANA, 2002).

Gene *DcArg-1*

O gene *DcArg-1* (*D. carota Auxin-regulated gene 1*), assim como o gene *Dchsp-1* (*D. carota heat-shock protein 1*) (tópico 3.7.2), são regulados por auxinas (KITAMIYA *et al.*, 2000). A partir desta homologia de *DcArg-1* com os genes regulados por auxinas, foi descoberto que existe uma relação paralela entre a expressão de *DcArg-1* e a formação do embrião somático. Além disso, em contraste com *Dchsp-1*, *DcArg-1* não é sensível a tratamentos com estresse e não é expresso durante o desenvolvimento do embrião somático, apenas na indução, indicando que sua função não é necessária para que o processo ocorra (THOMAS & JIMÉNEZ, 2005). O isolamento desses genes em embriões somáticos de cenoura indica que

altas concentrações do hormônio vegetal é percebido pela célula como uma condição de estresse (CHUGH & KHURANA, 2002).

Genes homólogos de *pJCW1* e *pJCW2*

A classe gênica *SAUR* (*small auxin up-regulated*) é composta por genes que são induzidos por auxinas. Os genes *pJCW1* e *pJCW2* foram os primeiros desta classe identificados no feijão (WALKER & KEY, 1982), quando utilizados como sondas, estes indicaram que a auxina induz um acúmulo específico de mRNAs, devido a hibridização com essas sequências (HAGEN *et al.*, 1984). PADMANABHAN *et al.*, (2001) relataram que tais sondas podem servir como uma ferramenta para distinguir células com potencial embriogênico de células não-embriogênicas. Em cultura velha de embriões somáticos de alfafa o nível de transcritos para esses genes decresceu, indicando uma relação entre o tempo de cultura com o potencial morfogênético. Isto poderia ser explicado pela perda de sensibilidade dos genes de resposta a auxina devido à prolongada exposição ao 2,4-D, reduzindo a competência embriogênica.

Gene *DcECP63*, *DcECP40* e *DcECP31*

Os genes *DcECP31*, *DcECP40* e *DcECP63* de cenoura e *AtECP31*, *AtECP63* de *Arabidopsis* são induzidos por ABA, codificando proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*), em que existe um aumento na expressão durante o estágio torpedo de embriões somáticos (CHUGH & KHURANA, 2002).

GENES HOUSEKEEPING

Os genes *housekeeping* são elementos constitutivos, ou seja, expressos continuamente e estão envolvidos com funções básicas necessárias para a manutenção celular (DODEMAN *et al.*, 1997). Estes genes desempenham um papel importante durante a divisão celular e na formação da parede celular em vários estádios da diferenciação do embrião (CHUGH & KHURANA, 2002).

Gene *Top I*

A DNA topoisomerase I é uma enzima chave envolvida em vários processos do metabolismo do DNA e é expressa pelo gene *Top I* (ZAHA *et al.*, 2003). A expressão diferencial deste gene foi descrita durante a proliferação celular, induzida por 2,4-D, em hipocótilo de cenoura, em que o maior acúmulo de transcritos deste gene é encontrado durante o estágio torpedo da embriogênese somática (BALESTRAZZI, 2001).

Gene *EF-1^a*

As proteínas sintetizadas a partir do gene *EF-1^a* são altamente conservadas nos eucariotos e são encontradas com abundância no interior celular (HOVEMANN *et al.*, 1988). KAWAHARA *et al.*, (1992) revelaram que durante a embriogênese somática de cenoura, um dos genes identificados como *CEM1*, foi encontrado em altos níveis nos estádios globular e codiforme, concomitantemente o transcrito desse gene codifica o fator de alongamento eucariótico translacional-1 alfa (*EF-1^a*).

Gene *CEM6*

O gene *CEM6* é expresso especificamente no estágio pré-globular e globular na formação de embriões somáticos de cenoura, e está relacionado na biogênese da parede celular durante a embriogênese (SATO *et al.*, 1995).

Gene *H3-1*

Durante a embriogênese somática de alfafa há maior expressão de dois genes codificadores de histonas, o *H3-1* e *H3-11*, em resposta ao tratamento com auxina (KAPROS *et al.*, 1992). Foi detectado um alto nível de mRNA da histona H3 em todos os estádios de desenvolvimento da embriogênese somática em alfafa (MAHALAKSHMI & KHURANA, 1995).

Gene *CGS102*, *CGS103* e *CGS201*

Os genes *CGS102*, *CGS103* e *CGS201* codificam isoformas da enzima glutamina sintetase (SUPRASANNA & BAPAT, 2005). HIGASHI *et al.*, (1998) investigando a expressão destes genes durante a embriogênese zigótica e somática, revelou que ocorreu um aumento nos níveis de transcrição nos estádios iniciais da embriogênese zigótica e somática de *CGS102* e *CGS201*, enquanto *CGS103* foi expresso apenas nos estádios posteriores do desenvolvimento de sementes, e esteve ausente em embriões somáticos.

TRANSDUÇÃO DE SINAIS

A percepção de estímulos hormonais e/ou mensageiros secundários como o cálcio podem desencadear cascatas de transdução de sinais em vários embriões somáticos, de uma forma similar aos outros processos de desenvolvimento em plantas superiores (GUERRA *et al.*, 1999).

Algumas enzimas quinases foram identificadas com significativa participação na transdução de sinal iniciado na membrana celular seguindo até o seu local de ação. Estas quinases geralmente se autofosforilam para a sua ativação e estão envolvidas na regulação de outros transdutores de sinais (SHEEN, 1996).

A embriogênese somática envolve várias vias de transdução de sinal para a indução e/ou repressão de um grande número de variedades gênicas (CHUGH & KHURANA, 2002).

GENES *SERKS*

Os genes conhecidos como *SERK* (receptor de quinase na embriogênese somática) são expressos em culturas de embriões somáticos e foram isolados em culturas de suspensão de cenoura em várias fases de crescimento (THOMAS *et al.*, 2004). Os genes *SERKs* podem servir como um marcador molecular característico para diferenciar células competentes e não competentes (CHUGH & KHURANA, 2002). A expressão de *SERK* é observada em células competentes até o estágio globular do embrião somático, entretanto não é detectado em estádios não embriogênicos. Em embriões zigóticos o mRNA de *SERK* foi detectado transitoriamente no início do estágio globular e está ausente em outros tecidos vegetais. Em células de cenoura a expressão de *SERK* foi relacionada à capacidade de formar embriões somáticos (THOMAS *et al.*, 2004).

O gene *SERK* foi primeiramente descrito em culturas de células competentes de cenoura (*DcSERK*) (SCHMIDT *et al.*, 1997). Outros homólogos deste gene foram

encontrados em *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK1*) (HECHT *et al.*, 2001), *Dactylus glomerulata* (*DgSERK*) (SOMLEVA *et al.*, 2000) e *Medicago truncatula* (*MtSERK*) (NOLAN *et al.*, 2003).

De acordo com SANTA-CATARINA *et al.*, (2004) os agregados celulares cultivados nos meios de cultura MS suplementado com 2,4-D (MS+2,4-D) e no meio WPM, a expressão do gene *SERK* foi detectada. Culturas mantidas em meio MS sem 2,4-D (MS-2,4-D) não apresentaram esta resposta, sugerindo que a adição do 2,4-D ao meio de cultura MS contribuiu para a ativação da expressão do gene *SERK*. A expressão do gene em meio WPM sugere também que outros componentes do meio de cultura possam ativar a expressão do gene *SERK*.

A importância da presença do 2,4-D na indução da embriogênese somática foi intensamente estudada e descrita na literatura (DUDITS *et al.*, 1995). Acredita-se que o 2,4-D atue como um agente metilador do DNA nuclear (DE KLERK *et al.*, 1997), alterando o conteúdo endógeno de hormônios, como o AIA, através de um distúrbio no metabolismo endógeno de auxinas (FEHÉR *et al.*, 2003). Em agregados celulares de *Ocotea catharinensis* cultivados em meio MS, a expressão do homólogo do gene *SERK* somente foi detectada quando o 2,4-D foi incorporado ao meio de cultura. A indução da expressão de um homólogo do gene *SERK* por auxina foi também observada em culturas embriogênicas de *M. truncatula* (NOLAN *et al.*, 2003).

Genes *swCDKs*, *CRKs* e *MsCPK3* (estimulados pelo cálcio)

O cálcio é um mensageiro secundário em vários eventos regulados por hormônio, desempenhando um papel chave em vários processos fisiológicos celulares nas plantas superiores (HARPER, 2001). Existe em geral um aumento na concentração de cálcio no citoplasma durante alguns processos de transdução de sinal mediados por este nutriente, seguida por uma percepção de proteínas ligadas ao cálcio que alteram sua conformação e se tornam ativas, interagindo com uma gama de proteínas regulatórias (SOPORY & MUNSHI, 1998).

O papel do cálcio tem sido bem descrito na embriogênese somática de cenoura e foi descoberto pela sua essencialidade na morfogênese de células indiferenciadas em embriões somáticos (OVERVOORDE & GRIMES, 1994). Estudos relacionados à presença de cálcio exógeno, disponibilizado no meio nutritivo, sugere sua importância na manutenção do gradiente de concentração deste íon no interior celular para um bom desenvolvimento do embrião. Altas concentrações de cálcio não tiveram efeito significativo na viabilidade e no potencial embriogênico da cultura, porém em baixas concentrações ou pela a adição de um agente quelante, como o EGTA, ou adição de bloqueadores dos canais de cálcio, como o verapamil e nifedipina, inibem a embriogênese somática (MAHALAKSHMI *et al.*, 2007).

Proteínas quinases dependente de cálcio/calmodulina (*CDKs* - *calcium/calmodulin-dependent protein kinases*), caracterizadas primeiramente em feijão, são diretamente ativadas pelo cálcio (HARPER *et al.*, 1991) e estão envolvidas com a segmentação da membrana durante a divisão celular. A expressão temporal do gene *swCDKs* durante o estágio globular do embrião zigótico e embrião somático, a maturação de sementes (desenvolvimento do endosperma) e germinação, indicam seu envolvimento no processo de diferenciação e desenvolvimento. O gene *swCDK* é pós-transcricionalmente inativado em embriões zigóticos durante a dormência e durante a germinação precoce da semente. Na embriogênese de sândalo, foi encontrado um aumento de quatro vezes no nível do cálcio durante a diferenciação de massas pró-embriogênicas em embriões

somáticos. Agentes quelantes inibiram a formação de embriões somáticos embora as células continuassem a proliferar, indicando que a inibição de via de sinalização mediada por cálcio envolvia proteínas CDKs e proteínas cálcio dependente relacionadas a quinases (CRKs - *calcium-dependent related kinases*) (ANIL & RAO, 2000). A expressão de mRNA e de proteínas CRKs em embriões somático de cenoura é maior do que em tecidos vegetais maduros, indicando desempenhar um papel fundamental na regulação do ciclo celular (CHUGH & KHURANA, 2002).

A MsCPK3 é uma proteína calmodulina tipo quinase (CPK - *calmodulin-like protein kinase*) que tem sido isolada de cultura de células de alfafa (DAVLETOVA et al., 2001). Ensaio de fosforilação *in vitro* revelaram a ativação dessa proteína por cálcio e inibição por antagonistas de calmodulina. A expressão do gene *MsCPK* aumenta durante a fase inicial da embriogênese somática e sua atividade não é estimulada por cinetina, ABA ou NaCl, porém a aplicação de choque térmico é capaz de induzir a expressão, sugerindo que o papel potencial de hormônios e condições de estresse reprogramam a via de desenvolvimento durante a embriogênese somática (DAVLETOVA et al., 2001).

GENES HOMEBOX (HOMEÓTICOS)

Os genes homeobox ou homeóticos foram primeiro identificados em *Drosophila* (MCGINNIS et al., 1984) e são os principais genes reguladores que controlam o padrão de formação e diferenciação morfológica em organismos multicelulares. Estes genes têm sido bem caracterizados em plantas como milho (VOLLBRECHT et al., 1991), *Arabidopsis* (SCHENA & DAVIS, 1994) e arroz (MATSUOKA et al., 1993). Os genes homeóticos contêm uma característica sequência conservada de nucleotídeos denominada de homeobox (SMOLENICKA et al., 2003).

O significado funcional dos genes homeóticos no desenvolvimento embrionário de insetos, anfíbios e mamíferos é estendido às plantas, corroborando com o mecanismo responsável pelo controle genético do desenvolvimento, sendo assim um fenômeno muito mais universal do que previsto anteriormente (CHUGH & KHURANA, 2002).

Gene *Sbh1*

O gene homeótico, *Sbh1*, tem sido identificado em embriões somáticos de soja (MA et al., 1994). A expressão do mRNA *Sbh1* é tecido específico, em que um aumento no seu nível de transcrição é observada durante a transição do estágio codiforme para o torpedo, estágio o qual ocorre a determinação da diferenciação do cotilédone e do tecido pré-vascular. Estes mRNA não são detectados em tecidos não-embriogênicos, embora caule e hipocótilo exibem uma fraca expressão (MA et al., 1994). O padrão de expressão durante a embriogênese somática indica uma regulação natural durante a biogênese vascular e com um significativo desempenho na formação do embrião somático (LINDZEN & CHOI, 1995).

Genes *CHB1-CHB6*

Os seis genes (*CHB1-CHB6*) foram identificados em embriões somáticos e hipocótilos de cenoura contendo homeobox (MEIJER et al., 1997). A expressão desses transcritos varia muito durante a embriogênese somática, tanto temporal quanto espacial, bem como em plântulas maduras (CHUGH & KHURANA, 2002). O

gene *CHB1* é expresso constantemente em grupos de células indiferenciadas, mas é notável o aumento da expressão do gene *CHB2* após o estágio globular, com um máximo no estágio codiforme e torpedo da diferenciação da embriogênese somática. A expressão do mesmo diminui drasticamente em culturas indiferenciadas. Os genes *CHB3*, *CHB4* e *CHB5* demonstraram uma acumulação preferencial em camadas de células corticais mais internas do eixo de embriões no estágio torpedo. A expressão do gene *CHB6* é restrita às células do procâmbio de embriões no estágio codiforme e torpedo. Nos cotilédones e hipocótilo embrionário de plântulas, o mRNA destes quatro genes (*CHB3-CHB6*) está intimamente associado aos tecidos vasculares (HIWATASHI & FUKUDA, 2000). Esta é uma indicação clara da participação desses genes na regulação da diferenciação dos tecidos vasculares durante o desenvolvimento embrionário (TORNERO *et al.*, 1996).

Gene *DcB1*

O gene *DcB1* foi isolado e caracterizado em grupos de células embriogênicas de cenoura e possui um domínio conservado denominado “*chromo*” (termo derivado de cromatina), sendo assim chamado de gene cromobox (KIYOSUE *et al.*, 1998). O produto gênico deste domínio é um repressor de genes homeóticos e uma proteína heterocromatina I (HP1) de *Drosophila*. A este domínio é postulada a função de ligar proteínas à cromatina. Estudos quanto à expressão diferencial de mRNA de *DcCB1* revelou um aumento da expressão durante os estágios iniciais de embriões somáticos (estádios globular e codiforme), enquanto que foram detectados baixos níveis deste transcrito no estágio torpedo do embrião somático durante a formação da semente (KIYOSUE *et al.*, 1998).

A existência de ambos os genes, homeobox e chromobox, em plantas sugere que o mecanismo de regulação dos genes do desenvolvimento vegetal pode se assemelhar ao que acontece com *Drosophila*, em que os genes homeobox são reprimidos pelo produto gênico dos genes chromobox. Além disso, a identificação dos chromobox abre caminho para o isolamento e identificação de outros genes homeóticos possivelmente reprimidos. Estudos mais aprofundados podem elucidar importantes eventos moleculares que ocorrem durante o padrão de formação do embrião vegetal (CHUGH & KHURANA, 2002).

PROTEÍNAS EXTRACELULARES

As proteínas extracelulares desempenham um significativo papel no desenvolvimento embriogênico de angiospermas (KREUGER & HOLST, 1993). Essas proteínas e as mudanças no padrão de sua expressão têm sido associadas com a indução, bem como com o início da embriogênese somática (HILBERT *et al.*, 1992).

A cultura de células de cenoura secreta uma variedade de proteínas no meio, um processo que contribui para o condicionamento do meio. O meio condicionado por sua vez, como relatado, tem efeito promotor no início da embriogênese somática. Na realidade, essas proteínas não são necessariamente secretadas pelas células embriogênicas, mas podem também serem liberadas por células não-embriogênicas (VAN ENGELEN *et al.*, 1991).

Genes *EP1*, *EP2* e *EP3*

Algumas proteínas secretadas extracelularmente são denominadas de EP (*extracellular protein*), sendo expressas por vários genes em embriões somáticos de cenoura (DE JONG et al., 1992). As proteínas EP1 são um produto gênico do gene *EP1* com homologia a glicoproteínas de Brassica S-locus, porém está presente apenas em calos não-embriogênicos e não é encontrada em embriões somáticos (CHUGH & KHURANA, 2002).

O gene *EP2* codifica proteínas de transferência de lipídios, sendo o primeiro gene isolado e caracterizado de culturas embriogênicas de cenoura, e revelou-se que esta proteína é secretada extracelularmente (STERK et al., 1991). A proteína não é apenas secretada em culturas de células embriogênicas, mas também no ápice da parte aérea, flores em desenvolvimento e sementes maduras. O gene é uniformemente expresso em massas pró-embriogênicas, enquanto que a expressão diminui em células não-embriogênicas. *EP2* pode ser expresso em camadas subepidérmicas para uma função protetora, sua localização é nas camadas protodérmicas do embrião somático e zigótico, assim *EP2* pode servir como um marcador para a detecção da embriogênese, indicando o início da diferenciação das células epidérmicas durante este processo (STERK et al., 1991). O papel exato dessas proteínas extracelulares ainda não está bem esclarecido, mas podem estar envolvidas na regulação da expansão celular e na manutenção das características biofísicas necessárias para a morfogênese (CHUGH & KHURANA, 2002).

Talvez o achado mais inesperado esteja relacionado ao produto do gene *EP3*, envolvendo uma glicoproteína secretada (EP3), em que um mutante de cenoura sensível à temperatura (ts11) sem esta glicoproteína, não consegue completar a transição de um embrião somático num estágio globular para um estágio codiforme (MEINKE, 1995). Existem pelo menos quatro genes *EP3* responsáveis por codificar isoenzimas homólogas denominadas EP3 que são secretadas extracelularmente (CHUGH & KHURANA, 2002). Estas proteínas são consideradas uma quitinase devido a sua função (DE JONG et al., 1992), descrita em células mutantes de cenoura temperatura-sensível por bloquear o desenvolvimento normal de embriões somáticos em temperaturas não adequadas (KRAGH et al., 1996). Duas dessas isoenzimas codificadas por esses genes, EP3-1 e EP3-2, tem sido purificadas e mostram sutil diferença durante a formação do embrião em culturas recém-iniciadas. A proteína EP3, contudo, não é secretada por embriões somáticos nem zigóticos, mas, expressa nas células do tegumento dos frutos e células do endosperma. Assim, esta proteína pode ter um papel de cuidado durante a embriogênese zigótica, que é imitado por células em suspensão, das quais embriões somáticos são formados (VAN HENGEL et al., 2001).

Assim, a maioria das proteínas extracelulares estudadas durante a embriogênese somática, pertencentes a uma classe de quitinases ou glucanases, não estão associadas aos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário, mas podem desempenhar um papel importante, criando condições adequadas para a indução do embrião somático e degradação da parede celular (CHUGH & KHURANA, 2002).

Gene *PgChi-1* e *PgGhu-1*

Os genes *PgChi-1* e *PgGhu-1* foram isolados de embriões somáticos de *Picea glauca*, e codificam respectivamente uma quitinase base de classe IV e uma beta-1,3-glucanase (DONG & DUNSTAN, 1997). Estes genes foram encontrados em abundância em tecidos embriogênicos, diminuindo progressivamente após o tratamento com ácido abscísico no meio de maturação, apresentando, dessa forma,

menor abundância de embriões globulares. Transcritos relacionadas com *PgGlu-1* tornaram-se abundantes novamente no início da formação de embriões cotiledonares, porém decresceram após essa fase, entretanto, as transcrições relacionadas com *PgChi-1* também foram muito abundantes no final de embriões cotiledonares e em plântulas *in vitro*. Segundo DONG & DUNSTAN (1997) os genes *PgChi-1* e *PgGlu-1*, assim como seus homólogos, podem ter um papel na defesa das plantas, e um possível papel no desenvolvimento durante a maturação de embriões somáticos.

Gene *DcAGP1*

O gene *DcAGP1* codifica uma proteína arabinogalactanas (AGP), que tem sido recentemente isolada e caracterizada em culturas de suspensão em cenoura (BALDWIN et al., 2001). Este gene codifica, dentre outros produtos, um AGP não clássico com similaridade a uma gama de proteínas encontradas na parede celular, e é também característico de PRPs (proteínas relacionadas a patogenicidade) (CHUGH & KHURANA, 2002).

Proteínas AGPs são proteoglicanos (10% proteína e mais do que 90% carboidrato) encontradas em plantas superiores e hepáticas. Essas proteínas são comumente encontradas na membrana celular, matriz celular e parede celular (SERPE & NOTHNAGEL, 1996). AGPs são exclusivas para diferentes órgãos vegetais e são específicas para estádios de desenvolvimento. Embora a função biológica de AGPs permaneça inserida, diversas hipóteses têm sido propostas, por exemplo, AGPs podem estar envolvidos na proliferação celular, na expansão celular e na regulação do desenvolvimento do embrião somático (NOTHNAGEL, 1997).

Tem sido mostrado que a presença de proteínas específicas pode estar correlacionada com a morfologia de embriões somáticos e compostos proteicos em culturas condicionadas, podendo influenciar no processo de diferenciação celular (EGERTSDOTTER et al., 1993). Técnicas imunológicas tem sido utilizadas para caracterizar AGPs associados ao desenvolvimento de embriões somáticos, além disso, essas proteínas talvez estejam envolvidas no estabelecimento do padrão de formação e iniciação da embriogênese. É possível também que AGPs estejam envolvidos no contato célula-célula, desde suas propriedades estruturais e físicas para tornar as células mais aderidas, possibilitando associação com outras macromoléculas (CHUGH & KHURANA, 2002).

GENES DE MATURAÇÃO

Durante o estágio de maturação do embrião somático há uma rápida alteração no programa de expressão gênico, em que uma variedade de genes são ativados ou ocorre a síntese “de novo” de algumas proteínas. Os genes expressos durante a maturação são específicos e tem similaridade com os genes de maturação do embrião zigótico (CHUGH & KHURANA, 2002).

Gene *Mat1*

LIU et al., (1994) estudaram a expressão do gene de maturação *Mat1*, cujo nível do transcrito aumenta com a dessecação e desaparece sobre a reidratação do embrião somático.

Gene *Dc2.15*

O gene *Dc2.15* é encontrado em embriões somáticos de cenoura e tem sua máxima expressão no estágio codiforme e torpedo (ALEITH & RICHTER, 1990).

Genes *LEA* (*Dc3*, *Dc8*, *DcEMB1*, *DcECP31* e *DcECP40*)

Durante o estágio terminal da embriogênese zigótica, bem como na maturação, há uma desidratação dramática do embrião e da semente, a qual é caracterizada pelo aumento na concentração de ABA (ácido abscísico). Ao nível molecular há uma expressão específica de genes, cujos produtos estão em abundância, que tornam as células capazes de sobreviver ao período de dessecação. Esses genes estão presentes em estádios tardios da maturação do embrião e são conhecidos como genes de proteínas abundantes na embriogênese tardia (*LEA – late embryogenesis abundant*). Todos os genes *LEA* possuem uma sequência de alta homologia e são regulados por ABA, desempenhando um papel chave na tolerância à dessecação em diferentes espécies (CHUGH & KHURANA, 2002).

A característica dos genes *LEA* é descrita pela sua indução prematura e pela sua expressão devido ao tratamento exógeno com ABA. Durante a embriogênese somática, membros gênicos *LEA* foram primeiro identificados em embriões somáticos de cenoura – *Dc3*, *Dc8*, *DcECP31*, *DcECP40*, *DcEMB1* (ZIMMERMAN, 1993). Estes genes são utilizados como marcadores moleculares da embriogênese somática, dependendo de seu padrão de expressão durante vários estádios da diferenciação do embrião somático.

O gene *Dc8* é expresso em embriões e endosperma de embriões zigóticos, e o padrão de expressão do mRNA é similar entre o embrião somático e o zigótico. Contudo, foi descoberto que a expressão de *Dc8* está associada, mas não é dependente da embriogênese somática (FRANZ *et al.*, 1989). O gene *EMB1* é expresso somente em tecidos embriogênicos durante a transição do estágio globular para o torpedo no embrião e se acumula especificamente em regiões meristemáticas. O gene *EMB1* pode estar envolvido na proteção contra desidratação durante a maturação do embrião (WURTELE *et al.*, 1993). Os genes *DcECP31* e *DcECP40* estão descritos junto com os Genes de Reposta Hormonal (no tópico “Gene *DcECP63*, *DcECP40* e *DcECP31*”) deste trabalho.

A maioria dos genes expressos diferencialmente durante a embriogênese somática pertence à família gênica *LEA*. A extensa distribuição desses genes entre os diversos seres vivos implica que podem ser primitivos, e, portanto, com importante papel devido a sua permanência no processo evolutivo (SHIH *et al.*, 2008). Como descrito, os produtos desta família de genes podem estar relacionados com uma função de osmoproteção, como defesa de estruturas celulares nos embriões maduros de sementes durante a dessecação e prevenção da germinação precoce dos embriões zigóticos durante o desenvolvimento da semente (WILDE *et al.*, 1995; DONG & DUNSTAN, 2000; SHIH *et al.*, 2008).

Genes *MsLEC1* e *MsLEC2*

Os genes *MsLEC1* e *MsLEC2* expressão lectinas, que são proteínas associadas a carboidratos e que estão presentes em microrganismo, animais e plantas. A função das lectinas vegetais ainda é desconhecida, embora tenha sido atribuída várias funções como o reconhecimento simbiótico, armazenamento de semente, defesa contra predadores e patógenos, regulação do crescimento,

mediação do reconhecimento entre pistilo e pólen e várias outros fenômenos de reconhecimento (SHARON & GOLDSTEIN, 1998).

A expressão diferencial de lectinas durante os vários estádios do desenvolvimento do embrião somático e zigótico tem sido destacada na embriogênese de alfafa, demonstrando sua importância. Embriões no estágio tardio apresentaram um aumento na acumulação de mRNAs de *MsLEC1* e *MsLEC2*, revelando um forte indício de que esses mRNAs sejam críticos para o desenvolvimento do embrião de alfafa, e sua função pode também envolver a regulação do crescimento durante a formação do padrão embriogênico (BRILL *et al.*, 2001).

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO – HEAT SHOCK PROTEINS (HSPS)

Uma série de proteínas de choque térmico (hsps – *heat shock proteins*) foram isoladas e estudadas para determinar seu padrão de expressão em embriões zigóticos. Nos embriões somáticos muitos desses genes que codificam “hsps” são expressos diferencialmente. Foi observado que tratamentos com choque térmico pode inibir transitoriamente o crescimento de embriões globulares, enquanto que em outros estádios do embrião, as mesmas condições de estresse, existe uma recuperação completa, continuando seu desenvolvimento normal (PUIGDERRAJOLS *et al.*, 2002). Os embriões globulares apresentam menor síntese e acúmulo de mRNAs “hsps” de baixo peso molecular, comparado com os outros estádios de desenvolvimento ou do que calos indiferenciados (GYÖRGYÉY *et al.*, 1991). As proteínas de choque térmico (hsps) também são expressas durante o desenvolvimento de embriões somáticos em resposta a hormônios, tais como o 2,4-D (KITAMIYA *et al.*, 2000).

Gene *Mshsp18*

Os genes *Mshsp18-1* e *Mshsp18-2* foram isolados de culturas de células em suspensão de alfafa, ambos codificam pequenas “hsps” (GYÖRGYÉY *et al.*, 1991). Os mRNAs de *Mshsp18* não são detectados em raiz ou tecidos foliares, baixos níveis podem ser encontrados em suspensão de microcalos (MCS – *microcallus suspension*), porém um alto nível desse mRNA também foi detectado em embriões somáticos derivados de MCS. O nível de transcrição de *Mshsp18* pode ser aumentado pela elevação da temperatura, tratamento com CdCl₂ (cloreto de cádmio) e choque osmótico em cultura de células (GYÖRGYÉY *et al.*, 1991). Estes estudos unidos indicam que “hsps” podem ter um papel específico durante as mudanças no desenvolvimento de células vegetais (CHUGH & KHURANA, 2002).

Gene *Dchsp1*

O gene denominado *Daucus carota heat-shock protein 1* (*Dchsp-1*), está relacionado a proteínas de choque térmico com baixo peso molecular e foi descoberto por ser expresso durante o desenvolvimento do embrião de cenoura (CHUGH & KHURANA, 2002).

Dchsp-1 exibe constante expressão durante o desenvolvimento de embriões somáticos, tem sido isolado e caracterizado a partir de hipocótilos de cenoura induzidos por auxina, sendo, portanto um dos genes induzidos por auxinas. Este gene é capaz de responder a outros hormônios e a condições de estresse, tais como

metais pesados e altas concentrações de citocininas, descritas como indutoras da embriogênese somática (KITAMIYA *et al.*, 2000).

PROTEÍNAS DE GERMINAÇÃO (GERMINAS – GERMINS)

Os genes de germinação foram primeiramente descritos durante a germinação de trigo e expressam proteínas de regulação do desenvolvimento (PATNAIK & KHURANA, 2001). Estas proteínas se ligam iônicamente à parede celular tornando as células resistentes à desnaturação e a proteases, possuindo atividade enzimática de oxalato oxidase (catalisa a oxidação do ácido oxálico a dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio) conferindo um papel no desenvolvimento e respostas de defesa vegetal (SEGARRA *et al.*, 2003).

Proteínas do tipo *germin* desempenham um papel significativo durante a embriogênese somática e zigótica (PATNAIK & KHURANA, 2001). O nível de transcrição de genes que codificam as proteínas *germins* é aumentado pelo estímulo hormonal de auxinas, como o 2,4-D (BERNA & BERNIER, 1999).

Gene *PcGER1*

PcGER1 foi o primeiro gene que expressa *germins* isolado, sequenciado e caracterizado em embriões somáticos de pinho-do-caribe (*Pinus caribaea*), é expresso em embriões somaticamente quiescente e embriões zigóticos ativos dessa espécie e está ausente em todas as células não embriogênicas, bem como no gametófito feminino. A detecção de proteínas do tipo *germin* ligadas ionicamente à parede celular do embrião somático pré-globular de pinho do caribe, e não nos calos não embriogênicos, possibilita seu uso como um marcador molecular da embriogênese somática. Isto também indica que *germins* podem estar envolvidas na iniciação e terminação da expansão da parede celular durante a embriogênese somática (NEUTELINGS *et al.*, 1998).

MUTANTES ZIGÓTICOS

Pesquisas com mutantes tem aumentado grandemente a compreensão da atividade funcional de numerosos genes que não puderam ser investigados por outras técnicas. Mutações em genes que regulam o desenvolvimento floral ou o desenvolvimento do embrião e o padrão de formação têm sido estudadas e tem ajudado significativamente na identificação de várias classes de genes específicos (CHUGH & KHURANA, 2002).

Esta estratégia torna mais fácil a compreensão dos acontecimentos relacionados à embriogênese zigótica. Várias classes diferentes de mutantes embrionários foram identificadas em plantas superiores. Muitos mutantes são defeituosos nos estádios iniciais da divisão celular e na morfogênese, outros não conseguem acumular pigmentos e substâncias de reserva durante a maturação, ou ainda são interrompidos no processo de dormência e germinação (MORDHORST *et al.*, 2002). Normalmente a falta dos produtos gênico de muitos mutantes não é inicialmente essencial para o desenvolvimento embrionário, mas sim, os torna susceptíveis a deficiência em genes com função de limpeza (*housekeeping*). Embora esta informação possa ser desencorajadora para os biólogos do desenvolvimento, o interessante é encontrar genes que desempenham um papel direto na regulação da embriogênese vegetal (CHUGH & KHURANA, 2002).

Mutantes embrionários diferem no local inicial da ação gênica. O defeito primário em alguns mutantes embrionários é limitado aos tecidos do endosperma, sendo o desenvolvimento do embrião desses mutantes muitas vezes alterado indiretamente em consequência ao defeito do endosperma (BERGER, 1999). Embora os estudos mais extensos com mutantes embrionários tenham sido realizados com milho e *Arabidopsis thaliana*, foram também descritos mutantes em cevada, cenoura, arroz e ervilhas (CASTLE *et al.*, 1993). A maioria destas mutações recessivas de perda de função foram induzidas por agentes mutagênicos químicos, raios X, elementos transponíveis, ou T-DNA via *Agrobacterium tumefaciens* (MEINKE, 1995).

Mutante *clv* (*clavata*)

A partir do meristema apical aumentado da parte aérea do mutante *clavata* (*clv*) obteve-se grupos de células embriogênicas, especula-se que este fato aumenta o número de células meristemáticas e facilita a criação de embriões somáticos (CHUGH & KHURANA, 2002).

Em contrapartida, MORDHORST *et al.*, (2002) relataram que culturas de células embriogênicas podem ser obtidas sem o meristema apical aumentado da parte aérea, a partir dos mutantes *stm* (*shoot meristem less*), *wus* (*wuschel*) e *zll/pinh* (*zwiller/pinhead*).

Mutante *lec* (*leafy cotyledon*)

Os genes *LEC* (*LEAFY COTYLEDON*), *LEC1* e *LEC2*, tem sido envolvidos na regulação embriogênica durante o estágio inicial e tardio do desenvolvimento embrionário. Estes genes tem efeito pleiotrópico e são requeridos para um desenvolvimento normal durante a morfogênese, bem como nos estádios de maturação (MEINKE *et al.*, 1995). Durante a embriogênese inicial, os genes *LEC* são requeridos para a suspensão específica de células e para identificar os cotilédones, e são necessários durante o estágio de maturação para aquisição de tolerância a dessecação e expressão de vários genes de maturação específicos. Assim, genes *LEC* desempenham um papel central no controle de vários aspectos da embriogênese zigótica e podem funcionar como reguladores da morfogênese conferindo competência embriogênica as células (LOTAN *et al.*, 1998). REIDT *et al.*, (2000) sugerem que esse genes estão envolvidos no estabelecimento de um ambiente celular, promovendo coordenação do desenvolvimento do embrião na morfogênese e nos estádios de maturação.

Mutante *pk1* (*pickle*)

Outro mutante interessante é o *pickle* (*pk1*) de *Arabidopsis* que não reprime as características embrionárias, exibindo características embriogênicas após a germinação. As raízes primárias do mutante *pk1* algumas vezes não conseguem se desenvolver normalmente após a germinação, e ao invés disso, exibem diferenciação embrionária caracterizada pela expressão gênica de proteínas de estoque da semente e acumulação de grandes quantidades de lipídios neutros (OGAS *et al.*, 1997).

Mutante *stm* (*shoot meristem less*)

Os mutantes *stm* (*shoot meristem less*), *wus* (*wuschel*) e *zll/pnh* (*zwille/pinhead*) são considerados deficientes embriogênicos no meristema apical da parte aérea, sendo denominados de SAM (*shoot apical meristem*).

O mutante *stm* (*shoot meristem less*) mostra funcionamento defeituoso ou ausência do meristema apical da parte aérea em embriões maduros. Assim, embriões zigóticos mutantes em desenvolvimento são uma importante ferramenta genética que facilitam o entendimento de mecanismos que regulam a morfogenética e eventos de diferenciação embrionário (SCHRICK *et al.*, 2000).

Mutante *wus* (*wuschel*)

Os genes homeobox *wuschel* (*wus*) e *shoot meristem less* (*stm*) codificam dois reguladores da formação e manutenção do meristema em *Arabidopsis*, mas sua interação no meristema ainda não está totalmente esclarecida (LENHARD *et al.*, 2002).

LENHARD *et al.*, (2002) sugerem que *wus* e *stm* participam no meristema apical de maneira diferenciada, *wus* especificando um subconjunto de células no centro do meristema, enquanto *stm* é necessário para suprimir a diferenciação em toda a cúpula do meristema, permitindo, assim, que células geradas sejam novamente divididas antes de serem determinadas.

Mutante *zll/pnh* (*zwille/pinhead*)

Embriões e plântulas mutante *zll/pnh*, em contraste com os mutantes *stm* e *wus*, podem iniciar, pós-embrionicamente, brotos adventícios completamente funcionais decorrentes dos meristemas presentes nos nós cotiledonares, capazes de formar uma planta normal e fértil (LYNN *et al.*, 1999).

Segundo MORDHORST *et al.*, (2002) o produto do gene *zll/pnh* é especificamente necessário para a formação de um embrião funcional e não para manutenção da função do meristema ou estabelecimento pós-embrionário (organogênese).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, tem havido uma adequação para combinar as ferramentas da biologia molecular com o poder da genética. Futuras pesquisas no ramo da biologia molecular vegetal não estarão apenas voltadas para o simples isolamento e caracterização de um grande número de genes expressos durante o desenvolvimento embrionário vegetal, mas também na determinação do significado biológico destes genes, demonstrando o que acontece quando sua função é interrompida. Isso pode ser realizado pela criação de plantas transgênicas que expressem uma construção antítese ou pelo trabalho com genes que já foram interrompidos pela perda de função por mutação (MEINKE, 1995).

A estratégia geral na análise genética é a utilização de mutantes como marcadores de linhagens celulares ou como veículos para a identificação de genes essenciais. A análise genética tem desempenhado um papel cada vez mais importante em recentes estudos no desenvolvimento vegetal. No entanto, nem todos os genes podem ser identificados facilmente pelas mutações recessivas de perda de função. Genes que estão duplicados no genoma, genes que são necessários para os estádios iniciais da gametogênese, e genes que desempenham funções redundantes, não essenciais, ou detectáveis somente em circunstâncias únicas,

geralmente, escapam da detecção na leitura de mutantes. O poder da genética não está voltado para a identificação de cada unidade de transcrição no genoma, mas sim permite focar os genes que devem ser expressos para o crescimento e desenvolvimento normal do indivíduo (MEINKE, 1995).

REFERÊNCIAS

ALEITH, F.; RICHTER, G. Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. **Planta**, v. 183, p. 17-24, 1990.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y., (ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, p. 82-123, 1983.

ANIL, V. S.; RAO, K. S. Calcium-mediated signaling during sandalwood somatic embryogenesis: role for exogenous calcium as second messenger. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1301-1311, 2000.

BALDWIN, T. C.; DOMINGO, C.; SCHINDLER, T.; SEETHARAMAN, G.; STACEY, N.; ROBERTS, K. DcAGP1, a secreted arabinogalactan protein, is related to a family of basic proline-rich proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 421-435, 2001.

BALESTRAZZI, A.; BERNACCHIA, G.; PITTO, L.; LUCCARNI, G.; CARBONERA, D. Spatial expression of DNA topoisomerase I genes during cell proliferation in *Daucus carota*. **European Journal of Histochemistry**, v. 45, p. 31-38, 2001.

BARROS, L. M. Embriogênese somática. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 7, p. 36-39, 1999.

BERGER, F. Endosperm development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 28-32, 1999.

BERNA, A.; BERNIER, F. Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, an H₂O₂ producing enzyme. **Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 539-549, 1999.

BONACIN, G. A.; DI MAURO, A. O.; OLIVEIRA, R. C.de; PERECIN, D. Induction of somatic embryogenesis in soybean: physicochemical factors influencing the development of somatic embryos. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 865-868, 2000.

BRILL, L. M.; EVANS, C. J.; HIRSCH, A. M. Expression of *MsLEC1*- and *MsLEC2*-antisense genes in alfalfa plant lines causes severe embryogenic, developmental and reproductive abnormalities. **The Plant Journal**, v. 25, p. 453-461, 2001.

CASTLE, L. A.; ERRAMPALLI, D.; ATHERTON, T. L.; FRANZMANN, L. H.; YOON, E. S.; MEINKE, D. W. Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. **Molecular and General Genetics**, v. 241, p. 504-514, 1993.

CHE, P.; LOVE, T. M.; FRAME, B. R.; WANG, K.; CARRIQUIRY, A. L.; HOWELL, H. Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. **Plant Molecular Biology**, v. 62, p. 1-14, 2006.

CHRISTIANSON, M. L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A. (ed.). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum Press, p. 83-103, 1985.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, v. 23, p. 515-519, 1988.

CHUGH, A.; KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis. **Current Science**, v. 83, n. 6, p. 715-730, 2002.

DAVLETOVA, S.; MÉSZÁROS, T.; MISKOLCZI, P.; OBERSCHALL, A.; TÖRÖK, K.; MAGYAR, Z.; DUDITS, D.; DEÁK, M. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 355, p. 215-221, 2001.

DE JONG, A. J.; CORDEWENER, J.; SCHIAVO, F. L.; TERZI, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S. C. A Carrot Somatic Embryo Mutant Is Rescued by Chitinase. **The Plant Cell**, v. 4, n. 4, p. 425-433, 1992.

DE KLERK, G.; SCHMITT, B. A.; LIEBEREI, R.; NEUMANN, K. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. **Biologia Plantarum**, v. 39, p. 53-66, 1997.

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

DONG, J. Z.; DUNSTAN, D. I. Endochitinase and beta-1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. **Planta**, v. 201, n. 2, p. 189-194, 1997.

DONG, J.-Z.; DUNSTAN, D. I. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In: JAIN, S. M.; MINOCHA, S. C. (eds.). **Molecular biology of woody plants**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, v. 1, p. 51-87, 2000.

DUBLIN, P. **Café Cacao Thé**. n. 25, p. 237-242, 1981.

DUBLIN, P. **Café Cacao Thé**. n. 28, p. 231-244, 1984.

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

DURZAN, D. J. Nitrogen metabolism and vegetative propagation of forest trees. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (ed.). **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p. 256-324, 1985.

EGERTSDOTTER, U.; MO, L. H.; VON ARNOLD, S. Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*). **Physiologia Plantarum**, v. 88, p. 315-321, 1993.

EZHOVA, T.A. Genetic control of totipotency of plant cells in an *in vitro* culture. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 34, p. 197-204, 2003.

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

FRANZ, G.; HATZOPOULOS, P.; JONES, T. J.; KRAUSS, M.; SUNG, Z. R. Molecular and genetic analysis of an embryonic gene, *DC 8*, from *Daucus carota* L. **Molecular and General Genetics**, v. 218, p. 143-151, 1989.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 32, p. 272-289, 1996.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, v. 2, p. 537-548, 1999.

GYÖRGYÉY, J.; GARTNER, A.; NÉMETH, K.; MAGYAR, Z.; HIRT, H.; HEBERLE-BORS, E.; DUDITS, D. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, v. 16, p. 999-1007, 1991.

HAGEN, G.; KLEINSCHMIDT, A.; GUILFOYLE, T. Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. **Planta**, v. 162, p. 147-153, 1984.

HARPER, J. F. Dissecting calcium oscillators in plant cells. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 395-397, 2001.

HARPER, J. F.; SUSSMAN, M. R.; SCHALLER, G. E.; PUTNAM-EVANS, C.; CHARBONNEAU, H.; HARMON, A. C. A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. **Science**, v. 252, p. 951-954, 1991.

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

HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v. 79, p. 45-58, 1994.

HIGASHI, K.; SHIOTA, H.; KAMADA, H. Patterns of expression of the genes for glutamine synthetase isoforms during somatic and zygotic embryogenesis in carrot. **Plant Cell Physiology**, v. 39, p. 418-424, 1998.

HILBERT, J. L.; DUBOIS, T.; VASSEUR, J. Detection of embryogenesis related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 30, p. 733-741, 1992.

HIWATASHI, Y.; FUKUDA, H. Tissue-specific localization of mRNA for carrot homeobox genes, CHBs. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, p. 639-643, 2000.

HOVEMANN, B.; RICHTER, S.; WALLDORF, U.; CZIEPLUCH, C. Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 alpha (EF-1alpha) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 3175-3194, 1988.

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

KAPROS, T.; BÖGRE, L.; NÉMETH, K.; BAKÓ, L.; GYÖRGYÉY, J.; WU, S. C.; DUDITS, D. Differential Expression of Histone H3 Gene Variants during Cell Cycle and Somatic Embryogenesis in Alfalfa. **Plant Physiology**, v. 98, n. 2, p. 621-625, 1992.

KAWAHARA, R.; KOMAMINE, A. Molecular basis of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed**. Berlin: Springer-Verlag, p. 30-40, 1995.

KAWAHARA, R.; SUNABORI, S.; FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. A gene expressed preferentially in the globular stage of somatic embryogenesis encodes elongation-factor 1 alpha in carrot. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, n. 1, p. 157-162, 1992.

KERBAUY, G. B. Competência e Determinação Celular em Cultura de Células e Tecidos de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, v. 2, p. 519-528, 1998.

KISELEV, K. V.; TURLENKO, A. V.; ZHURAVLEV, Y. N. CDPK gene expression in somatic embryos of *Panax ginseng* expressing rolC. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 141-149, 2009.

KITAMIYA, E.; SUZUKI, S.; SANO, T.; NAGATA, T. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 551-557, 2000.

KIYOSUE, T.; SHIOTA, H.; HIGASHI, K.; KAMADA, K.; SHINOZAKI, K. A chromo box gene from carrot (*Daucus carota* L.): its cDNA structure and expression. during somatic and zygotic embryogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1398, n. 1, p. 42-46, 1998.

KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIMURA, A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell culture. *Physiology*,

biochemistry and molecular biology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 28, p. 11-14, 1992.

KRAGH, K. M.; HENDRICKS, T.; DE JONG, A. J.; LO SCHIAVO, F.; BUCHERNA, N.; HOJRUP, P.; MIKKELSEN, J. D.; DE VRIES, S. C. Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature sensitive carrot variant *ts11*. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 631-645, 1996.

KREUGER, M.; HOLST, G. J. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. **Planta**, v. 189, p. 243-248, 1993.

KRIKORIAN, A. D.; O'CONNOR, S. A.; FITTER, M. S.; Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and cultures derived plants. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y., (ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, p. 541-581, 1983.

LELJAK-LEVANIC, D.; BAUER, N.; MIHALJEVIC, S.; JELASKA, S. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 120-127, 2004.

LENHARD, M.; JÜRGENS, G.; LAUX, T. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. **Development**, v. 129, p. 3195-3206, 2002.

LINDZEN, E.; CHOI, J. H. A carrot cDNA encoding an atypical protein kinase homologous to plant calcium-dependent protein kinases. **Plant Molecular Biology**, v. 28, p. 785-797, 1995.

LITZ, C. Application of tissue culture to tropical fruits. In: GREEN, C.C.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W.P.; BIESBOER, D.D. (ed.). **Plant Tissue and Cell Culture**. New York: Allan R. Liss, p. 407-418, 1987.

LIU, W.; HILDEBRAND, D. F.; MOORE, P. J.; COLLINS, G. B. Expression of desiccation induced and lipoxygenase genes during the transition from the maturation to the germination phases in soybean somatic embryos. **Planta**, v. 194, p. 69-76, 1994.

LOTAN, T.; OHTO, M.; YEE, K.; WEST, M.; LO, R.; KWONG, R.; YAMAGISHI, K.; FISCHER, R.; GOLDBERG, R.; HARADA, J. J. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. **Cell**, v. 93, p. 1195-1205, 1998.

LYNN, K.; FERNANDEZ, A.; AIDA, M.; SEDBROOK, J.; TASAKA, M.; MASSON, P.; BARTON, M. The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. **Development**, v. 126, p. 469-481, 1999.

MA, H.; MCMULLEN, M. D.; FINER, J. J. Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development. **Plant Molecular Biology**, v. 24, n. 3, p. 465-473, 1994.

MAHALAKSHMI, A.; KHURANA, P. Agrobacterium - mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 55-59, 1995.

MAHALAKSHMI, A.; SINGLA, B.; KHURANA, J. P.; KHURANA, P. Role of calcium-calmodulin in auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* var. HD 2329). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 88, p. 167-174, 2007.

MASHAYEKHI, K.; SHARIFANI, M.; SHAHSAVAND, M.; KALATI, H. Induction of somatic embryogenesis in absence of exogenous auxin in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **International Journal of Plant Production**, v. 2, p. 163-166, 2008.

MATSUOKA, M.; ICHIKAWA, H.; SAITO, A.; TADA, Y.; FUJIMURA, T.; KANOMURAKAMI, Y. Expression of a Rice Homeobox Gene Causes Altered Morphology of Transgenic Plants. **The Plant Cell**, v. 5, n. 9, p. 1039-1048, 1993.

MCGINNIS, W.; LEVINE, M. S.; HAFEN, E.; KUROIWA, A.; GEHRING, W. J. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and bithorax complexes. **Nature**, v. 308, n. 5958, p. 428-433, 1984.

MEIJER, A. H.; SCARPELLA, E.; VAN DIJK, E. L.; QIN, L.; TAAL, A. J. C.; RUEB, S.; HARRINGTON, S. E.; MCCOUCH, S. R.; SCHILPEROORT, R. A.; HOGE, J. H. C. Transcriptional repression by Oshox1, a novel homeodomain leucine zipper protein from rice. **The Plant Journal**, v. 11, p. 263-276, 1997.

MEINKE, D. W. Molecular Genetics of Plant Embryogenesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 369-394, 1995.

MORDHORST, A. P.; HARTOG, M. V.; EL TAMER, M. K.; LAUX, T.; DE VRIES, S. C. Somatic embryogenesis from *Arabidopsis* shoot apical meristem mutants. **Planta**, v. 214, p. 829-836, 2002.

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

NEUTELINGS, G.; DOMON, J. M.; MEMBRÉ, N.; BERNIER, F.; MEYER, Y.; DAVID, A.; DAVID, H. Characterization of a germin-like protein gene expressed in somatic and zygotic embryos of pine (*Pinus caribaea* Morelet). **Plant Molecular Biology**, v. 38, p. 1179-1190, 1998.

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

NOTHNAGEL, E. A. Proteoglycans and related components in plant cells. **International Review of Cytology**, v. 174, n. 195-291, 1997.

OGAS, J.; CHENG, J. C.; SUNG, Z. R.; SOMERVILLE, C. Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. **Science**, v. 277, p. 91-94, 1997.

OVERVOORDE, P. J.; GRIMES, H. D. The role of calcium and calmodulin in carrot somatic embryogenesis. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, p. 135-144, 1994.

PADMANABHAN, K.; CANTLIFFE, D. J.; KOCH, K. E. Auxin-regulated gene expression and embryogenic competence in callus cultures of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 187-192, 2001.

PATNAIK, D.; KHURANA, P. Germins and germin like proteins: an overview. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, p. 191-200, 2001.

PUIGDERRAJOLS, P.; JOFRÉ, A.; MIR, G.; PLA, M.; VERDAGUER, D.; HUGUET, G.; MOLINAS, M. Developmentally and stress-induced small heat shock proteins in cork oak somatic embryos. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 373, p. 1445-1452, 2002.

RAGHAVAN, V. (ed.). **Molecular Embryology of Flowering Plants**. New York: Cambridge University Press, p. 467-499.1997.

RAO, K. S. Embryogenesis in flowering plants: Recent approaches and prospects. **Journal of Biosciences**, v. 21, n. 6, p. 827-841, 1996.

REIDT, W.; WOHLFARTH, T.; ELLERSTROM, M.; CZIHAL, A.; TEWES, A.; EZCURRA, I.; RASK, L.; BAUMLEIN, H. Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the FUS3 gene product. **The Plant Journal**, v. 21, p. 401-408, 2000.

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

SANTIAGO, E. J. A. de. **Caracterização Morfológica e Bioquímica de Calos de Pimenta Longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. Lavras: UFLA, 2003. 183 p. Tese (Doutorado).

SATO, S.; TOYA, T.; KAWAHARA, R.; WHITTIER, R. F.; FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. Isolation of a carrot gene expressed specifically during early stage somatic embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, v. 28, p. 39-46, 1995.

SCHENA, M.; DAVIS, R. W. Structure of homeobox-leucine zipper genes suggests a model for the evolution of gene families. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, n. 18, p. 8393-8397, 1994.

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

SCHRICK, K.; MAYER, U.; HORRICH, A.; KUHN, C.; BELLINI, C.; DANGL, J.; SCHMIDT, J.; JURGENS, G. FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. **Genes & Development**, v. 14, p. 1471-1484, 2000.

SEGARRA, C. I.; CASALONGUÉ, C. A.; PINEDO, M. L.; RONCHI, V. P.; CONDE, R. D. A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 386, p. 1335-1341, 2003.

SERPE, M.D.; NOTHNAGEL, E. A. Heterogeneity of arabinogalactan-proteins on the plasma membrane of rose cells. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1261-1271, 1996.

SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. Lectins: More than insecticides. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1049, 1998.

SHEEN, J. Ca²⁺-Dependent Protein Kinases and Stress Signal Transduction in Plants. **Science**, v. 274, n. 5294, p. 1900-1902, 1996.

SHIH, M.-D.; HOEKSTRA, F. A.; HSING, Y.-I. C. Late Embryogenesis Abundant Proteins. **Advances in Botanical Research**, v. 48, p. 211-255, 2008.

SMOLENICKA, Z.; PANI, F.; HWANG, K. J.; GRUSCHUS, J. M.; FERRETTI, J. A. Sequence of a conserved region of a new sea urchin homeobox gene from the NK family. **Cell Biology International**, v. 27, n. 2, p. 81-87, 2003.

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

SÖNDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W. R. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. P.; HOLLAENDER, A. (ed.). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum Press, p. 215-232. 1985.

SONDAHL, M.R.; MONACO, L.C. In vitro methods applied to coffee. In: THORPE, T.A. (ed.). **Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture**. New York: Academic Press, p. 325-47. 1981.

SOPORY, S. K.; MUNSHI, M. Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signaling in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 245-318, 1998.

STERK, P.; BOOIJ, H.; SCHELLEKENS, G. A.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S. C.; Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. **The Plant Cell**, v. 3, p. 907-921, 1991.

SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Differential gene expression during somatic embryogenesis. In: MUJIB, A.; SAMAJ, J. (eds.). **Somatic Embryogenesis, Plant Cell Monographs**. Berlin: Springer-Verlag, v. 2, p. 305-320. 2005.

TABAEIZADEH, Z. Drought-induced responses in plant cells. **International Review of Cytology**, v. 182, p. 193-247, 1998.

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

THEOLOGIS, A. Rapid gene regulation by auxin. **Annual Review of Plant Biology**, v. 37, p. 407-438, 1986.

THOMAS, C.; JIMÉNEZ, V. M. Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. In: MUJIB, A.; SAMAJ, J. (eds.). **Somatic Embryogenesis, Plant Cell Monographs**. Berlin: Springer-Verlag, v. 2, p. 157-175.2005.

THOMAS, C.; MEYER, D.; HIMBER, C.; STEINMETZ, A. Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 35-42, 2004.

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, p. 1275-1283, 1979.

TORNERO, P.; CONEJERO, V.; VERA, P. Phloem-specific expression of a plant homeobox gene during secondary phases of vascular development. **The Plant Journal**, v. 9, p. 639-648, 1996.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, v. 1, p. 261-269.1998.

VAN ENGELLEN, F. A.; STERK, P.; BOOIJ, H.; CORDEWENER, J. H. G.; ROOK, W.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S. C. Heterogeneity and cell type-specific localization of a cell wall glycoprotein from carrot suspension cells. **Plant Physiology**, v. 96, p. 705-712, 1991.

VAN HENGEL, A. J.; TADESSE, Z.; IMMERZEEL, P.; SCHOLS, H.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S. C. N-Acetylglucosamine and Glucosamine-Containing Arabinogalactan Proteins Control Somatic Embryogenesis. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1880-1890, 2001.

VASIL, V.; VASIL, I. K. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from inflorescences of *Pennisetum americanum* (pearl millet, Gramineae). **American Journal of Botany**, v. 69, p. 1441-1449, 1982.

VENDRAME, W. A. **Embriogênese Somática em *Pinus taeda* L.** 1994. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1994.

VOLLBRECHT, E.; VEIT, B.; SINHA, N.; HAKE, S. The developmental gene Knotted-I is a member of maize homeobox gene family. **Nature**, v. 350, n. 3615, p. 241-243, 1991.

VYSKOT, B.; GAZDOVA, B.; SIROKY, J. Methylation patterns of two repetitive DNA sequences in tobacco tissue cultures and their regenerants. **Biolgia Plantarum**, v. 35, n. 3, p. 321-327, 1993.

WALKER, J. C.; KEY, J. L. Isolation of cloned cDNAs to auxin-responsive poly(A)+RNAs of elongating soybean hypocotyl. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 79, p. 7185-7189, 1982.

WILDE, H.D.; SEFFENS, W.S.; THOMAS, T.L. Gene expression in somatic embryos. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin: Springer-Verlag, v. 30, p. 41-52.1995.

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, v. 57, p. 443-462, 1986.

WURTELE, E. S.; WANG, H.; DURGERIAN, S.; NIKOLAU, B. J.; ULRICH, T. H. Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiology*, v. 102, n. 1, p. 303–312, 1993.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia Molecular Básica*. 3ª ed. Porto Alegre, Editora Mercado Aberto, 2003.

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