

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

**TAINA SORAIA MÜLLER**

**FISIOLOGIA E METABOLISMO DA EMBRIOGENESE SOMÁTICA E ZIGÓTICA**  
**DE *Acca sellowiana* (Berg) Burret (MYRTACEAE)**

**Florianópolis**  
**Santa Catarina – Brasil**  
**2008**

**TAINA SORAIA MÜLLER**

**FISIOLOGIA E METABOLISMO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ZIGÓTICA  
DE *Acca sellowiana* (Berg) Burret (MYRTACEAE)**

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.

**Florianópolis  
Santa Catarina – Brasil  
2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Müller, Taina Soraia

Fisiologia e Metabolismo da Embriogênese somática e zigótica de *Acca Sellowiana* (Berg) Burret (Myrtaceae)  
Florianópolis, UFSC – 2008

92f. : il., tabs.

Orientador: Miguel Pedro Guerra

Dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

1. *Acca sellowiana* 2. Fisiologia do desenvolvimento 3. Embriogênese somática e zigótica 4. Proteoma. Título

*“Se não consegue evitar a irritação, use o silêncio”.*

Chico Xavier

*“Hoje relaxo completamente, sabendo que estou fazendo a coisa certa, no tempo e no lugar certo”.*

Louise Hay

*Aos meus queridos pais, Rose e França, por tudo.  
E ao meu amor, Eduardo, por ser além de tudo, amigo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e pelo poder da sapiência.

À Universidade Federal de Santa Catarina, e ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela oportunidade.

Ao Professor Miguel Pedro Guerra, pela magnífica orientação, paciência e confiança em me aceitar em seu grupo de trabalho, e pelos conhecimentos e valores profissionais e pessoais transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Jean Pierre Ducroquet, pelos ensinamentos a respeito da goiabeira-serrana, e pelo apoio nos trabalhos realizados na Estação Experimental da Epagri de São Joaquim. E à todos os funcionários da Estação pela gentileza com que me receberam durante os trabalhos.

À Professora Eny Floh, do Instituto de Biociências da USP, por disponibilizar espaço e equipamentos em seu Laboratório para realização de análises, e principalmente à Amanda Macedo, pela atenção e imensa ajuda durante os procedimentos.

Ao Professor Hernán Terenzi, por todas as contribuições para que os trabalhos pudessem ser realizados da melhor forma possível, pela paciência e atenção.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelos conhecimentos e experiências compartilhados com dedicação, e pela participação na minha formação profissional e pessoal. E à Secretária Bernadete pela paciência e eficiência quando precisei de seu auxílio.

À Suzana Stefanello, por despertar em mim o amor pela pesquisa da biologia vegetal, me apoiando quando preciso, me incentivando e ajudando sempre, pela amizade sincera e carinho.

Agradeço à Dra. Maguida Fabiana da Silva, por ter me acolhido em sua casa, sem ao menos me conhecer. Obrigada pela confiança e amizade.

Agradeço à Gabriela Claudia Cangahuala-Inocente, por todo conhecimento passado à mim com paciência e dedicação.

Aos meus pais Rose e França, por terem apostado em mim e feito tudo com muito amor para que eu chegasse até aqui, e por me apoiarem em todas as minhas decisões, que mesmo com as dificuldades pensaram em mim antes de pensarem em si mesmos.

Ao meu marido, companheiro e amigo, Eduardo, pelo amor, incentivo e compreensão incondicionais. E aos seus pais José e Eunice, por terem me dado força e carinho sempre e

principalmente nos momentos que mais precisei, talvez os mais difíceis de minha vida e por terem me acolhido em sua família como filha.

À Maria Luisa Peixoto e ao Lírio Luiz Dal Vesco, pela amizade conquistada, pela ajuda nos momentos de aflição e dúvidas e pelas boas risadas compartilhadas.

À Clarissa Caprestano e Priscila Lemos, por todas as vezes que me ajudaram a solucionar os imprevistos do trabalho.

À grande equipe do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética vegetal, Allan Claumann, Maria Carolina, Sarah Agapito, Daniel Holderbaum, Daniela Schmitz, Karine dos Santos, Josiane Ribolli, Gustavo Klabunde, Leila, Aninha e Jhefferson pelos bons momentos de trabalho e descontração vividos no laboratório, principalmente à Leon Bizzochi, e Aline pela colaboração em alguns experimentos.

Aos meus inicialmente colegas de Mestrado e agora amigos, Taciane Finatto, Samantha Fillipon, Diogo Klock, Cristiane Krieck, André Bendler, Eliziane Scariot, Manuela Wiessbauer, pelos momentos de angústia e alegria compartilhados e pelo companheirismo e ajuda em todos os momentos, dentro e fora da Universidade.

À minha amiga Madelen Herrera Perdomo, pela amizade eterna, pelas explicações e ensinamentos de estatística, pelas brincadeiras, lágrimas e experiências trocadas e por ser amiga de verdade sempre, longe ou perto.

Às minhas amigas, Vanessa Antes, Glauciane Pasa, Leila Machado, Rosangela da Silva, Nittaly Carolina, Nandi Santos, Simone Guerra, Fernanda Diel e à minha Irmã Tanara, que mesmo estando longe, sempre me deram força e alegria pra continuar.

*Existem pessoas que convivem anos conosco e pouco representam. Outras, ao contrário, surgem em nosso caminho e sem que se espere, gravam o nome em nossa existência.*

*Obrigada por serem as pessoas que fazem parte da minha existência.*

## SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>v</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>vi</b>
<b>I-INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
Referências bibliográficas	9
<b>II-OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO 1- Efeito do Fluridone na germinação <i>in vitro</i> de embriões somáticos de <i>Acca sellowiana</i>.</b>	
<b>Resumo</b>	<b>18</b>
<b>Abstract</b>	<b>19</b>
<b>1-Introdução</b>	<b>20</b>
<b>2-Material e Métodos</b>	<b>23</b>
2.1-Material Vegetal	23
2.2-Embriogênese somática	23
2.3-Efeito do Fluridone na conversão dos embriões somáticos	23
<b>3-Resultados</b>	<b>25</b>
<b>4-Discussão</b>	<b>27</b>
<b>5-Referências Bibliográficas</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 2- Níveis endógenos de AIA/ABA e Poliaminas em sementes de <i>Acca sellowiana</i> oriundas de diferentes tipos de polinização.</b>	
<b>Resumo</b>	<b>34</b>
<b>Abstract</b>	<b>35</b>
<b>1-Introdução</b>	<b>36</b>
<b>2-Material e Métodos</b>	<b>38</b>
2.1-Material Vegetal	38
2.2-Quantificação de ABA, AIA e Poliaminas	38
2.2.1-ABA e AIA	38
2.2.2-Poliaminas	39
<b>3-Resultados</b>	<b>41</b>
3.1-ABA e AIA	41
3.2-Poliaminas	45
<b>4-Discussão</b>	<b>49</b>
4.1-ABA e AIA	49



4.2-Poliaminas	51
<b>5-Referências Bibliográficas</b>	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO 3- Fenóis totais em sementes de <i>Acca sellowiana</i> em diferentes estágios de desenvolvimento e oriundas de diferentes tipos de polinização.</b>	
<b>Resumo</b>	<b>61</b>
<b>Abstract</b>	<b>62</b>
<b>1-Introdução</b>	<b>53</b>
<b>2-Material e Métodos</b>	<b>66</b>
2.1-Material Vegetal	66
2.2-Quantificação de ABA, AIA e Poliaminas	66
<b>3-Resultados</b>	<b>67</b>
<b>4-Discussão</b>	<b>69</b>
<b>5-Referências Bibliográficas</b>	<b>72</b>
<b>CAPÍTULO 4- Perfil protéico de culturas embriogênicas e não-embriogênicas de <i>Acca sellowiana</i>.</b>	
<b>Resumo</b>	<b>76</b>
<b>Abstract</b>	<b>77</b>
<b>1-Introdução</b>	<b>78</b>
<b>2-Material e Métodos</b>	<b>80</b>
2.1-Material Vegetal	80
2.2-Indução à embriogênese somática	80
2.3-Extração das proteínas solúveis	80
2.4-Quantificação das Proteínas	81
2.5-Eletroforese-SDS das proteínas solúveis	81
2.6-Eletroforese Bidimensional	82
<b>3-Resultados</b>	<b>83</b>
<b>4-Discussão</b>	<b>86</b>
<b>5-Referências Bibliográficas</b>	<b>88</b>
<b>III-CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>91</b>

## Lista de abreviaturas

2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético  
2-DE – Eletroforese Bidimensional  
ABA – ácido abscísico  
AIA – ácido indol-acético  
ATM - atmosfera  
BAP – Benzilamino purina  
BAG – Banco ativo de germoplasma  
Cad - cadaverina  
CCA – Centro de Ciências Agrárias  
CV – coeficiente de variação  
CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1- propanesulfonate  
DAP- dias após a polinização  
DAH - diaminoheptano  
DEA- Distância entre estigma e antera  
DNA – ácido desoxiribonucleico  
DTT - ditioneitol  
EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina  
EDTA – ácido etilendiamina Tetra-acético  
FLU – Fluridone  
GA<sub>3</sub> - giberelina  
HCl- ácido clorídrico  
HPLC – Cromatografia líquida de alta precisão  
IEF – Focalização isoeletrica  
IPG – Gradiente de pH imobilizado  
KCl – Cloreto de potássio  
KW – Kruskal - Wallis  
LEA – late embryogenesis abundant  
LPM – Von Arnold & Eriksson, 1981  
MF – massa fresca  
mRNAs – ácido ribonucleico mensageiro  
mM - milimolar  
ng - nanogramas  
nm - nanômetros  
PAs - Poliaminas  
PCA – ácido perclórico  
Pd – padrão de peso molecular  
pH – potencial hidrogeniônico  
PVP – polivinil propileno  
Put - putrescina  
Rpm – rotações por minuto  
SC – Santa Catarina  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
Spd - spermidina  
Spm - spermina  
T - tegumento  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
USP – Universidade de São Paulo  
V - Volts  
Vh – volts/hora

$\mu\text{g}$  - micrograma  
 $\mu\text{L}$  - microlitro  
 $\mu\text{M}$  – micromolar

<b>Lista de Tabelas</b>	<b>Pg</b>
<b>Tabela 1.</b> Porcentagem de conversão de embriões somáticos de <i>Acca sellowiana</i> cultivados em meio de cultura contendo BAP, GA <sub>3</sub> diferentes concentrações de Fluridone (FLU) (n=8).	<b>32</b>
<b>Tabela 2.</b> Porcentagem de conversão de embriões somáticos de <i>Acca sellowiana</i> cultivados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Fluridone (FLU) (n=8).	<b>33</b>
<b>Tabela 3.</b> Médias das concentrações de ABA do embrião e da semente inteira de <i>Acca sellowiana</i> nos diferentes tipos de polinização.	<b>50</b>
<b>Tabela 4.</b> Médias das concentrações de AIA no embrião e na semente inteira de <i>Acca sellowiana</i> em resposta aos diferentes tipos de polinização.	<b>52</b>
<b>Tabela 5.</b> Fenóis Totais das sementes <i>A. sellowiana</i> oriundas de diferentes tipos de polinização.	<b>76</b>
<b>Tabela 6.</b> Proteínas solúveis de culturas embriogênicas e não-embriogênicas de <i>Acca sellowiana</i> , obtidas a partir de embriões zigóticos.	<b>90</b>

<b>Lista de Figuras</b>	<b>Pg</b>
<b>Figura 1.</b> Concentração média de ABA no embrião e na semente inteira de <i>Acca sellowiana</i> , originados a partir de polinização de mesma classe de DEA (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	48
<b>Figura 2.</b> Concentração média de ABA no embrião, no tegumento e na semente inteira de <i>Acca sellowiana</i> , a partir da polinização de mesma classe de DEA (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	49
<b>Figura 3.</b> Concentração média de ABA no embrião e na semente inteira de <i>Acca sellowiana</i> a partir de polinização natural (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	49
<b>Figura 4.</b> Concentração média de AIA no embrião e na semente inteira de <i>Acca sellowiana</i> , a partir de polinização de mesma classe de DEA (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	51
<b>Figura 5.</b> Concentração média de AIA no embrião, no tegumento e na semente inteira de <i>Acca sellowiana</i> , a partir de polinização de mesma classe de DEA (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	51
<b>Figura 6.</b> Concentração média de AIA no embrião e na semente inteira de <i>Acca sellowiana</i> , originados a partir de polinização natural (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	52
<b>Figura 7.</b> Concentrações de Poliaminas totais na semente de <i>Acca sellowiana</i> , oriundos de polinização de mesma classe e natural (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	53
<b>Figura 8.</b> Concentrações de Poliaminas livres na semente de <i>Acca sellowiana</i> oriundas de polinização de mesma classe e natural (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	54
<b>Figura 9.</b> Razão de Put/(Spd+Spm) na semente de <i>Acca sellowiana</i> em resposta a diferentes tipos de polinização, (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	54
<b>Figura 10.</b> Concentrações de PAs conjugadas na semente de <i>Acca sellowiana</i> resultante dos diferentes tipos de polinização, (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	55
<b>Figura 11.</b> Concentração dos fenóis totais em diferentes estágios de desenvolvimento desementes de <i>A. sellowiana</i> (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	74

<b>Figura 12.</b> Concentração de fenóis totais em sementes de <i>A. sellowiana</i> em diferentes períodos de armazenamento (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	<b>75</b>
<b>Figura 13.</b> Concentração de fenóis totais em sementes de <i>A. sellowiana</i> oriundas de diferentes classes de DEA (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	<b>75</b>
<b>Figura 14.</b> Concentração de fenóis totais no tegumento e na semente inteira de <i>A. sellowiana</i> (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	<b>76</b>
<b>Figura 15.</b> Perfil protéico em gel de poliacrilamida-SDS de culturas embriogênicas, aos 45 e 60 dias de cultivo, e não-embriogênica aos 60 dias de cultivo.	<b>91</b>
<b>Figura 16.</b> Perfil bidimensional das proteínas de culturas embriogênicas e não-embriogênicas de <i>Acca sellowiana</i> , obtidas a partir de embriões zigóticos.	<b>92</b>

## I-INTRODUÇÃO

A goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* Berg. Burret) é uma Myrtaceae frutífera nativa dos estados do Sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Norte da Argentina (Mattos, 1986). A planta se encontra distribuída naturalmente no sub-bosque das matas de Araucária, abrangendo a região serrana de Santa Catarina em altitudes acima de 800 m e com maior frequência em altitudes superiores a 1000 m (Ducroquet et al., 2000). Existem Bancos ativos de germoplasma (BAG) desta espécie na Nova Zelândia, Estados Unidos e Austrália, porém com poucos acessos, e uma base genética estreita (Thorp & Bielecki, 2002). Buscando a conservação e estudo da espécie, no Brasil existe o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) na Estação Experimental da EPAGRI de São Joaquim, o qual foi implantado em 1995, que continuamente vem sendo enriquecido com a inclusão de novos acessos coletados nas regiões de ocorrência (Ducroquet et al., 2000).

Desde 1997, o grupo de pesquisa Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal vem investigando aspectos morfofisiológicos do desenvolvimento de *Acca sellowiana*, visando inserir a espécie no mercado produtor de frutas do Sul do Brasil. Para que isso ocorra, biotecnologias vêm sendo empregadas tanto a nível molecular quanto fisiológico e estrutural, para estabelecer protocolos que auxiliem na aquisição de informações que levem a desenvolver um programa de melhoramento eficiente. Estudos vêm sendo realizados pela EPAGRI em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina, e também pela EMBRAPA Clima Temperado (CPACT-RS), visando a conservação e estabelecimento de um programa de melhoramento genético para viabilizar o desenvolvimento de um sistema de produção comercial da espécie. Em 2007, foram lançadas as primeiras cultivares da goiabeira serrana, SCS 411 – Alcântara e SCS 412 – Helena (Ducroquet et al., 2007).

Com isoenzimas, Nodari et al., 1997, revelaram que existe uma alta variabilidade genética entre acessos coletados. Para complementar estes estudos foram realizados também trabalhos utilizando marcadores moleculares RAPDs, permitindo assim que o genoma seja melhor explorado, pois apesar das isoenzimas contribuírem muito para a caracterização do BAG, existem poucos sistemas isoenzimáticos disponíveis. Os marcadores moleculares RAPDs, facilitaram a identificação de genótipos específicos da planta, sendo possível analisar similaridades genéticas entre os acessos. Os marcadores moleculares associados também à marcadores morfológicos e alozímicos, com uma alta taxa de amplificação dos fragmentos de DNA, indicam que os marcadores RAPDs são mais eficazes na caracterização de variabilidade genética do que as isoenzimas (Welter et al., 1999). Além disto, pesquisas

recentes feitas com marcadores microsatélites em plantas de dos grupos de *A. sellowiana* do Brasil e do Uruguai, demonstraram que a população do grupo Uruguai tem uma baixa diversidade genética, tanto fenotípica quanto genotípica, em comparação com o Tipo Brasil. Esta descoberta sugeriu um maior aprofundamento dos estudos e desenvolvimento de microsatélites específicos para a espécie (Santos, 2005).

Hickel e Ducroquet (2000), Degenhardt et al. (2001) e Finardi (2003), identificaram evidências de um mecanismo de auto-incompatibilidade atuando na goiabeira-serrana. O qual foi descrito por Santos et al. (2007), como sendo um caso de auto-incompatibilidade de ação tardia. Suas flores apresentam variabilidade na distância entre estigma e antera (DEA) (Degenhardt et al., 2001; Finardi, 2003), que constituem três classes: DEA1, com distância entre estigma e antera de 0 e 0,4cm; DEA2, com distância de 0,5 e 0,9 cm e DEA3 com 1,0 e 1,4 cm de distância. Há também diferença em relação à disposição dos estames nas flores podendo a distribuição ser aleatória (classe A) ou radial (classe B) (Degenhardt et al., 2001). As sementes oriundas de polinização cruzada com pólen de acessos DEA1, 2 e 3, tanto nos acessos auto-compatíveis quanto nos auto-incompatíveis, para as três classes de DEA, apresentaram maior taxa de germinação (~71%) (Finatto, 2008).

Apesar do Brasil ser seu centro de origem e diversidade, a goiabeira serrana ainda é pouco cultivada, ao contrário de países como Nova Zelândia, Colômbia, Estados Unidos e Europa, onde é cultivada há várias décadas. Seus frutos possuem polpa cor de gelo e sabor doce-acidulado, além de aroma muito agradável (Ducroquet & Ribeiro, 1991; Ducroquet et al., 2000). Estudos demonstraram que flavonóides presentes nos frutos de *A. sellowiana*, atuam na morte de células tumorais (Bomtempo, et al., 2007). Altos teores de vitamina C são encontrados na polpa (Ducroquet et al., 2000). Na Nova Zelândia são processados vários produtos derivados da goiabeira-serrana: geléias, sorvetes, espumantes, sucos puros, sucos misturados com outras frutas, néctar, molhos e alimentos processados (Thorp & Bielecki, 2002).

Em relação à propagação da *A. sellowiana*, várias técnicas tem sido empregadas. A propagação sexuada via sementes resulta normalmente em uma alta taxa de germinação, com sobrevivência e crescimento satisfatórios. Porém este método não reproduz o fenótipo da planta mãe, características desejadas pelos produtores de frutas. Apesar disto essa técnica é utilizada para a obtenção de porta-enxertos, os quais apresentam bom vigor (Ducroquet et al., 2000). Na propagação assexuada, várias técnicas já foram testadas, porém os diversos métodos de estaquia (Sharpe et al., 1993) e enxertia não se mostraram eficientes para a



espécie, mesmo porque nenhuma mirtácea testada apresentou afinidade para ser porta-enxerto da goiabeira-serrana (Ducroquet et al., 2000).

A propagação clonal de plantas nativas por meio da embriogênese somática tem potencial de capturar rapidamente os benefícios de melhoramento ou programas de engenharia genética e para aumentar a qualidade das mudas (Kim e Moon, 2007). A produção dessas mudas *in vitro* é possível por intermédio de duas rotas morfogênicas: a embriogênese somática e organogênese. A organogênese foi descrita a partir de microestacas que foram enraizadas *in vitro* em meios de cultura com reguladores de crescimento específicos possibilitando a formação de plântulas completas (Dal Vesco & Guerra, 1999).

Guerra et al. (1997) desenvolveram um protocolo de embriogênese somática nesta espécie obtendo bons resultados a partir de embriões zigóticos maduros. Estudos subsequentes foram realizados, visando esclarecer pontos fundamentais no processo de embriogênese somática. Os melhores resultados de indução ocorreram a partir de embriões zigóticos cultivados em meio de cultura LPM, suplementados com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Aspectos bioquímicos das culturas embriogênicas, tais como os níveis de Poliaminas, foram investigados para definir as condições que favorecem a conversão de embriões somáticos em plântulas (Stefanello, 2000). Foi estudada também a competência embriogênica de tecidos florais de *A. sellowiana*, e investigada a influência de reguladores de crescimento na indução e desenvolvimento de embriões somáticos, sendo esse o primeiro estudo com esta espécie a partir de tecidos somáticos (Stefanello et al., 2005). Embriões somáticos oriundos de culturas embriogênicas foram encapsulados em alginato de sódio para a obtenção de sementes sintéticas, porém a taxa de conversão dos embriões em plântulas foi baixa (Cangahuala-Inocente et al., 2004). A diminuição dos níveis de proteínas durante o desenvolvimento das culturas embriogênicas, bem como um aumento nos teores de açúcares solúveis totais e amido, afetou a indução e desenvolvimento dos embriões somáticos. Nestes, os níveis de proteínas aumentaram de acordo com a evolução de seus estágios de desenvolvimento. Por sua vez, os níveis de açúcares e amido foram altos nos estágios coração e cotiledonar e baixos nos estágios torpedo e pré-cotiledonar (Cangahuala-Inocente, 2007).

A embriogênese *in vitro* pode servir como um sistema modelo para estudos de eventos moleculares, citológicos, fisiológicos e do desenvolvimento na embriogênese vegetal (Fehér, et al., 2003) e para uma maior compreensão dos fatores fisiológicos, genéticos e bioquímicos envolvidos no desenvolvimento do embrião (Guerra et al., 1999). Esta técnica é também recomendada para a propagação massal clonal de genótipos de interesse.

Na embriogênese somática *in vitro* padrões de divisão e diferenciação celular, informações posicionais e sinais de desenvolvimento podem ser facilmente alterados (Fehér et al., 2003). Essas alterações podem ser expressas por duas vias: na primeira, a indução da embriogênese somática provoca a formação de embriões somáticos no tecido matriz sem passar por fase de calo (direta); na segunda, há a formação de um estágio intermediário de calo no tecido matriz, existindo células em diversos estágios de diferenciação, as quais podem ser induzidas ou direcionadas, por meio de reguladores de crescimento para a aquisição de novas competências (Guerra et al., 1999).

Os efeitos do 2,4-D na embriogênese somática são bem documentados, porém existem relatos de formação de embriões somáticos na ausência de reguladores de crescimento, sem passar por estágio de calo. Isso sugere que a embriogênese somática não pode ser tratada como sendo uma resposta específica induzida por um ou mais reguladores de crescimento exógenos, indicando que o estresse também pode ser um estímulo embriogênico. Assim níveis de hormônios endógenos podem ser considerados os fatores determinantes na especificidade das respostas celulares a esses estímulos de estresse (Fehér et al., 2003).

Nos últimos anos, vários estudos vêm investigando os verdadeiros papéis executados pelos hormônios endógenos AIA e ABA e seus níveis durante as fases iniciais da embriogênese (Fehér et al., 2003). O ABA tem suas funções bem conhecidas com atividades ligadas ao crescimento vegetal, dormência e germinação, podendo ser um inibidor ou promotor de crescimento, na presença ou ausência de estresse respectivamente, como seca e estresse osmótico (Eckardt, 2002). A rota da biosíntese de ABA procede a partir da zeaxantina para xantoxina via catalítica pela zeaxantina epoxidase, violaxantina isomerase e 9cis-epoxicarotenóide dioxigenase (Amasi, et al., 2004).

Seu potencial inibitório no crescimento vegetal é conhecido devido sua aplicação exógena em germinação de sementes e no crescimento das plântulas, o que freqüentemente é usado em bioanálises desse regulador. Porém, observações nos fenótipos de mutantes deficientes em ABA sugerem que o ABA endógeno deve executar algum papel na promoção do crescimento (Sharp et al., 2000; Finkelstein et al., 2002). Análises da sinalização de ABA em sítios alvos foram realizadas em células-guarda, células do mesófilo, sementes imaturas e sementes em processo de germinação, e a precisa localização da biossíntese de ABA permaneceu duvidosa (Cheng et al., 2002).

O Fluridone (1-metil-3-fenil-5-[3-(trifluormetil)-fenil]-4(1H)-piridinona) é um herbicida do qual o mecanismo de ação em nível molecular ainda não foi completamente elucidado (Popova, 1995). É um inibidor de carotenogênese, da síntese de ABA e seus

derivados (Grappin et al., 2000). Estudos em plântulas cultivadas no escuro mostraram que o Fluridone inibe o acúmulo de carotenóides, mas não altera a biogênese de plastídios e a composição das proteínas. Existem evidências que os carotenóides são os principais percussores da síntese de ABA em plantas, sugerindo que ribossomos são essenciais para a síntese de ABA em resposta a estresses, e que as enzimas para a síntese do ABA são codificadas por genes nucleares (Popova, 1995).

Em tratamentos relacionados à germinação de sementes dormentes e não-dormentes, a aplicação do Fluridone foi eficiente na germinação das sementes dormentes, apesar das baixas concentrações usadas (1-10 $\mu$ M), e nenhum efeito foi verificado nas sementes não-dormentes e em mutantes (*aba1*) com deficiência em ABA (Grappin et al., 2000). Altas concentrações de Fluridone apresentaram resultados semelhantes aos observados com giberelina (GA3) nas sementes dormentes. Estudos realizados com a espécie demonstraram que o meio de cultura suplementado com BAP (0,5mM), GA3 (1mM) e carvão ativado (1,5g L<sup>-1</sup>), aumentam a conversão de embriões somáticos à plântulas. E embriões somáticos pré-germinados encapsulados em alginato de sódio com BAP (0,5mM) e GA3 (1mM) desenvolveram radículas, sendo a semente sintética essencial para a sobrevivência das plântulas (Cangahuala-Inocente et al., 2007).

Se ABA for adicionado ao meio de cultura combinado com Fluridone, o estímulo de germinação efetuado pelo Fluridone é aumentado consideravelmente, indicando assim que o efeito do Fluridone sobre a germinação das sementes dormentes é provavelmente relacionado com a inibição da síntese de ABA, e que esta síntese talvez seja essencial para a expressão da dormência na semente (Grappin et al., 2000). Em tratamentos de raízes com inibidor da síntese de ABA, fluridone, não foi verificado um crescimento de adaptação ao baixo potencial hídrico. Isto sugere que o aumento do nível de ABA induzido por encharcamento age como um sinal para a ativação de um gene necessário para a adaptação (Cho & Cosgrove, 2004), demonstrando que adaptações fisiológicas durante o desenvolvimento dependem dos níveis de ABA sintetizados ao longo do processo. O ABA controla a dormência de sementes, pela ação antagonista à promoção da germinação induzida pelo ácido giberélico (Amasi et al., 2004). O melhoramento da regeneração de embriões somáticos por GA3 é correlacionado com a aceleração da hidrólise de amido através do aumento da atividade da  $\alpha$ -amilase pelo GA3. Em contraste o efeito inibitório do ABA é provavelmente relacionado com a inibição da atividade da  $\alpha$ -amilase, e como conseqüência, o retardo da hidrólise do amido (Xie et al., 2007).

As Poliaminas, amplamente distribuídas entre os vegetais, desempenham papel importante na síntese protéica, replicação do DNA e morfogênese, além de estarem envolvidas em vários outros eventos celulares (Schons e Brasil, 1995). Nos vegetais a putrescina, espermidina e a espermina constituem as principais Poliaminas, as quais ocorrem na forma livre e conjugada com ácidos fenólicos e outros compostos de baixo peso molecular, ou ainda com macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos. Correlações entre as Poliaminas e suas enzimas biossintéticas e processos vegetais de crescimento, especialmente a embriogênese somática, são específicas para algumas espécies (Bais & Ravishankar, 2002).

Estudos demonstraram que as poliaminas estão presentes em frações da parede celular, do vacúolo, mitocondria e cloroplasto (Tiburcio et al., 1997). Estudos moleculares estão sendo usados para avançar o entendimento do papel das poliaminas no processo de desenvolvimento vegetal (Kaur-Sawhney et al., 2003). De acordo com suas ações biológicas, as PAs podem ser divididas em dois grupos. Put e Cad estimulando a expansão celular e formação de raízes, como as Auxinas e Giberilinas, onde Spm e Spd regulam a divisão celular, organogênese e senescencia, como as Citocininas (Kuznetsov et al., 2006).

Ao contrário dos hormônios vegetais tradicionais, as Poliaminas, agem como reguladores de crescimento ou como mensageiros secundários para outros hormônios no interior das células (Wu X-B et al., 2008), ou seja, modificações no metabolismo de PAs controla a ação de outros hormônios responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento vegetal. Essas alterações de metabolismo ocorrem em nível endógeno das PAs e de suas enzimas biossintéticas (Kaur-Sawhney et al., 2003), as quais estão presentes em frações da parede celular, do vacúolo, mitocondria e cloroplasto (Tiburcio et al., 1997).

O ABA também está envolvido no controle da expressão de genes que codificam para proteínas LEA e de armazenamento, assim como para enzimas em ácidos graxos e metabolismo de lipídios em sementes. A proteína abundante da embriogênese tardia é hidrofílica e se acumula em altos níveis nos estágios tardios da maturação da semente e desaparece logo após a germinação (Grelet et al., 2005). A expressão da proteína LEA, que geralmente ocorre dependente de ABA, pode também ocorrer em tecidos vegetativos sujeitos ao déficit de água associado com stress salino ou de frio (Cuming, 1999). Em nível sub-celular algumas proteínas LEA tem sido localizadas no citosol e nucleoplasma (Roberts et al., 1993; Houde et al., 1995), em cloroplastos (Artus et al., 1996; NDong et al., 2002), em corpos protéicos e amiloplastos (Rinne et al., 1999), e em vacúolos (Heyen et al., 2002). O padrão de expressão foi examinado durante o desenvolvimento e germinação de sementes, a expressão

induzida por estresse, ABA e pelo próprio desenvolvimento, é geralmente característica das proteínas LEA (Ingram e Bartels, 1996; Cuming, 1999).

Durante o desenvolvimento do embrião, proteínas, lipídios e amido são sintetizados e depositados nos cotilédones, para serem utilizados durante a conversão a plântula. Posteriormente o embrião entra em dormência devido à perda de água e interrupção da expressão gênica e síntese de proteínas (Taiz e Zeiger, 2004). Estudos vêm sendo feitos para qualificar e quantificar populações de mRNAs e proteínas, visando decifrar a função e regulação que representam ligações entre o genótipo e fenótipo. Proteômica é um termo aplicado para quase todos os aspectos da expressão de proteínas, estrutura ou função (Rose et al., 2004). A técnica 2-DE consiste em separar as proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico seguido do peso molecular dando lugar a comparação do conteúdo de cada uma das proteínas, produzidas em diferentes células ou tecidos e em diferentes estados fisiológicos. A identificação das proteínas cuja expressão sofreu uma alteração significativa e a análise das modificações das proteínas que ocorrem pós-tradução possibilita a obtenção de dados que indiquem envolvimento em processos biológicos, ou também determinar seu movimento, funcionalidade e atividade, eventos fundamentais para a compreensão de rotas de regulação ligadas às respostas celulares a sinais ambientais (Santos et al., 2004; Zivy e Vienne, 2000).

Os protocolos para a uso da técnica são bem estabelecidos, variando em detalhes específicos a cada espécie analisada. Existe uma seqüência básica de atividades necessárias para a realização da análise proteômica quantitativa, utilizando 2-DE como meio de separação das proteínas. A primeira é a preparação das amostras a serem examinadas, seguida então da extração do conteúdo protéico das amostras. Em seqüência procede-se a quantificação para separar as proteínas por eletroforese 2-D, a visualização e a comparação das proteínas separadas nos géis 2-D. Por fim, procede-se a identificação das proteínas separadas (Santos et al., 2004).

As pesquisas com embriogênese somática têm sido associadas principalmente às análises fisiológicas ou então enfocam melhoramentos nas metodologias. Recentemente estudos em níveis moleculares, como a proteômica, vêm sendo realizados. Isto possibilita a descrição de mudanças ocorridas na expressão do genoma devido a alteração das condições de cultura do embrião (Lippert et al., 2005).

Os compostos fenólicos apresentam várias funções durante o desenvolvimento e crescimento das plantas, tais como suporte mecânico, atração de polinizadores e dispersores de frutos, absorção da radiação ultravioleta maléfica e na redução do crescimento de plantas

vizinhas competidoras (Taiz e Zeiger, 2003; Muscolo et al., 2005). Existem evidências da participação de compostos fenólicos, como os flavonóides, na comunicação e sinalização planta-microorganismo, assim como em funções antioxidantes e antifúngicas, indutores da germinação do pólen e elongações do tubo polínico (Yoshitama, 2000). Alguns autores descrevem os fenóis como precursores na síntese de auxinas, ácido salicílico aminoácidos aromáticos e participam da regulação da biosíntese de etileno (Piruzian et al., 2002).

Admite-se que a conversão de embriões somáticos em plântulas possa ser melhorada buscando-se similaridade bioquímica com o embrião zigótico (Klimaszewska et al., 2004). Durante a embriogênese somática ocorrem processos bioquímicos, como a síntese de hormônios endógenos em diferentes estágios de desenvolvimento, e como na maturação dos embriões. Metabólitos, como o ABA, o AIA, as poliaminas, fenóis, proteínas, podem afetar o desenvolvimento dos embriões. Assim, estudos relacionados a interações, ativação e inativação desse hormônio em embriões zigóticos e somáticos são fundamentais para o entendimento e aprimoramento dos processos envolvidos desde a iniciação da embriogênese somática até o estabelecimento a campo das plântulas produzidas *in vitro*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTUS, N. N.; UEMURA, M.; STEPONKUS, P. L.; GILMOUR, S. J.; LIN, C.; THOMASHOW, M. F. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. **Natural Academic Science**, v.93, p.13404–13409, 1996.

ASAMI, T. A.; HAN, S-Y.; KITAHATA, N.; SEKIMATA, K.; SAITO, T.; KOBAYASHI, M.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; YOSHIDA, S. Novel Inhibitor of 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase in Abscisic Acid Biosynthesis in Higher **Plants Plant Physiology**, v. 135, p. 1574–1582. 2004.

BAIS, H. P. e RAVISHANKAR, G.A. Synergistic effect of auxins and polyamines in hairy roots of *Cichorium intybus* L. during growth, coumarin production and morphogenesis. **Acta Physiologia e Plantarum**, v.25, p.193-208, 2003.

BONETTA, D. e MCCOURT, P. Genetic analysis of ABA signal transduction pathways **Trends in plant science**, v.3, p. 231-235, 1998.

BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p. 1902-1914, 2007.

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

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.; TORRES A. C.; GUERRA M. P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in *Feijoa (Acca sellowiana)* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds **Scientia Horticulturae**, v.111, p. 228-234, 2007.

CHENG, W.H.; ENDO, A.; ZHOU, L.; PENNEY, J.; CHEN, H.C.; ARROYO, A.; LEON, P.; NAMBARA, E.; ASAMI, T.; SEO, M.; KOSHIBA, T.; SHEEN, J., A Unique Short-Chain

Dehydrogenase/Reductase in Arabidopsis Glucose Signaling and Abscisic Acid Biosynthesis and Functions. **The Plant Cell**, v.14, p. 2723–2743, 2002.

CHO H.; COSGROVE D. J. Biosynthesis, Signal Transduction, Action Plant Hormones ed. by Peter J Davies, **KLUWER**, Dordrecht, p.262-281, 2004.

CUMING, A. C. LEA proteins. In SHEWRY, P. R.; CASEY, R. Seed Proteins. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p.753–780, 1999.

DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Organogênese e micropropagação da goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.21, p.60-64, 1999.

DEGENHARDT, J.; ORTH, A. I.; GUERRA, M. P.; DUCROQUET, J. P.; NODARI, R. O.; Morfologia floral da goiabeira Serrana (*Feijoa Sellowiana*) e suas implicações na polinização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.. 23, p. 718-721 2001.

DUCROQUET, J. P. H. J.; RIBEIRO, P. A Goiabeira-Serrana: velha conhecida, nova Alternativa. **Agropecuária Catarinense**, v..4, p. 27-29, 1991.

DUCROQUET, J. P. H. J.; HICKEL, E. R.; NODARI, R. O. Goiabeira-Serrana (*Feijoa sellowiana*). **Série Frutas nativas** Funep, v.5,66p. 2000.

DUCROQUET, J. P. H. J. ; SANTOS, K. L.; ANDRADE, E. R.; BONETI, J. I. S.; BONIN,V.; RUBENS ONOFRE NODARI; As primeiras cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 411 Alcântara e SCS 412 Helena. **Agropecuária Catarinense**, v.20, p. 77-80, 2007.

DUCROQUET, J. P. H. J.; HICKEL, E. R.; NODARI, R. O. Goiabeira-Serrana (*Feijoa sellowiana*). **Sociedade Brasileira de Fruticultura/FUNEP**, 1. ed. Jaboticabal 66p. 2000.

ECKARDT N. A.; Abscisic Acid Biosynthesis Gene Underscores Sugar, Stress, and Hormone Interactions **The Plant Cell**, v.14, p. 2645-2649, 2002.



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

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L.; ROCK, C.D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **Plant Cell**, v.14, p. 15-45, 2002.

FINARDI, C. Caracterização da Biologia Reprodutiva da Goiabeira-Serrana (*Acca Sellowiana* Berg.). Dissertação (mestrado em Recursos genéticos Vegetais). Faculdade de Agronomia, **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis -SC. 2003.

FINATTO, T. Caracterização morfofisiológica do sistema de Incompatibilidade atuante em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (berg) burret) (Myrtaceae). Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Faculdade de Agronomia, **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis- SC. 2008.

GAWRONSKA H.; BURZA W.; BOLESTAB E.; MALEPSZYB S. Zygotic and somatic embryos of cucumber (*Cucumis sativus* L.) substantially differ in their levels of abscisic acid. **Plant Science**, v.157, p. 129-137, 2000.

GRAPPIN, P.; BOUINOT, D.; SOTTA, B.; MIGINIAC E.; JULLIEN, M. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. **Planta**, v.210, p. 279-285, 2000.

GRELET, J.; MACHEREL, D.; BENAMAR, A.; TEYSSIER, E.; MACHEREL, M. A.; GRUNWALD, D. Identification in Pea Seed Mitochondria of a Late-Embryogenesis Abundant Protein Able to Protect Enzymes from Drying **Plant Physiology Preview**, v. 137, p. 157-167, 2005.

GUERRA, M.P; DAL VESCO L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS M. S. Somatic Embryogenesis In Goiabeira Serrana: Genotype Response, Auxinic Shock And Synthetic Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p. 117-128, 2001.

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

HEYEN, B. J.; ALSHEIKH, M. K.; SMITH, E. A.; TORVIK, C. F.; SEALS, D. F.; RANDALL, S. K. The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrinlike protein is regulated by phosphorylation. **Plant Physiology**, v.130, p. 675-687, 2002.

HOUDE, M.; DANIEL, C.; LACHAPELLE, M.; ALLARD, F.; LALIBERTE´ S; SARHAN, F. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. **Plant Journal**, v.8, p. 583–593, 1995.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Plant Molecular Biology**, v.47, p. 377–403, 1996.

KAUR-SAWHNEY, R.; TIBURCIO A. F.; ALTABELLA, T.; GALSTON, A. W. Polyamines in plants: An overview. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v.2, p.1-12, 2003.

KIM, Y. W.; MOON, H. K. Regeneration of plant by somatic embryogenesis in *Pinus rigida*×*P. Taeda*. **In Vitro Cellular & Development Biology**. Plant, v. 43, p.335–342, 2007.

KUZNETSO, VI. V.; RADYUKINA, N. L.; SHEVYAKOVA, N. I. Polyamines and Stress: Biological Role, Metabolism, and Regulation. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 53, p. 583-604, 2006.

LIPPERT, D.; ZHUANG, J.; RALPH, S.; ELLIS, D.E.; GILBERT, M.; OLAFSON, R.; RITLAND, K.; ELLIS, B.; DOUGLAS C.J.; BOHLMANN Proteome analysis of early somatic embriogenesis in *Picea glauca* **Proteomics**, v.5, p.461-473, 2005.

MATTOS, J. R. A goiabeira serrana. **Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis** Porto Alegre, 84 p. 1986.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; PANUCCIO1, M. R.; DE SANTIS, C.; FINOCCHIARO, A. Early effects of phenolic compounds, extracted from two forest litters, on ammonium uptake and assimilation in *Pinus laricio* and *Pinus pinaster* seedlings. **Plant and Soil**, v. 269, p.309-320, 2005.

NDONG, C.; DANYLUK, J.; WILSON, K. E.; POCOCK, T.; HUNER, N. P. A.; SARHAN, F. Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins: molecular characterization and functional analyses. **Plant Physiology**, v.129. 2002.

PESCADOR, R. Aspectos Fisiológicos-Estruturais das Embriogêneses Zigótica e Somática de *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae). Tese, **Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2004.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; KRAUS, J. E.; FERREIRA, W. DE M.; GUERRA, M. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. DE K. L. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **In vitro Cellular & Development Biology.- Plant**, v. 44, p. 289-299, 2008.

PIRUZIAN, E. S.; GOLDENKOVA, I. V.; LENETS, A. A.; CVIKROVÁ, M.; MACHÁ KOVÁ, I.; KOBETS, N. S.; METT, V. L.; MUSIICHUK, K. A. Physiological and Biochemical Characteristics of Tobacco Transgenic Plants Expressing Bacterial Dioxygenase. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 49, p. 817-822, 2002.

POPOVA L. Effect of Fluridone on Plant Development and Stress-Induced ABA Accumulation in *Vicia Faba* L. **Plants Journal of Plant physiology**, v.21, p. 42-50, 1995.

RINNE, P. L. H.; KAIKURANTA, P. L. M.; VAN DER PLAS, L. H. W.; VAN DER SCHOOT, C. Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. **Planta**, v. 209, p. 377-388, 1999.

ROBERTS, J. K.; DESIMONE, N. A.; LINGLE, W. L.; DURE, L. III. Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two Lea proteins in cotton embryos. **Plant Cell**, v.5, p. . 1993.

ROSE, J.K.C.; BASHIR, S.; GIOVANNONI, J.J.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, R.S. Tackling the Plant Proteome: approaches, hurdles and experimental tools. **The Plant Journal**, v.39, p. 715-733, 2004.

SANTOS, K. L., LENZI, M.; CAPRESTANO, C. A.; DANTAS, A. C. M., DUCROQUET, J. P. H.; ORTH, A.; GUERRA, M. P. Evidência da atuação do sistema de auto-incompatibilidade tardia em *Acca sellowiana* (Berg) Burret. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 120-123, 2007.

SCHONS, J.; BRASIL, O. G. Poliaminas na embriogênese somática em cenoura (*Daucus carota* L.) **Science Agriculture**, v.52, p. 534-536, 1995.

SHARP, R.E., LENOBLE, M.E.; ELSE, M.A.; THORNE, E.T.; GHERARDI, F. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: Evidence for an interaction with ethylene. **Journal Experimental Botany**, v.51, p. 1575-1584, 2000.

STEFANELLO, S. Elucidação de pontos de controle da embriogênese somática em Goiabeira Serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). Dissertação de Mestrado (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais) **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis. 92p. 2002.

STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 117-126, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 719p. 2004.

THORP, G.; BIELESKI, R. Feijoas: origins, cultivation and uses. Auckland: David Bateman, 87p. 2002.

TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; BORRELL, A.; MASGRAU C. Polyamine metabolism and its regulation. **Physiology Plantarum**, v.100, p. 664-674, 1997.

VRIES, S C.; TOONEN, M A J.; MORDHORST, A P. Plant Embryogenesis. **Plant Science**, v.16, p. 535-576, 1997.

WELTER, L.J.; BELÓ, A.; DUCROQUET, J.P.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Genetic characterization of the goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.) germplasm. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45°, GRAMADO (RS), Anais, **Revista Brasileira de Genética**, v.22, p. 452, 1999.

WU X-B.; WANG, J.; LIU, J-H.; DENG, X-X. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.52-62, 2008.

XIE, Z.; ZHANG, Z-L.; HANZLIK, S.; COOK, E.; SHEN, Q. J. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. **Plant Physiology**, v. 64, p. 293-303, 2007.

YOSHITAMA, K. Recent Advances in Secondary Metabolism Research: Regulation of Biosynthesis and Physiological Functions of Flavonoids and Some Phenolics. **Journal of Plant Research**, v.113, p.285, 2000.

ZIVY, M.; DE VIENNE, D. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology **Plant Molecular Biology**, v.44, p. 575-580, 2000.

## II-OBJETIVOS

### Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo investigar aspectos da fisiologia e do metabolismo da embriogênese somática e zigótica de *Acca sellowiana* (berg) burret (Myrtaceae), visando gerar informações úteis para o aprimoramento do protocolo de embriogênese somática e de propagação, inseridos em um programa de melhoramento da espécie.

### Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do Fluridone, um inibidor da síntese de ABA, no processo de conversão *in vitro* dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*, buscando identificar a melhor concentração de Fluridone para a conversão dos embriões em plântulas.
- Identificar diferenças nos níveis de Fenóis totais em sementes oriundas de diferentes genótipos de *Acca sellowiana*, visando estabelecer um perfil de sementes propensas a responderem melhor à indução a embriogênese somática.
- Determinar fenóis totais presentes no tegumento da semente e no embrião zigótico.
- Verificar a influência do tipo de polinização nos níveis endógenos de ABA, AIA e Poliaminas, de sementes de *Acca sellowiana*.
- Estabelecer relação entre os níveis de ABA, AIA e Poliaminas e o potencial embriogênico e de germinação da semente.
- Otimizar o protocolo de extração de proteínas para a espécie.
- Obter perfis protéicos de culturas embriogênicas e não-embriogênicas.
- Encontrar proteínas que possam estar envolvidas em processos que desencadeiem a embriogênese somática.

## **CAPÍTULO 1**

Efeito do Fluridone na germinação *in vitro* de embriões somáticos de *Acca sellowiana*.

## RESUMO

O modelo de embriogênese somática de *A. sellowiana* vem sendo extensivamente estudado e apesar de embriões somáticos serem obtidos em alta frequência e serem morfológicamente normais, as suas taxas de conversão são ainda baixas. O ABA é um hormônio vegetal conhecido por induzir uma cascata de importantes eventos que resultam em uma germinação normal influenciada pela acumulação de proteínas de reserva, ácidos graxos e altos níveis de amido. Por sua vez, o Fluridone (1-metil-3-fenil-5-[3-(trifluormetil)-fenil]-4(1H)-piridinona), é um inibidor de carotenogênese, da síntese de ABA e seus derivados, sendo comparado ao GA<sub>3</sub> em seus efeitos fisiológicos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos do Fluridone na conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana*. Foram utilizados embriões somáticos obtidos via embriogênese somática, induzida a partir de embriões zigóticos maduros de *Acca sellowiana* os quais foram inoculados em meio LPM suplementado com maltose 3%; vitaminas de Morel, phytigel (0,2%) e 20 uM de 2,4-D em meio de cultura LPM (Morel & Wetmore, 1951); pH 5,8). E Embriões somáticos nos estágios torpedado, pré-cotiledonar e cotiledonar foram inoculados em placas de Petri contendo 30 ml de meio de cultura LPM (sacarose (3%), carvão ativado (1,5%), vitaminas de Morel e suplementado com BAP (0,5µM), GA<sub>3</sub> (1µM) e Fluridone nas concentrações de 0, 1, 5 e 10µM. Também foram submetidos ao mesmo meio de cultura com BAP (0,5µM), GA<sub>3</sub> (1µM) e Fluridone nas concentrações de 0,25; 0,5; 1; 1,5 e 2 uM. As culturas foram incubadas em sala de crescimento à temperatura de 25±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas luminosidade a 50 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. A porcentagem de conversão em plântulas foi avaliada aos 15, 30 e 45 dias de cultivo *in vitro*. A maior porcentagem de embriões convertidos foi obtida nos tratamentos que continham 1uM de Fluridone. Nenhuma conversão dos embriões somáticos em plântulas foi observada em meio de cultura suplementado com 2 e 10 uM e de Fluridone. Embriões somáticos de *Acca sellowiana* apresentam sensibilidade ao Fluridone confirmando seus efeitos antagônicos com o ABA.

Palavras chaves: embriogênese somática; conversão; Fluridone; ABA



## ABSTRACT

The *Acca sellowiana* somatic embryogenesis model system has been extensively studied in the last years. Although somatic embryos are obtained in high frequency and show to be morphologically normal, their conversion rates are still low. The ABA is a plant hormone known to induce a cascade of important events that result in a normal germination. The Fluridone (1-metil-3-fenil-5-[3-(trifluormetil)-fenil]-4(1H)-piridinona), is a inhibitor of carotenogenesis, ABA synthesis and derivatives, being compared to GA<sub>3</sub> in its physiological effects. Thus, in the present work we attempted to study the role of Fluridone in the conversion of *Acca sellowiana* somatic embryos. Somatic embryos were from mature zygotic embryos inoculated in Lpm culture medium supplemented with maltose (3%); Morel vitamins, phytigel (0.2%), and 2,4 - D (20µM). Somatic embryos in torpedo, pre-cotyledonary and cotyledonary stages were placed in Petri dishes containing 30 mL of growing medium Lpm medium plus sucrose (3%), active charcoal (1.5%), Morel vitamins, and supplemented with BAP (0.5 µM), GA<sub>3</sub> (1 µM) and Fluridone (0, 1. 5 and 10 µM). Complementarily to the same basal culture medium with BAP (0.5 µM), GA<sub>3</sub> (1 µM), 0.25; 0.5; 1; 1.5 and 2µM of Fluridone was added. The cultures were incubated in culture room at a temperature of 25 ± 2 °C temperature, under photoperiod of 16 h, and 50 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> light intensity. The rate conversion to plantlets was evaluated to 15, 30 and 45 days. The largest rate of embryo conversion resulted from the treatment with 1µM of Fluridone. The embryo conversion was suppressed in response to Fluridone at 2 and 10 µM. *Acca sellowiana* somatic embryos show of sensitivity to Fluridone, thus confirming its antagonism with ABA.

Keywords: Somatic embryogenesis; conversion; Fluridone; ABA

## 1. INTRODUÇÃO

O ABA é um hormônio vegetal conhecido por induzir uma cascata de importantes eventos que resultam em uma germinação normal influenciada pela acumulação de proteínas de reserva, ácidos graxos e altos níveis de amido (Bhattacharya, 2004). Para que as barreiras impostas à germinação pelo tegumento e pela dormência resultante da ação do ABA sejam quebradas e a germinação ocorra naturalmente, é requerida a atividade de GAs (Finkelstein et al., 2002). Quando a semente é estimulada com condições favoráveis para a germinação, há um declínio na concentração de ABA, que permanece durante a germinação (Kermode, 2005).

Estudos realizados durante a germinação de embriões somáticos de *Acca sellowiana* mostraram que os teores de ABA foram baixos quando comparados com os níveis na germinação de embriões zigóticos da mesma espécie (Cangahuala-Inocente, 2004). Durante a maturação de embriões somáticos de *Medicago sativa* a suplementação de ABA ao meio de cultura levou a um acúmulo de ABA endógeno, o que inibiu a conversão dos embriões em plântulas (Kepczynska e Zielinska, 2006). Aspectos da maturação tais como o acúmulo de reservas e expressão de genes LEA (late-embryogenesis-abundant) são controlados por ações coordenadas de fatores de transcrição. Sequências promotoras para proteínas de reserva e genes LEA contêm elementos essenciais para conferir ao hormônio capacidade de resposta estágio/tecido específica (Finkelstein et al., 2002).

Em *Cucumis sativus* L., a análise dos teores de ABA em embriões zigóticos e somáticos demonstrou que, ao contrário dos embriões zigóticos, os embriões somáticos apresentavam níveis de ABA baixos em todos os estágios de desenvolvimento sendo detectada a maior concentração no estágio de cotiledonar tardio e iniciando a conversão à plântula (Gawronska et al., 2000). O mesmo foi detectado em *Daucus carota*, em embriões cultivados em meio de cultura isento de 2,4-D, pois quando este foi adicionado ao meio de cultura os teores endógenos de ABA aumentaram significativamente (Kamada e Harada, 1981). Isto sugere que ABA desempenha um papel essencial na embriogênese somática e na maturação de embriões somáticos (Gawroska et al., 2000).

O Fluridone (1-metil-3-fenil-5-[3-(trifluormetil)-fenil]-4(1H)-piridinona) é um inibidor de carotenogênese, da síntese de ABA e seus derivados, sendo comparado ao GA<sub>3</sub> na sua eficiência (Grappin et al., 2000). Estudos em plântulas cultivadas no escuro mostraram que o Fluridone inibe o acúmulo de carotenóides, mas não altera a biogênese de plastídios e a composição das proteínas. Existem evidências que os carotenóides são os principais precursores da síntese de ABA em plantas, sugerindo que ribossomos são essenciais para a

sua síntese em resposta a estresses, e que as enzimas para a síntese do ABA são codificadas por genes nucleares (Popova, 1995).

Em tratamentos relacionados à germinação de sementes dormentes e não-dormentes, a aplicação do Fluridone foi eficiente na germinação das sementes dormentes de *Nicotiana plumbaginifolia*, apesar das baixas concentrações usadas (1-10 $\mu$ M), e nenhum efeito foi verificado nas sementes não-dormentes e em mutantes (*aba1*) com deficiência em ABA (Grappin et al., 2000). Altas concentrações de Fluridone apresentaram resultados semelhantes aos observados em tratamentos com GA<sub>3</sub> nas sementes dormentes. Estudos realizados com *Acca sellowiana* demonstraram que o meio de cultura suplementado com BAP (0,5 $\mu$ M), GA<sub>3</sub> (1 $\mu$ M) e carvão ativado (1,5g L<sup>-1</sup>) aumentaram a conversão de embriões somáticos à plântulas. E embriões somáticos pré-germinados encapsulados em alginato de sódio com BAP (0,5 $\mu$ M) e GA<sub>3</sub> (1 $\mu$ M) desenvolveram radículas, sendo a semente sintética essencial para a sobrevivência das plântulas (Cangahuala-Inocente et al., 2007).

Alguns autores questionam o uso do Fluridone como inibidor da síntese de ABA, na embriogênese somática. Isto porque, a inibição da biosíntese de carotenóides causada pelo Fluridone poderia causar danos letais durante o crescimento da planta devido a importância dos carotenóides no processo de proteção fotossintética dos organismos contra fotooxidação (Amasi et al., 2004).

No Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC, o modelo de embriogênese somática de *A. sellowiana* vem sendo extensivamente estudado. Guerra et al. (1997) desenvolveram um protocolo de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros. Estudos subsequentes foram realizados, visando esclarecer pontos fundamentais no processo de embriogênese somática. (Stefanello et al, 2005; Cangahuala-Inocente, 2004). Aspectos bioquímicos e fisiológicos relacionados com as diferentes fases de desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos, a fim de compreender e otimizar a embriogênese somática, a partir de estudos que avaliaram a resposta de embriões zigóticos submetidos a diferentes concentrações de GABA sendo demonstrada a eficácia deste composto na formação de embriões somáticos a partir da cultura de embriões zigóticos (Booz e Pescador, 2007). Posteriormente, dados inéditos sobre a caracterização morfológica, bioquímica e proteômica, como a função das proteínas, amidos, açúcares, aminoácidos, poliaminas, AIA e ABA, da embriogênese zigótica e somática de *Acca sellowiana*, durante as fases de desenvolvimento dos embriões foram discutidos e aprofundados por Cangahuala-Inocente (2007).

Apesar de embriões somáticos serem obtidos em alta frequência e serem morfológicamente normais, as suas taxas de conversão são ainda baixas (Cangahuala-Inocente et al., 2007). Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos do Fluridone na conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material Vegetal**

Na Estação Experimental da EPAGRI em São Joaquim foram realizados cruzamentos dirigidos entre os acessos 101 e 458 (fonte de pólen) durante todo o período de floração das plantas no ciclo 2006-2007. Frutos imaturos foram coletados aos 120 dias após a polinização e tiveram seus embriões zigóticos excisados. Para isto, a extração e preparação das sementes foram feitas com o auxílio de enzima pectolítica (Endozim ICS 10 Rouge) (1,6ml/kg) (DUCROQUET, comunicação pessoal). Após 12h de tratamento, as sementes foram lavadas em água corrente, separadas da polpa em uma peneira e postas a secar em papel toalha a temperatura ambiente. Quando estavam totalmente secas foram armazenadas em geladeira a 4°C, até o momento da inoculação.

### **2.2 Embriogênese somática**

As sementes de *Acca sellowiana*, 12 horas antes da inoculação, foram submetidas a um tratamento com solução de hipoclorito de sódio 1% e posteriormente lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Posteriormente o tegumento e o hilo foram retirados e os embriões zigóticos, após excisados foram inoculados (20) em placas de petri contendo 30 ml de meio de cultura LPM básico (maltose 3%; vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951), geleificado com phytigel (0,2%), tendo o pH sido ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C a 1ATM por 15 min. procedendo-se a separação dos cotilédones do eixo embrionário. As culturas foram mantidas em sala de crescimento no escuro à temperatura de 25±2°C. Após dois dias, quando já era possível identificar visualmente os cotilédones, os mesmos foram retirados e inoculados aos pares em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura LPM suplementado com 2,4-D (20µM).

### **2.3 Efeitos do Fluridone na conversão dos embriões somáticos**

Para verificar os efeitos de diferentes concentrações de Fluridone na conversão dos embriões somáticos de *A. sellowiana* foram realizados dois experimentos.

### **Resposta dos embriões somáticos ao tratamento com Fluridone.**

Quando os embriões somáticos, originados da cultura de cotilédones em meio de cultura contendo 2,4-D (20 $\mu$ M) alcançaram os estágios torpedo, pré-cotiledonar ou cotiledonar, os mesmos foram inoculados (30) em placas de petri contendo 30ml de meio de cultura LPM, suplementado com sacarose (3%), carvão ativado (1,5%), vitaminas de Morel, BAP (0,5 $\mu$ M), GA<sub>3</sub> (1 $\mu$ M) e Fluridone (0, 1, 5 e 10 $\mu$ M). As culturas foram mantidas em sala de cultura, à temperatura de 25 $\pm$ 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas luminosidade a 50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. A porcentagem de conversão em plântulas foi avaliada aos 15 e 30 dias de cultivo *in vitro*.

### **Concentração ideal de Fluridone para a conversão de embriões somáticos.**

Embriões somáticos foram inoculados (20) em placas de Petri contendo 30ml do meio de cultura citado anteriormente e suplementado com 0,25; 0,5; 1; 1,5 e 2 $\mu$ M de Fluridone. As culturas foram mantidas em sala de cultura, à temperatura de 25 $\pm$ 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas luminosidade a 50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. As avaliações da porcentagem de conversão em plântulas ocorreram aos 15, 30 e 45 dias de cultivo.

Nos dois experimentos, os embriões anormais, que não possuíam um padrão axial de desenvolvimento, não foram considerados na contagem de embriões convertidos a plântulas. O delineamento foi o completamente casualizado sendo os dados avaliados segundo o método Kruskal Wallis a 5% (Seigel e Castellan, 1995).

### 3. RESULTADOS

No primeiro experimento, utilizando o meio de cultura LPM suplementado com BAP (0,5 $\mu$ M) e GA<sub>3</sub> (1 $\mu$ M) como controle, observou-se que tanto aos 15 quanto aos 30 dias de cultivo, o tratamento contendo 1 $\mu$ M de Fluridone resultou em taxa de conversão significativamente maior do que os demais tratamentos. O tratamento contendo 10 $\mu$ M de Fluridone não apresentou nenhum embrião convertido (Tabela 1).

A partir desses resultados um novo ensaio foi realizado, visando aferir a concentração ideal de Fluridone para a conversão dos embriões somáticos. Neste ensaio, foram testadas concentrações próximas a 1 $\mu$ M, a qual resultou em maior porcentagem de conversão. Até os 30 dias de cultivo *in vitro*, não foi observado diferença significativa entre os tratamentos. Somente aos 45 dias os tratamentos contendo 1 e 0,25 $\mu$ M de Fluridone no meio de cultura, apresentaram diferença significativa em relação aos demais (Tabela 2).

A porcentagem de embriões anormais presente no experimento foi muito elevada e como estes não foram considerados durante as avaliações para porcentagem de embriões convertidos a plântulas, a taxa de conversão de embriões somáticos resultou baixa.

**Tabela 1.** Porcentagem de conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* cultivados em meio de cultura contendo BAP, GA<sub>3</sub> e diferentes concentrações de Fluridone (FLU) (n=8).

Tratamentos ( $\mu$ M) BAP (0,5) GA <sub>3</sub> (1)		Embriões convertidos (%)		Total de embriões		
		15 DIAS	30 DIAS	Convertidos (%)	Anormais (%)	Inoculados
FLU	-	2,43 b	5,36 b	8,97	19,51	205
	1,0	6,77 a	9,37 a	16,14	34,89	192
	5,0	0 c	1,85 c	1,85	38,88	216
	10,0	0 c	0 d	-	5,71	210

a, b, c, d – medidas seguidas por índices diferentes na mesma coluna, apresentam diferença significativa para  $p < 0,05$  (Seigel e Castellan, 1995)

**Tabela 2.** Porcentagem de conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* cultivados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Fluridone (FLU) (n=8).

Tratamentos ( $\mu$ M) BAP (0,5) GA <sub>3</sub> (1)		Porcentagem de embriões convertidos (%)			Total de embriões		
		15 dias KW=0,61 n.s	30 dias KW =3,87 n.s	45 dias KW= 9,97 *	Convertidos (%)	Anormais (%)	Inoculados
FLU	0,25	6,45	2,15	4,30a	12,9	38,70	93
	0,50	5,10	6,12	2,04 b	13,26	40,81	98
	1,00	6,25	4,16	4,16 a	14,57	50,0	96
	1,50	4,21	1,05	1,05 c	6,31	51,57	95
	2,00	2,82	1,06	0 d	3,88	55,31	94

a,b,c,d medidas seguidas por letras diferentes na mesma coluna, apresentam diferença significativa para  $p < 0,05$  (Seigel e Castellan, 1995). KW- teste Kruskal-Wallis; n.s- não há diferença significativa \*  $p < 0,05$

Os resultados mostraram que grande parte dos embriões somáticos apresentou anormalidades na sua conversão em plântulas. Foram considerados embriões anormais, os que apenas desenvolveram raízes, os que não apresentavam nenhuma estrutura identificada como cotilédone ou radícula e os embriões que continham somente os cotilédones, um cotilédone único ou mais do que dois cotilédones.



#### 4. DISCUSSÃO

Durante a embriogênese somática, os estágios mais críticos se encontram associados à maturação e conversão dos embriões somáticos (Vries et al., 1997). Neste período, proteínas, lipídios e amido são sintetizados e depositados nos cotilédones, para serem utilizados durante a conversão à plântula (Taiz e Zeiger, 2004).

Em *Acca sellowiana*, estudos anteriores mostraram que o embrião somático tem um comportamento hormonal distinto do zigótico. Durante o início da germinação de embriões zigóticos, os níveis de AIA foram baixos e aumentaram progressivamente. Por sua vez, nos embriões somáticos esses níveis foram altos aos 15 dias de germinação e decresceram posteriormente. Em relação ao ABA, os teores nos embriões zigóticos foram baixos no início da germinação e depois aumentaram significativamente. Nos embriões somáticos, a germinação iniciou com teores muito baixos de ABA, e aos 10 dias estes teores aumentaram cerca de 7 vezes, diminuindo progressivamente até os 30 dias (Cangahuala-inocente, 2007). Esses dados são de extrema importância, pois para que ocorra o desenvolvimento correto do embrião e posteriormente da plântulas, o embrião somático deveria reproduzir ao máximo os processos fisiológicos do embrião zigótico (Guerra et al., 1999).

Buscando compensar as deficiências já detectadas no embrião somático de *A. sellowiana*, várias estratégias já foram empregadas. Utilizando a técnica de sementes sintéticas, os embriões somáticos pré-germinados e encapsulados com um endosperma artificial, converteram-se em plântulas, porém a taxa de embriões pré-germinados permaneceu baixa. Neste mesmo estudo, verificou-se que o meio de cultura LPM contendo (0,5  $\mu\text{M}$ ) BAP e (1,0  $\mu\text{M}$ ) GA<sub>3</sub> foi o que resultou em uma maior taxa de embriões pré-germinados (24,5%) (Cangahuala-Inocente, 2002). No entanto, no presente trabalho, quando comparados os meios de cultura LPM contendo 0,5  $\mu\text{M}$  e 1,0  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>, com e sem a suplementação de Fluridone, observou-se que a taxa de germinação aumentou em resposta ao Fluridone. Na germinação de embriões somáticos de *Medicago sativa*, o Fluridone apresentou leve efeito estimulatório em uma concentração de 1 $\mu\text{M}$  (Kecpczynska e Zielinska, 2006). As autoras concluíram que os embriões somáticos de *M. sativa* provavelmente tinham altos conteúdos de ABA, acumulados durante a fase da maturação quando foram submetidos a tratamentos com ABA exógeno.

Em algumas espécies, os níveis de ABA na semente são altos até a maturação, e o potencial de germinabilidade está correlacionado com a diminuição do ABA endógeno ao final da maturação. Altos teores de ABA nesta fase podem inibir a mobilização de reservas, prejudicando a germinação por deficiência nutricional (Finkelstein et al., 2002). Durante a maturação do embrião somático de *Acca sellowiana*, no estágio cotiledonar os níveis de ABA

foram menores que no estágio torpedo, porém a diminuição não foi tão significativa (Cangahuala-Inocente, 2007). Esses teores de ABA em *Acca sellowiana*, provavelmente bloqueiam a mobilização de reservas e os embriões não conseguem germinar.

O Fluridone como um inibidor da síntese de ABA pela inativação da zeaxantina, pode favorecer a germinação, ou quando empregado em altas concentrações, pode inibi-la (Kepczynska e Zielinska, 2006). Neste caso o Fluridone nas concentrações de 100µM inibiu 70% da germinação dos embriões somáticos de *M. sativa*. Essas autoras verificaram também que, durante a conversão das plântulas, as concentrações de 10 e 100µM de Fluridone resultaram em albinismo dos embriões e na sua não conversão. Isso indica que o Fluridone inibe não somente a síntese de ABA, mas também de clorofila. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados neste trabalho, onde no tratamento contendo 10µM de Fluridone no meio de cultura, não apresentou germinação dos embriões somáticos. Isto indica que os embriões somáticos de *A. sellowiana* são sensíveis a altas concentrações de Fluridone. Porém, os resultados obtidos não permitem inferir que a baixa germinação dos embriões somáticos de *A. sellowiana* possa ser atribuído a este fator, visto que houve uma alta taxa de embriões somáticos anormais em todos os tratamentos o que pode ter resultado na baixa taxa de conversão dos embriões. A alta taxa de embriões anormais pode ter sido resultante do estresse químico imposto, durante a indução da embriogênese somática, pela presença do 2,4-D (Guerra et al., 1999). Em muitos casos, a auxina é requerida para a indução de embriogênese somática mas é inibitória para o desenvolvimento dos embriões somáticos (Raí et al., 2007). Outros autores sugerem que as auxinas podem modificar a estrutura tri-dimensional de lipídios de membranas e influencia no transporte e/ou detecção de sinais químicos em nível de membrana. Tem sido demonstrado que a aplicação de altas concentrações de 2,4-D resulta em altos teores de etanol e etileno, os quais causam um efeito repressivo sobre a indução da embriogênese somática. E que as populações de células embriogênicas provavelmente decrescem e perdem seu potencial embriogênico, devido a disrupção e alongação das células, causadas por altas concentrações de auxinas aplicadas ao meio de cultura de indução (Singh e Chand, 2003). Evidências adicionais mostram que, em outras espécies, tais como *Acer palmatum* (Vlasinova e Havel, 1999) *Hardwickia binata* (Chand e Singh, 2001), quando a embriogênese somática é induzida por estresse químico com o 2,4-D, embriões anormais são formados (Singh e Chand, 2003).

Em resumo, os dados deste trabalho mostraram que o fluridone tem potencial como inibidor da síntese ABA nos embriões somáticos de *Acca sellowiana*, podendo aumentar a

taxa de conversão. Porém, ainda há um expressivo número de embriões anormais sendo produzido, o que impede a conversão normal destes embriões somáticos em plântulas.

## 5.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BHATTACHARYA, A.; SHARMA, P.; PANDEY, S.; NAGAR, P.K.; AHUJA, P. S.; ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze **Journal of Plant Physiology**, v.161, p. 1269-1276, 2004.

BOOZ, M. R. e PESCADOR, R. Efeito do Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Gaba) na Embriogênese Somática de *Acca sellowiana* (Myrtaceae) **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 198-200, 2007

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

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.; TORRES A. C.; GUERRA M. P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds **Scientia Horticulturae**, v.111, p. 228-234, 2007.

CHAND, S. e SINGH, A. K. Direct somatic embryogenesis from zygotic embryos of a timber-yielding leguminous tree, *Hardwickia binata* Roxb. **Current Science**, v. 80, p. 882-887, 2001

CHO H.; COSGROVE D. J. Biosynthesis, Signal Transduction, Action **Plant Hormones** ed. by Peter J Davies, KLUWER, Dordrecht, p.262-281 2004.

DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Organogênese e micropropagação da goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.21, p.60-64, 1999.

DUCROQUET, J. P. H. J.; HICKEL, E. R.; NODARI, R. O. Goiabeira-Serrana (*Feijoa sellowiana*). **Sociedade Brasileira de Fruticultura/FUNEP**, 1. ed. v.5, 66p. 2000

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L.; ROCK, C.D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **Plant Cell**, v.14, p. 15-45, 2002.

GAWRONSKA H.; BURZA W.; BOLESTAB E.; MALEPSZYB S. Zygotic and somatic embryos of cucumber (*Cucumis sativus* L.) substantially differ in their levels of abscisic acid. **Plant Science**, v.157, p. 129-137, 2000.

GRAPPIN, P.; BOUINOT, D.; SOTTA, B.; MIGINIAC E.; JULLIEN, M. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. **Planta**, v.210, p. 279-285, 2000.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS M. S. Somatic Embryogenesis In Goiabeira Serrana: Genotype Response, Auxinic Shock And Synthetic Seeds **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p. 117-128, 2001.

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

KAMADA H.; HARADA H., Changes in the endogenous level and effect of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L, **Plant Cell Physiology**, v.22, p. 1423-1429, 1981.

KAUR-SAWHNEY, R.; TIBURCIO A. F.; ALTABELLA, T.; GALSTON, A. W. Polyamines in plants: An overview **Journal of Cell and Molecular Biology**, v.2, p.1-12, 2003.

KEPCZYNSKA, E.; ZIELINSKA, S. Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryos regeneration by gibberellin A3 and abscisic acid in relation to starch content and a-amylase activity **Plant Growth Regulation**, v. 49, p. 209-217, 2006.

KERMODE, A. R. Role of abscisic acid in seed dormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.24, p.319-344, 2005.

KOAG, M. C.; FENTON, R. D.; WILKENS, S.; CLOSE, T. J. The binding of maize DHN1 to lipid vesicles: gain of structure and lipid specificity. **Plant Physiology**, v.131, p. 309–316, 2003.

- POPOVA L. Effect of Fluridone on Plant Development and Stress-Induced ABA Accumulation in *Vicia Faba* L. Plants **Journal of Plant Physiology**, v.21, p. 42-50, 1995.
- RAI, M. K.; AKHTAR, N.; JAISWAL, V.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 129-133, 2007.
- SINGH, A. K. e CHAND, S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree, *Dalbergia sissoo* Roxb. **Journal of Plant Physiology**, v.6, p. 415-421, 2003.
- SHARP, R.E., LENOBLE, M.E.; ELSE, M.A.; THORNE, E.T.; GHERARDI, F. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: Evidence for an interaction with ethylene. **Journal Experimental Botany**, v.51, p. 1575-1584, 2000.
- STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 117-126, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 719p. 2004.
- TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; BORRELL, A.; MASGRAU C. Polyamine metabolism and its regulation. **Physiology Plantarum**, v.100, p. 664-674, 1997.
- VRIES, S C.; TOONEN, M A J.; MORDHORST, A P. Plant Embryogenesis. **Plant Science**, v.16, p. 535-576, 1997.

## **CAPÍTULO 2**

Níveis endógenos de AIA/ABA e Poliaminas em sementes de *Acca sellowiana* oriundas de diferentes tipos de polinização.

## RESUMO

A goiabeira serrana é uma espécie alógama e suas sementes são ortodoxas e podem ser armazenadas por longos períodos sem perder o poder germinativo. Na goiabeira-serrana atuam mecanismos de auto-incompatibilidade de ação tardia. Estudos realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, mostraram que o modo de polinização interfere na germinação das sementes, sendo a melhor taxa de germinação obtida com sementes oriundas de polinização entre plantas de mesma classe de DEA (DEA 3). O Ácido abscísico é conhecido como um hormônio vegetal importante em diversos eventos vegetais, e principalmente na maturação de sementes. As PAs desempenham papéis importantes na proliferação e diferenciação celular e estabilização da membrana, sendo fundamentais durante a germinação. AIA é o mais conhecido hormônio do grupo das auxinas e participa no controle de várias fases do crescimento e diferenciação. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar se diferentes métodos de polinização podem afetar os níveis endógenos de ABA, AIA e Poliaminas no embrião, tegumento e semente inteira de *Acca sellowiana*. Para as análises de teores endógenos, sementes oriundas de polinização de mesma classe de DEA3 e polinização natural, foram submetidas ao método de extração descrito por Kojima (1996) para ABA e AIA, e de Silveira (2004) para Poliaminas. As quantificações de ABA, AIA e Poliaminas, foram realizadas em HPLC em fase reversa, com coluna C18 (Shimadzu SHIM-pack CLC ODS). Os maiores níveis de ABA foram detectados nas sementes de polinização de mesma classe de DEA3. Sendo que a maior parte da concentração de ABA está presente no tegumento da semente. Para AIA os maiores teores foram observados em sementes de polinização natural. Os embriões zigóticos de polinização de mesma classe, apresentaram maiores níveis de PAs totais, sendo Spd, a PA mais abundante. Os resultados confirmam, através dos teores endógenos dos reguladores de crescimento encontrados, o fato de sementes oriundas de polinização de mesma classe apresentarem maiores taxas de germinação, e também que o modo de polinização influencia na síntese endógena de hormônios vegetais.

Palavras chaves: Polinização, *Acca sellowiana*, germinação, ácido abscísico, poliaminas, ácido indol-acético.



## ABSTRACT

*Acca sellowiana* is an allogamous species and its seeds are orthodox, thus being possible to be stored for long time without losing their viability. In *A. sellowiana* self-incompatibility mechanisms of late action was described. Studies at Laboratory of Physiology of Plant Genetics and Development, of Federal University of Santa Catarina showed that the mating system affects the seed germination, and that enhanced germination rates are obtained from seeds whose flowers were pollinated between plants same class of DEA (DEA 3). ABA is known to play important roles in several events, especially in the maturation of seeds. On the other side the PAs, play important roles in cell differentiation and proliferation and to stabilize the membrane, essential for seed germination. Finally, AIA is the best known of the group of auxin hormone and participates in the control of growth and differentiation. In this way, the purpose of this study was to investigate whether different methods of pollination can affect the levels of endogenous ABA, IAA and PAs in the embryo, coat and whole seed of *Acca sellowiana*. For the analysis of endogenous levels, seeds from pollination of the same class of DEA3 and natural pollination, were submitted to the method of extraction described by Kojima (1996) for ABA and IAA, and Silveira (2004) for PAs. The quantification of ABA, IAA and PAs were carried out in reverse-phase HPLC with C18 column (Shimadzu SHIM-pack CLC ODS). The higher levels of ABA were detected in the seeds of pollination of the same class of DEA3. Most of ABA was found in the seed coat is. Higher levels of IAA were observed in seeds from natural pollination. The zygotic embryos from pollination of the same class showed high levels of total PAs, being Spd the most abundant. The results confirm that seed from flower pollinated with the same class have higher rates of germination than other mating systems, and also that the method of pollination influences on the synthesis of endogenous plant hormones.

**Keywords:** Pollination, *Acca sellowiana*, germination, abscisic acid, polyamines, indole-acetic acid.

## 1.INTRODUÇÃO

A goiabeira-serrana é uma espécie alógama e suas sementes são ortodoxas, podendo ser armazenadas em baixas temperaturas por longo período, mantendo seu poder germinativo (Ducroquet et al., 2000). Estas sementes são também fotoblástica positivas e quando germinadas em estufa BOD, com iluminação e temperatura constantes (15, 20, 25, 30°C), apresentam uma germinabilidade de 76%. Se germinadas no escuro, com temperaturas alternadas de 15-30°C, a taxa de germinação máxima é reduzida a 48% (Santos et al., 2007). Suas flores apresentam variabilidade na distância entre estigma e antera (DEA) (Degenhardt et al., 2001; Finardi, 2003), que constituem três classes: DEA1, com distância entre estigma e antera de 0 e 0,4cm; DEA2, com distância de 0,5 e 0,9 cm e DEA3 com 1,0 e 1,4 cm de distância. Há também diferença em relação à disposição dos estames nas flores podendo a distribuição ser aleatória (classe A) ou radial (classe B) (Degenhardt et al., 2001).

Na goiabeira-serrana atuam mecanismos de auto-incompatibilidade de ação tardia, ou seja, ocorre após a penetração dos tubos polínicos no saco embrionário (Santos et al., 2007; Finatto, 2008). Observou-se também, que há formação do zigoto e desenvolvimento do endosperma em torno do 25º dia, em plantas onde foram realizadas as polinizações cruzadas e geitonogâmicas. Nesta última, os ovários tiveram abscisão aos 30 dias após a polinização. As sementes oriundas de polinização cruzada com pólen de acessos DEA1, 2 e 3, tanto nos acessos auto-compatíveis quanto nos auto-incompatíveis, para as três classes de DEA, apresentaram maior taxa de germinação (~71%) (Finatto, 2008). Outros estudos realizados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (Dados não publicados), mostraram que o modo de polinização interfere na germinação das sementes, sendo a melhor taxa de germinação obtida com sementes oriundas de polinização entre plantas de mesma classe de DEA (DEA 3), e a pior com polinização natural, o que confirma os resultados encontrados por Finatto (2008).

O ácido abscísico é conhecido como um hormônio vegetal importante na tolerância à perda de água, fechamento estomático e sinalização nas células-guarda prevenindo a perda de água (Finkelstein et al., 2002), e principalmente na maturação de sementes promovendo o acúmulo de reservas (Bonetta & Mc Court, 1998). O aumento de ABA em sementes ortodoxas estimula a síntese de antocianinas e de lipídios de reserva, implicando na maturação e desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos (Pense, 1992). Sabe-se também que ABA induz uma cascata de eventos ligados a germinação, influenciando a acumulação de proteínas de reserva, ácidos graxos e altos níveis de amido (Bhattacharya et al., 2004).

As PAs, aminas alifáticas, que desempenham papéis importantes nos processos ligados a proliferação e diferenciação celular e estabilização da membrana (Bouchereau et al., 1999; Bais e Ravishankar, 2003; Kusano et al., 2008), podem também regular a morte celular, particularmente a apoptose (Kusano et al., 2008). Sendo assim, fundamentais durante a germinação (Bais e Ravishankar, 2003).

A adição de inibidores de PA ao meio de cultura durante a germinação inibe a brotação e a formação de flores de tabaco, fato revertido com a adição de Spd exógena. Isso mostra o envolvimento desta PA a Spd no desenvolvimento e iniciação floral (Kaur-Sawhney et al., 2002). Em plantas de tabaco mutante (*rmb7*) que não produziam flores não foram detectadas PAs conjugadas, o que sugere que elas são transportadas para os ápices meristemáticos em direção às gemas florais e induzem a floração (Martin-tanguy, 2001). Estudos com sementes de *Arabidopsis*, mutantes duplos para genes de síntese de Spd, indicaram a importância da Spd no desenvolvimento de embriões (Imai et al., 2004). E em plantas transgênicas de tabaco observou-se que elevados níveis de Put se tornam tóxicos prejudicando seu crescimento e desenvolvimento (Kuznetsov et al., 2006).

Em *Arabidopsis thaliana* o AIA induz a codificação do gene *ACL5* para síntese de Spm, o qual não é induzido pelo ABA ou Giberelina. A inativação deste gene retarda o alongamento do meristema e suprime a expansão celular. As enzimas envolvidas na formação de Spm e Spd são expressas diferentemente quando estimuladas com ABA, estresse salino ou osmótico (Kuznetsov et al., 2006).

AIA é o mais conhecido hormônio do grupo das auxinas e participa no controle de várias fases do crescimento e diferenciação (Bryant e Lane, 1979). Em *Cichorium intybus* estudos relacionando as PAs com teores de AIA endógeno de raízes de durante a morfogênese, indicaram uma forte correlação entre as PAs aplicadas na cultura e os níveis de AIA endógenos detectados, onde o incremento de Spd inibiu a síntese de AIA e a Put estimulou altos níveis (Bais e Ravishankar, 2003).

O objetivo do presente trabalho foi estudar se diferentes métodos de polinização podem afetar os níveis endógenos de ABA, AIA e Poliaminas no embrião, tegumento e semente inteira de *Acca sellowiana*.

## **2.MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

As sementes utilizadas no experimento foram oriundas de frutos obtidos a partir de diferentes tipos de polinização realizados nos acessos 755 e 85 do Banco de Germoplasma na Estação Experimental da EPAGRI em São Joaquim, os quais possuem as flores com classificação DEA3 (distância entre estigma e antera de 1,0 e 1,4 cm). Os tipos de polinização realizados por Finatto (2008) foram: polinização natural (PN), polinização cruzada (PC) e polinização de mesma classe (PMC) DEA3 (o pólen e a planta-mãe pertencentes à classe DEA3). Estudos subseqüentes no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, definiram dois tipos de polinização contrastantes em relação à taxa de germinação das sementes, que foram PN (85%) e PMC (98%). A partir desses resultados, as sementes foram coletadas para análise hormonal de ABA e AIA e permaneceram armazenadas em geladeira (10°C) até o momento do seu processamento.

As sementes foram abertas com o auxílio de lupa, pinça e bisturi, para separar o tegumento (T) e embrião (E). Estes foram coletados separadamente em tubos (2ml), contendo para a análise de ABA/AIA 1g e para análise de PAs 0,2g (em triplicata). Sementes inteiras (I) também foram coletadas para análise.

### **2.2 Quantificação de ABA, AIA e Poliaminas**

#### **2.2.1 ABA e AIA**

A metodologia utilizada foi a descrita por Kojima (1996), com modificações (Silveira et al., 2004). A matéria fresca (1g) foi macerada com nitrogênio líquido, sobre o gelo, e adicionados 3 ml de tampão de extração (Etanol 80% + 1% PVP-40). O extrato foi transferido para tubos (15ml), juntamente com 2ml de tampão de extração utilizado para lavar o resíduo do graal. Ao extrato foi adicionado 100 µl de solução [<sup>3</sup>H] AIA e 100 µl de solução [<sup>3</sup>H] ABA. O extrato foi agitado por 1:30 horas, em shaker, resfriado e no escuro. Após agitação foi centrifugado a 4°C, por 15 min., a 11000 rpm (15500x g). O sobrenadante foi transferido para outro tubo (15ml) e armazenado a -20°C. A amostra foi então concentrada em “speed vac”, a 45°C, até atingir 20% do volume inicial ( $\leq 1,0$  mL) ( $\pm 2:30$  horas). Os volumes das amostras foram equilibrados em balança para 3ml com água Milli’Q. Ácido clorídrico (HCl 1N) foi adicionado as amostras até atingir o pH 2,5. As amostras foram então colocadas em funil de separação para particionamento (em capela). No tubo respectivo a amostra

particionada, foi adicionado 6ml de éter etílico para lavagem do mesmo, e transferida para o funil para se juntar com a amostra. O funil foi agitado e deixado descansar por poucos segundos, a fase aquosa (inferior) foi coletada em um Becker e a fase orgânica devolvida ao seu respectivo tubo. A fase aquosa foi devolvida ao funil, e acrescentado 6ml de éter etílico, a nova fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi acrescentada a primeira no tubo. O tubo contendo as fases orgânicas foi banhado em N líquido por ~10 segundos e transferido seu conteúdo para outro tubo (15ml), o qual foi colocado em “speed vac”, a 45°C, até secar totalmente (30 minutos). O pellet foi ressuscitado em 300µl de Metanol (MeOH), sendo agitado por 2 minutos. A amostra foi transferida, com o auxílio de micropipeta P1000 para um tubo (1,5ml) devidamente identificado, armazenado em uma temperatura de -20°C, até o momento da análise em HPLC.

As quantificações de ABA e AIA foram realizadas em HPLC em fase reversa, com coluna C18 (Shimadzu SHIM-pack CLC ODS). Como eluentes utilizou-se a solução 10% MeOH/0,5% HAc (ácido acético glacial) (eluente A) e metanol 100% (eluente B). O detector de UV foi ajustado em 254nm, para detecção de ABA. Para detecção de AIA, o detector de fluorescência foi ajustado para excitação em 280nm, e emissão em 350nm. A coluna foi equilibrada com 20% do eluente B, e a temperatura do forno para 40°C. O fluxo dos eluentes foi de 1ml/min, e o gradiente de metanol foi ajustado para atingir 100% em 60 min. Foram injetados 40µl de amostra. O tempo de retenção do ABA foi de aproximadamente 21.57 minutos, e do AIA 29.29 min. As frações contendo AIA e ABA foram coletadas e analisadas por cintilação líquida (PACKARD modelo Tri-carb 2100 TR), para estimativa de perdas. As áreas e os tempos de retenção do AIA e do ABA foram comparadas com concentrações padrões destes hormônios.

### **2.2.2 Poliaminas**

A metodologia usada foi a descrita por Silveira et al. (2004), com modificações. Aproximadamente 0,2g de matéria fresca foram maceradas com nitrogênio líquido até formar um pó, este foi remacerado com 1,4ml de ácido perclórico 5% (PCA5%), deste 0,7ml foram usados para maceração em si, e o restante foi usado para lavar o resíduo do graal. O extrato foi colocado em tubo (2ml) e repousou por 1h. O extrato foi então centrifugado a 20000g durante 2 min. a 4°C. o sobrenadante foi armazenado, e o pellet ressuscitado em 0,2ml de PCA 5%, e novamente centrifugado (20000g/4°C/20min.). O sobrenadante foi coletado e juntamente com o primeiro homogeneizado. O precipitado foi descartado. Para extrair as

poliaminas conjugadas solúveis, 200µl do sobrenadante foi coletado e acrescentado 200µl de HCl concentrado (12N), os tubos foram vedados e aquecidos a 110°C por 18 horas. Para poliaminas livres, o restante do sobrenadante foi congelado para futura dansilação. Após 18 horas de aquecimento (poliaminas conjugadas) as amostras foram secas com jato de N<sub>2</sub> a 40° C e o pellet ressuscitado em 180µl de PCA. As amostras foram congeladas para posteriores dansilação.

A dansilação das poliaminas livres e conjugadas, se deu coletando 40µl de cada amostra de poliaminas (livres/ conjugadas) e colocando em um tubo de 500µl, onde foram adicionados 20µl de Diaminoheptano (DAH) 0,05mM, 50µl de solução saturada de carbonato de sódio e 100µl de solução de cloreto de Dansyl (5mg/ml de acetona-1,8mM), os tubos foram lacrados e homogeneizados. As amostras foram incubadas no escuro por 50 minutos a temperatura de 70°C. Após a incubação, adicionou-se 25µl de solução de prolina (100mg/ml de água Milli'Q) foram homogeneizados e incubados no escuro por 30 min. a temperatura ambiente. 220µl de tolueno foram adicionados e as amostras agitadas. Foram coletados 175µl da fase orgânica (superior) e secada em “speed vac” aquecida a 40°C. O pellet foi ressuscitado em 175µl de acetonitrila e armazenada em freezer até o momento da quantificação.

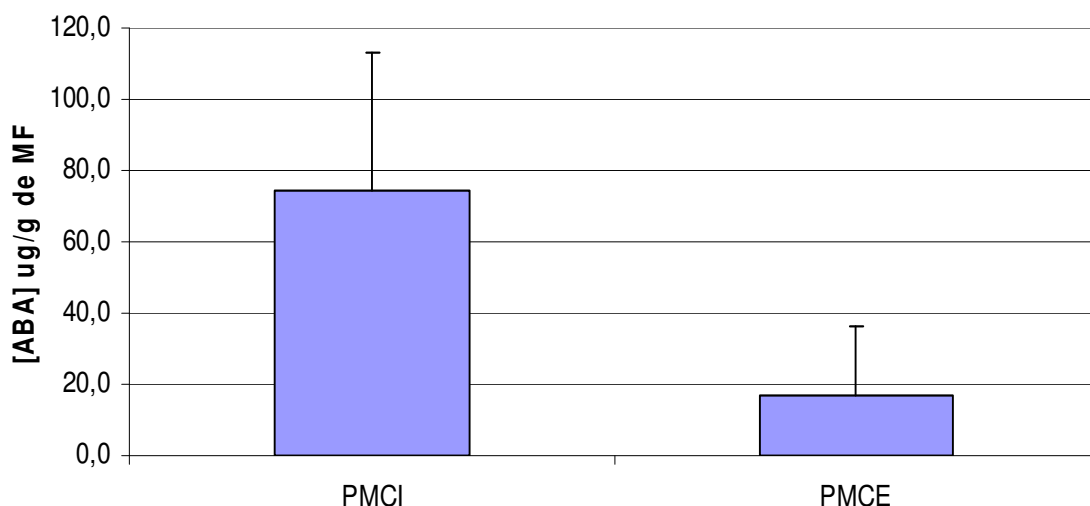
A identificação e quantificação das PAs foram realizadas utilizando-se HPLC com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu SHIM-pack CLC ODS). Como eluentes utilizou-se acetonitrila pura (orgânica) e acetonitrila 10% (inorgânica), com pH ajustado com HCl 1N A coluna foi calibrada com 65% de acetonitrila, com um fluxo de 1ml/min., atingindo 100% aos 25 min, permanecendo por 35 min. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 340nm e emissão de 510nm. Foram injetados 20µl de amostras. As áreas e os tempos de retenção de cada PA foram avaliadas por comparação com padrões de concentrações de PAs conhecidas, como, Put, Spd, Spm, DAH.

### 3. RESULTADOS

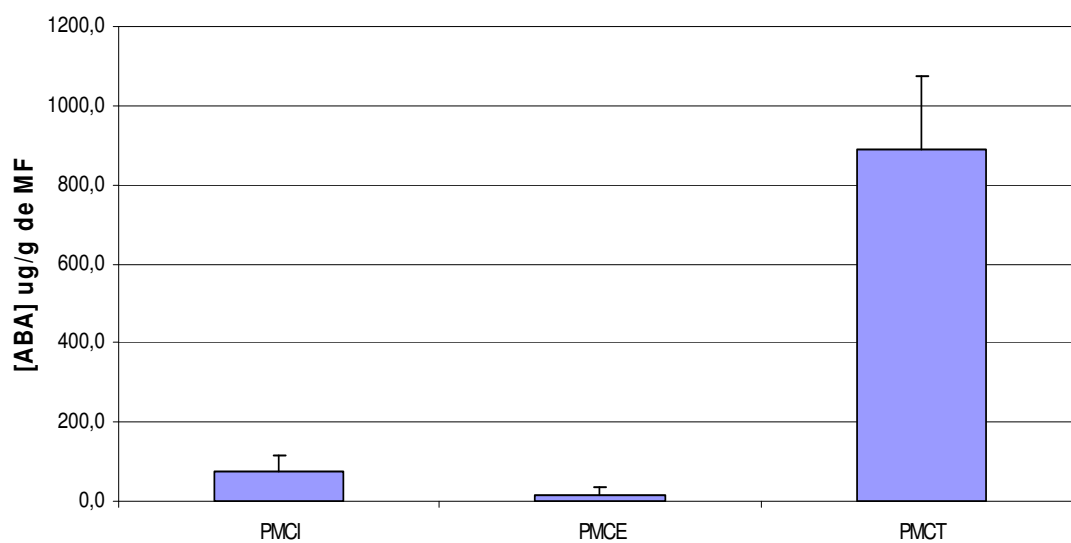
#### 3.1 ABA e AIA

Nas análises realizadas para verificar os teores de ABA presentes no embrião (PMCE) e na semente inteira (PMCI) de polinização de mesma classe, verificou-se que o teor de ABA na semente inteira (74,39 $\mu$ g/g) foi significativamente maior que no embrião (16,7 $\mu$ g/g) (Figura 1). Existindo essa diferença considerável entre a semente inteira e o embrião, procedeu-se a dosagem do ABA a partir de duas amostras de tegumento retiradas durante a coleta do embrião. Os resultados mostraram que o teor de ABA no tegumento foi superior aquele encontrado no embrião (889,12 $\mu$ g/g), apesar da quantidade de amostra analisada ser menor (0,35g) do que o requerido para a análise (1g) (Figura 2).

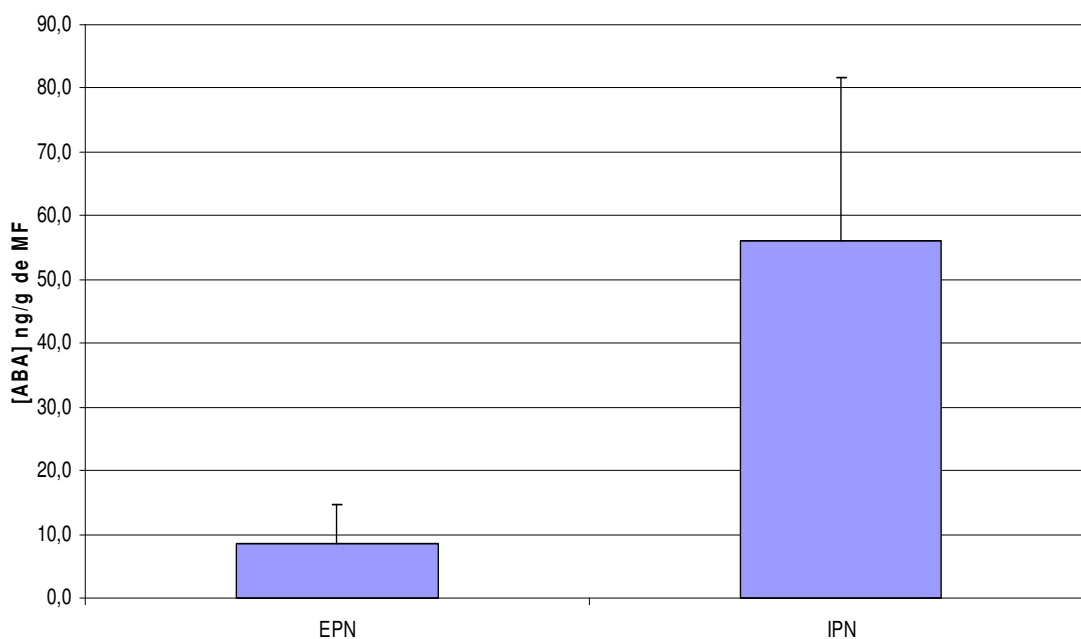
Para os teores de ABA das amostras de polinização natural (PNE, embrião polinização natural; PNI, semente inteira polinização natural), os valores foram bem menores que os encontrados nas amostras de PMC. Porém, a semente inteira permaneceu com nível de ABA endógeno significativamente maior que do embrião (56,0 e 8,5 ng/g, respectivamente) (Figura 3).



**Figura 1.** Concentração média de ABA no embrião e na semente inteira de *Acca sellowiana*, originados a partir de polinização de mesma classe de DEA (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). \* I-semente inteira; E-embrião; PMC-polinização de mesma classe de DEA



**Figura 2.** Concentração média de ABA no embrião, no tegumento e na semente inteira de *Acca sellowiana*, a partir da polinização de mesma classe de DEA (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). \* I-semente inteira; E-embrião; T-tegumento; PMC-polinização de mesma classe de DEA



**Figura 3.** Concentração média de ABA no embrião e na semente inteira de *Acca sellowiana* a partir de polinização natural (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). \* I-semente inteira; E-embrião; PN-polinização natural



Os resultados mostraram claramente o aumento dos níveis de ABA em sementes oriundas de polinização, empregando o pólen da mesma classe de DEA da planta-mãe (Tabela 3).

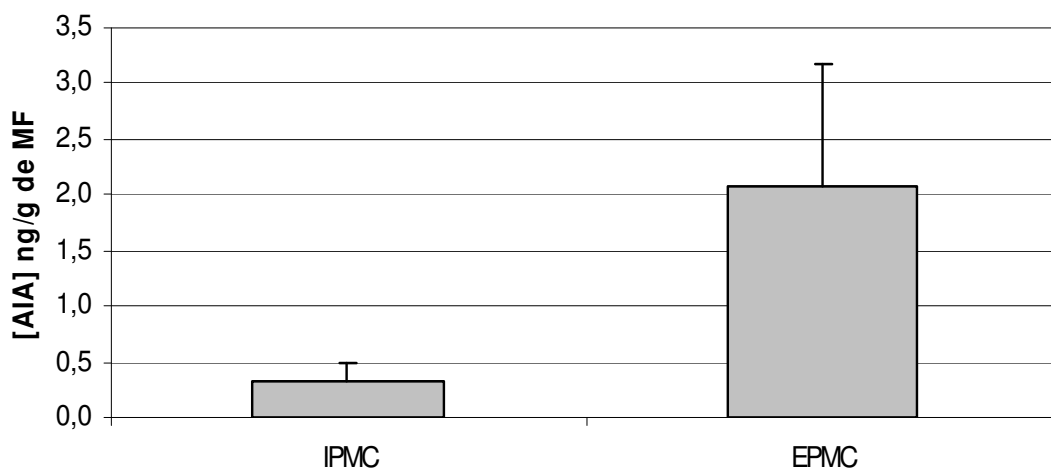
**Tabela 3.** Médias das concentrações de ABA do embrião e da semente inteira de *Acca sellowiana* nos diferentes tipos de polinização.

Tipo de polinização*	Embrião		Semente inteira	
	Média (ng/g de MF)	Desvio Padrão (%)	Média (ng/g de MF)	Desvio Padrão (%)
<b>PMC</b>	<b>16681,8</b>	118,26	<b>74392,9</b>	51,99
<b>PN</b>	<b>8,5</b>	70,81	<b>56,0</b>	46,26

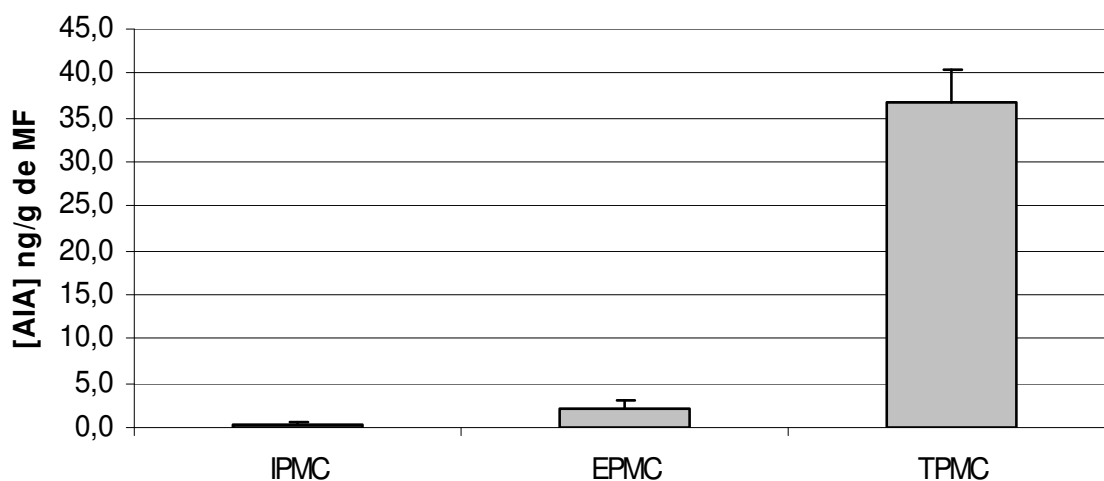
\*(PMC= Polinização de Mesma Classe; PN= Polinização Natural)

As análises de AIA para polinização de mesma classe (PMC), no embrião e na semente inteira revelaram que o embrião apresentou os maiores teores de AIA (2,1 ng/g) em relação à semente inteira (0,3 ng/g) (Figura 4). Porém, quando analisado o tegumento, verificou-se que a maior concentração de AIA se encontra no mesmo (36,7 ng/g) (Figura 5). Nas análises de polinização natural os maiores índices de AIA foram encontrados na semente inteira, com 27,4 ng/g de massa fresca, sendo que o embrião apresentou somente 3,0 ng/g (Figura 6), ou seja, o resultado foi o inverso do encontrados nas amostras de PMC (Tabela 4).

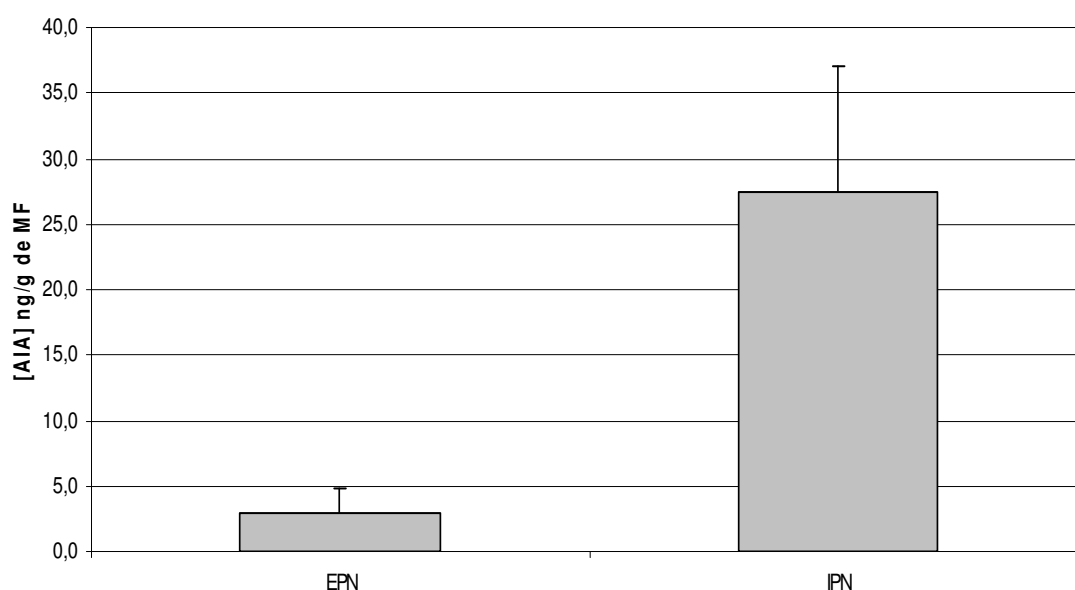
Comparando as análises de ABA e AIA, percebe-se que os resultados foram inversos, e muito diferentes quanto á quantidade, onde as concentrações de ABA foram muito superiores aos valores encontrados de AIA.



**Figura 4.** Concentração média de AIA no embrião e na semente inteira de *Acca sellowiana*, a partir de polinização de mesma classe de DEA (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). \* I-semente inteira; E-embrião; PMC-polinização de mesma classe de DEA



**Figura 5.** Concentração média de AIA no embrião, no tegumento e na semente inteira de *Acca sellowiana*, a partir de polinização de mesma classe de DEA (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). \* I-semente inteira; E-embrião; T-tegumento; PMC-polinização de mesma classe de DEA



**Figura 6.** Concentração média de AIA no embrião e na semente inteira de *Acca sellowiana*, originados a partir de polinização natural (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). \* I-semente inteira; E-embrião; PN-polinização natural

**Tabela 4.** Médias das concentrações de AIA no embrião e na semente inteira de *Acca sellowiana* em resposta aos diferentes tipos de polinização.

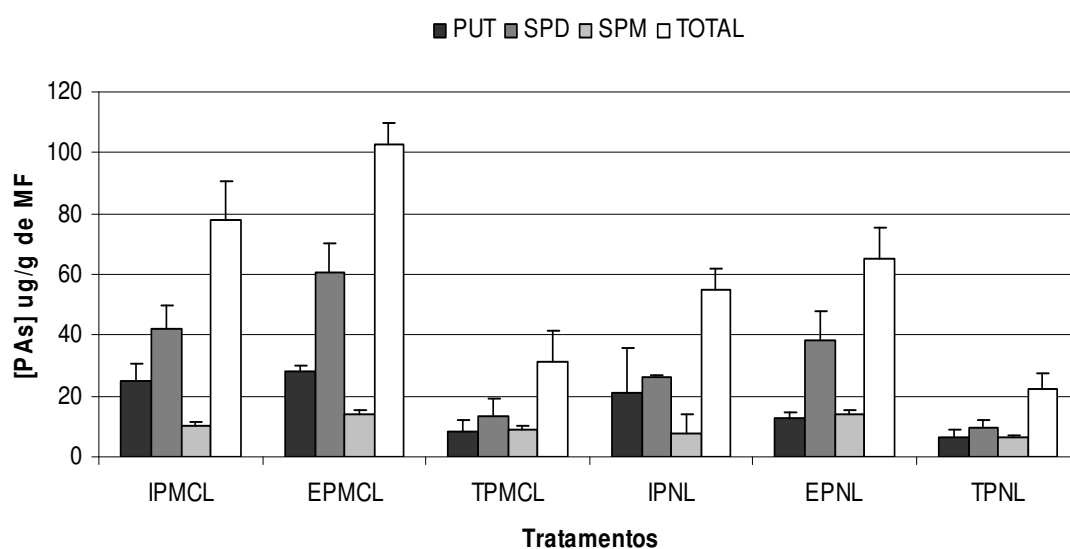
Tipo de polinização*	Embrião		Semente inteira	
	Média (ng/g de MF)	Desvio Padrão (%)	Média (ng/g de MF)	Desvio Padrão (%)
PMC	<b>2,1</b>	52,60	<b>0,3</b>	55,62
PN	<b>3,0</b>	62,55	<b>27,4</b>	35,37

\*(PMC= Polinização de Mesma Classe; PN=Polinização natural)

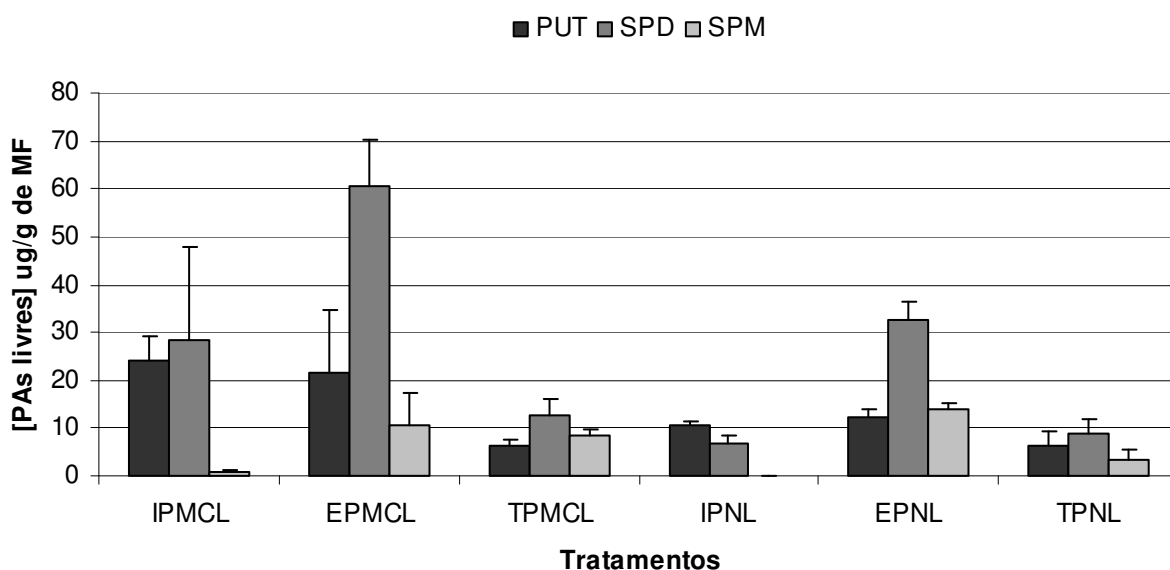
### 3.2 Poliaminas

Os maiores níveis de PAs totais foram encontrados nos embriões originados de sementes de plantas com polinização de mesma classe (EPMCL), seguido da semente inteira de polinização de mesma classe (IPMCL), e só então nas amostras de polinização natural (EPNL; IPNL) e nos tegumentos (TPMCL; TPNL). A Spd foi a PA mais abundante com maior concentração detectada em EPMCL (Figura 7). A Spd foi a PA livre predominante,

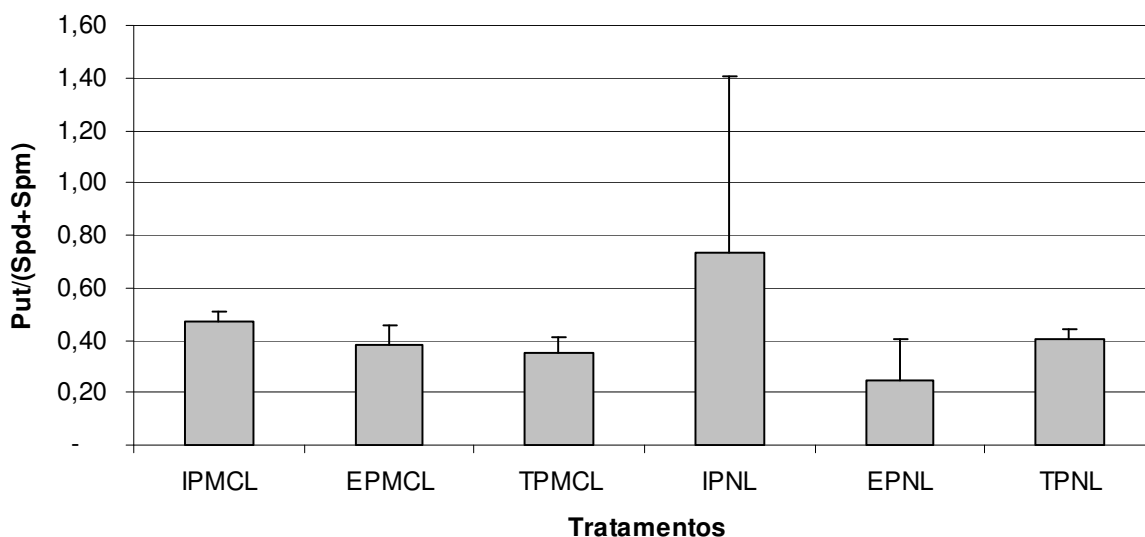
principalmente no tratamento EPMCL e exceto no IPNL, no qual a Put teve maior concentração (Figura 8). A relação Put/(Spd+Spm) nos diferentes tratamentos foi baixa na maioria dos tratamentos, variando entre 0,2 e 0,5, sendo que o tratamento IPNL foi o que apresentou a maior relação atingindo 0,47 (Figura 9). As concentrações de PAs conjugadas (Figura 10) apresentaram um padrão de distribuição variável. No tratamento IPNL se encontrou a maior concentração de PAs, onde a Spd continuou superior entre as demais, estando esta, porém ausente no tratamento EPMCL, da mesma forma que a Spm no EPNL e a Put em TPNL.



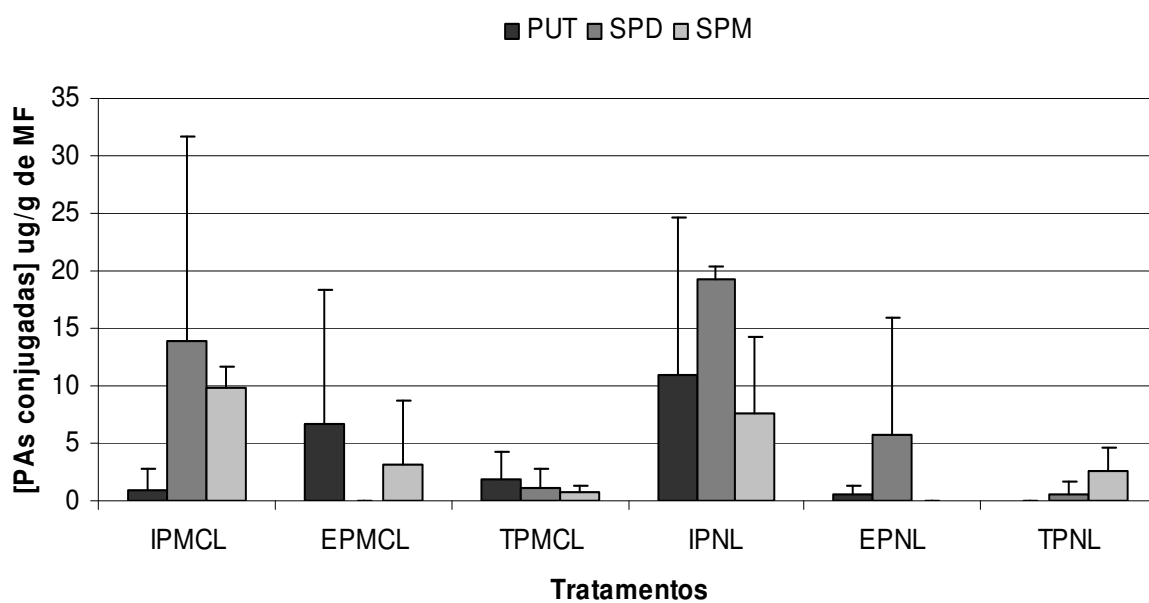
**Figura 7.** Concentrações de Poliaminas totais na semente de *Acca sellowiana*, oriundos de polinização de mesma classe e natural (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). \*I-semente inteira; E-embrião; T-tegumento; PMCL-polinização de mesma classe de DEA; PNL-polinização natural.



**Figura 8.** Concentrações de Poliaminas livres na semente de *Acca sellowiana* oriundas de polinização de mesma classe e natural (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). \*I-semente inteira; E-embrião; T-tegumento; PMCL-polinização de mesma classe de DEA; PNL-polinização natural.



**Figura 9.** Razão de Put/(Spd+Spm) na semente de *Acca sellowiana* em resposta a diferentes tipos de polinização, (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). \*I-semente inteira; E-embrião; T-tegumento; PMCL-polinização de mesma classe de DEA; PNL-polinização natural.



**Figura 10.** Concentrações de PAs conjugadas na semente de *Acca sellowiana* resultante dos diferentes tipos de polinização, (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). \*I-semente inteira; E-embrião; T-tegumento; PMCL-polinização de mesma classe de DEA; PNL-polinização natural.

A partir desses resultados, nota-se que o tipo de polinização, de alguma forma, influenciou na síntese de hormônios e Poliaminas na semente de *A. sellowiana*.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 ABA – AIA

Os resultados de ABA em embriões e semente inteira de *Acca sellowiana* revelaram diferença significativa entre as amostras de polinização de mesma classe e natural, sendo que a maior concentração de ABA em ng/gMF foi detectada na semente inteira oriunda de polinização de mesma classe (DEA3). Estudos anteriores realizados com sementes de *Acca sellowiana* mostraram teores elevados de ABA em embrião zigótico na fase cotiledonar (Pescador, 2004). Os embriões zigóticos desta espécie têm seu estágio cotiledonar alcançado por volta dos 75 dias após a polinização, mas somente entre os 105 e 120 DAP observa-se a maturação dos mesmos (Pescador, 2004; Cangahuala-Inocente et al., 2007), quando apresentam endosperma totalmente consumido e os cotilédones volumosos, devido ao acúmulo de substâncias de reserva. Porém, somente aos 90 DAP, os embriões apresentaram teores de ABA em torno de 15 ug/g de MF, valores estes que foram decrescendo constantemente até os 120 DAP (Cangahuala- Inocente, 2007). Durante a germinação de embriões zigóticos, os níveis de ABA se mantiveram baixos (0 a 2,0 ug/g de MF) no início da germinação e aumentaram significativamente dos 25 aos 30 dias (4 a 5 ug/g de MF) (Cangahuala- Inocente, 2007).

Grande parte do ABA presente em sementes de *Nicotiana plumbaginifolia* está concentrada nos tegumentos (Finkelstein et al. 2002; Frey et al. 2004). Isto foi também mostrado por Kovaleva et al.(2002) em peças florais de petúnias onde encontrou-se uma alta concentração de ABA nos pistilos durante o processo de fertilização. Em testes com polinizações auto-incompatíveis, o aumento de ABA nos pistilos foi significativo em relação a polinizações compatíveis ou na ausência de polinização. Neste caso o ABA pode atuar como inibidor de substâncias promotoras de crescimento, que podem ser tóxicas quando tubos polínicos de pólen incompatíveis forem inibidos; ou então controlando a elevação no nível de etileno estimulado pela interação pólen-pistilo. Isso sugere que flores auto-incompatíveis, como de *Acca sellowiana*, requerem um rearranjo complexo entre os hormônios, pelo fato de haver a possibilidade de uma polinização compatível ou incompatível (Kovaleva e Zakharova, 2004).

Segundo Frey et al. (2006) altos níveis de ABA encontrados em tecidos maternos, revelaram envolvimento com o processo de dormência de sementes de *Nicotiana plumbaginifolia*, pois mesmo inibindo a síntese de zeaxantina a dormência foi restaurada. Além disto, os teores de ABA detectados durante o desenvolvimento da semente correspondiam à metade dos níveis detectados em sementes selvagens. Portanto, não houve

correlação entre os baixos níveis de ABA observados durante o desenvolvimento da semente e a restauração da dormência, o que indica que o ABA responsável pela restauração foi produzido pelo embrião, e que grande parte do ABA detectado durante o desenvolvimento era oriunda dos tecidos maternos. Isto corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho onde o tegumento e/ou a semente inteira apresentaram níveis de ABA superiores aos do embrião.

O fato de as sementes aqui avaliadas apresentarem taxa de germinação (dados não publicados) e concentrações de ABA elevadas pode ser explicado pela existência de dois momentos durante a maturação da semente, onde o nível de ABA é determinante. Em *Arabidopsis*, o primeiro pico de ABA é derivado da mãe (tecidos maternos) e precede a maturação. Este pico é importante, em conjugação com a atividade de outros genes (*FUS3* e *LEC2*), para prevenir uma germinação prematura (viviparidade) no final da fase de divisão celular da embriogênese e para a acumulação de substâncias de reserva. Um segundo pico é observado no momento em que o embrião alcança a maturação, porém esse pico depende da síntese realizada pelo embrião. Apesar da concentração de ABA acumulada pelo embrião ser apenas 1/3 (um terço) da acumulada no primeiro pico (10 dias após a polinização), estes teores são suficientes para a indução da dormência, que é mantida apesar de um substancial decréscimo de ABA possivelmente consumido pela maturação da semente, síntese de LEA e tolerância a dessecação (Finkelstein et al., 2002; Nkang, 2002; Kermode, 2005)

Em estudos anteriores com embriões zigóticos de *A. sellowiana*, os óvulos fertilizados apresentaram maior conteúdo de ABA, o que corresponderia ao primeiro pico. A partir daí, os teores diminuíram e do sexto até o trigésimo dia após a polinização tiveram suas concentrações de ABA próximo do zero (Pescador, 2004). Outras análises realizadas com embriões a partir de 45 dias após a polinização, revelaram um novo pico de ABA aos 90 dias, período este correspondente a maturação da semente (Cangahuala-Inocente, 2007).

Porém, para confirmar a real existência desses dois momentos nas sementes de *A. sellowiana*, e quais seriam suas vantagens e influências, se fazem necessárias novas avaliações considerando os estágios de desenvolvimento e o tipo de polinização, que conforme mostrado neste trabalho, e confirmado por outros autores (Kovaleva e Zakharova, 2004) têm forte influência no status hormonal da semente.

Existem evidências de que a auxina, produzida pelo pólen e no endosperma, regula o crescimento dos frutos durante os estágios iniciais, e que durante o desenvolvimento da semente, o embrião é a principal fonte de auxina para o fruto nos estágios mais tardios (Taiz e Zeiger, 2004). Os níveis de AIA encontrados no presente trabalho apresentaram



comportamento inverso aos observados para o ABA, estando mais concentrados no embrião obtidos de sementes da polinização natural. Em análises anteriores realizadas com sementes maduras (Cangahuala-Inocente, 2007), os teores deste hormônio foram muito baixos, cerca de 20 vezes menores que as concentrações encontradas neste trabalho. Isto sugere que o tipo de polinização pode estar influenciando as rotas de biosíntese e acumulação do AIA nas sementes (Kovaleva e Zakharova, 2004).

A partir do momento da polinização, os teores de AIA aumentaram nos pistilos de petúnias, porém seus níveis máximos corresponderam à metade dos teores alcançados pelo ABA no mesmo período. O aumento do AIA é o único que acompanha o crescimento do tubo polínico, enquanto que os demais hormônios permanecem constantes ou diminuem seus teores. Isso se deve a razão existente entre os diferentes grupos de hormônios envolvidos (Kovaleva et al., 2000). Provavelmente, a germinação do pólen e o processo de reconhecimento do tubo polínico pelo pistilo são controlados pelo etileno e pelo AIA, o qual promove a expansão celular e atrai substâncias como, açúcares, aminoácidos, carboidratos, glicoproteínas, compostos fenólicos e ions  $Ca^{2+}$  (Kovaleva et al., 2002).

Quando dosados os teores de AIA em pistilos com fertilização compatível e incompatível verificou-se que, ao contrário de ABA, os níveis de AIA foram maiores em pistilos com fertilização compatível (~1,0ng/pistilo). Apesar dos acessos utilizados no presente trabalho serem auto-incompatíveis, as polinizações realizadas foram compatíveis, e os teores mais elevados de AIA foram encontrados na semente inteira derivada de plantas com polinização natural (27 ng/g de MF). Esse aumento no nível de AIA em semente de polinização natural pode ser devido ao fato de que, como o outro tipo de polinização foi realizado com pólen da mesma classe de DEA que a planta mãe, possa ter ocorrido um mecanismo parcial de prevenção de fertilização auto-incompatível. No caso de acessos auto-incompatíveis, o etileno e o ABA podem estar funcionando como mensageiros secundários de AIA, onde o etileno induzido pelo AIA desencadeia a síntese de ABA, e como resposta, o crescimento meristemático é inibido e a fertilização (incompatível) é interrompida (Collet et al., 2000; Kovaleva e Zakharova, 2004).

## **4.2 Poliaminas**

Sabe-se que as PAs estão associadas a vários processos celulares tais como: regulação da expressão gênica, tradução, proliferação celular, modulação da sinalização celular e estabilização da membrana (Bouchereau et al., 1999; Bais e Ravishankar, 2003; Kusano et al., 2008). Existem estudos mostrando que as PAs podem também regular a morte celular,

particularmente a apoptose (Kusano et al., 2008). Durante a germinação os teores de PAs aumentam significativamente (Bais e Ravishankar, 2003). Porém, para entender o verdadeiro papel das PAs no crescimento e diferenciação vegetal, são necessários estudos mais aprofundados (Kusano et al., 2008).

No grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, em associação com outros grupos de pesquisa muitos passos já foram dados para chegar à um entendimento da modulação das PAs em várias espécies. Em *Acca sellowiana*, durante os estágios de desenvolvimento do embrião zigótico foram verificados teores constantes de PAs totais, porém a relação  $[Put/(Spd+Spm)^{-1}]$  foi baixa desde a fertilização até a formação do zigoto, aumentando posteriormente e decrescendo no estágio cotiledonar. Aspectos similares foram também observados para outras espécies tais como *Araucaria angustifolia* (Atarita et al., 2003), *Pinus taeda* (Silveira et al., 2004) e *Ocotea catharinensis* (Santa Catarina et al., 2006).

No presente trabalho os maiores teores de PAs foram encontrados nos embriões derivados de embriões de polinização de mesma classe de DEA, sendo a Spd a PA mais abundante. Baixos níveis de PAs foram encontrados nos tegumentos, tanto para polinização natural quanto para polinização de mesma classe de DEA. A PA menos expressa foi a Spm, em todos os tratamentos. O mesmo foi verificado para PAs livres. Em *Arabidopsis* a Spm não foi essencial para o desenvolvimento normal das plantas (Kuznetsov et al., 2006). O mesmo foi concluído quando *Arabidopsis* defectivos para o gene *acl5/spm*, responsável pela síntese de Spm, tiveram boa produção de sementes, as quais eram férteis e germinaram normalmente (Imai et al., 2004a). No entanto, a Put e a Spd se mostraram cruciais para desenvolvimento do embrião, o qual na ausência da expressão duplo-alélica de SPD (*spds1-1-spds2-1*) teve o tamanho reduzido e seu desenvolvimento cessado no período de transição entre os estágios coração e torpedo, sendo letal para o embrião. Isso deixa claro o papel crítico da Spd no desenvolvimento dos embriões (Imai et al., 2004b; Urano et al., 2005).

A maior razão  $[Put/(Spd+Spm)]$ , foi detectada na semente inteira de polinização natural (0,8), e a menor no embrião PN. Nos tratamentos para polinização de mesma classe de DEA, a razão teve pouca diferença, variando em torno de 0,4. Cangahuala-Inocente (2007) encontrou em sementes maduras de *A. sellowiana* uma razão de aproximadamente 0,6. O fato de a semente inteira apresentar razão alta na polinização natural, indica que houve maior acúmulo de Put nessa condição. O acúmulo de Put está associado com respostas a estresses, identificadas pelo aumento na síntese de Put, ou ausência da sua degradação. Culturas de folhas e protoplastos, sensíveis a estresse osmótico, mostraram um aumento nos teores de Put

e uma aparente diminuição na capacidade de sintetizar Spd a partir de Put (Bouchereau et al., 1999). Assim, nossos resultados mostraram de forma geral, uma razão  $[Put/(Spd+Spm)]$  baixa, não se evidenciando estado de estresse nas sementes analisadas, visto também que a PAs mais abundante durante as análises de PAs livres foi a Spd, sugerindo que a sua síntese ocorreu normalmente, sem acúmulos de Put.

As poliaminas conjugadas estão geralmente ligadas com ácidos fenólicos (Tiburcio et al., 1997). Em muitos casos, a resposta à deficiências minerais e abióticas está associada com a produção de PAs conjugadas, as quais provavelmente usam esta forma como meio de transporte. A conjugação de PAs deve regular sua interação com cátions inorgânicos como  $Ca^{2+}$ , o que implicaria em seu suposto papel na estabilização de membranas. É provável que a conjugação de PAs seja importante na desintoxicação de compostos fenólicos conhecidos por serem inibidores de crescimento (Bouchereau et al., 1998). Como no caso de qualquer regulador de crescimento vegetal, o pool intracelular de PAs livres não depende somente de sua síntese, mas também de outros processos que incluem a degradação de poliaminas, conjugação e transporte (Tiburcio et al., 1997). Com base nestas informações, sabendo que os maiores teores de PAs conjugadas no presente trabalho se concentram na semente inteira derivada da polinização natural, e que estes foram três vezes menores que os teores de PAs livres, pode-se inferir que não há deficiências bióticas e abióticas interferindo no desenvolvimento dos embriões. Vale ressaltar a diferença de expressão das PAs conjugadas encontrada entre os embriões oriundos dos diferentes tipos de polinização (PN-polinização natural; PMC-polinização de mesma classe), onde os níveis para Put foram muito maiores nos embriões de polinização de mesma classe de DEA e Spd ausente. Já no embrião de polinização natural, a Spd foi detectada, porém a Spm esteve ausente.

Em *Cucurbita pepo* o aumento do nível de PAs no tegumento, no início do desenvolvimento das sementes foi associado à divisão celular intensa, e seu decréscimo nos estágios tardios esteve associado com o alongamento celular, processo pelo qual as PAs supostamente não têm influência (Bezold et al., 2003). Estes aspectos corroboram os resultados encontrados em neste trabalho, onde os teores de PAs nos tegumentos observados, tanto para polinização natural quanto para polinização de mesma classe de DEA, foram baixos quando comparados com os teores observados no embrião e a na semente inteira.

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a polinização com pólen da mesma classe de DEA3 (distância entre estigma e antera de 1,0 e 1,4 cm) que a planta mãe, influenciou positivamente nos teores de ABA na semente, e que grande parte do ABA detectado concentrou-se no tegumento. Para AIA, a polinização natural aumentou seus

níveis teores nos embriões isolados e isto pode ter sido determinado e desencadeado pela interação pólen-pistilo, ocorrida durante o crescimento do tubo polínico e a fertilização. As PAs tiveram suas maiores concentrações detectadas no embrião isolado de polinização de mesma classe de DEA, sendo a Spd a mais abundante em todos os tratamentos, o que indica um bom desenvolvimento do embrião ocorrendo em todos os tratamentos. A baixa razão [Put/(Spd+Spm)] demonstrou que nenhum dos tipos de polinização promoveu algum tipo de estresse modulado por estas PAs durante o desenvolvimento da semente.

Os dados aqui apresentados são importantes para entender a distribuição hormonal encontrada na semente e o papel de cada hormônio durante o processo de desenvolvimento e maturação do embrião zigótico. Essas informações podem ser úteis para a otimização da técnica de embriogênese somática nesta espécie, como sugerido por Pullman e Buchanan (2003) e no entendimento do mecanismo de incompatibilidade da goiabeira-serrana (Finatto, 2008), ambos essenciais para o aprimoramento de estratégias inseridas em programas de melhoramento.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BAIS, H. P. e RAVISHANKAR, G.A. Synergistic effect of auxins and polyamines in hairy roots of *Cichorium intybus* L. during growth, coumarin production and morphogenesis. **Acta Physiologia e Plantarum**. v. 25, p.193-208, 2003.

BEZOLD, T. N.; LOY, J. B.; MINOCHA, S. C.Changes in the cellular content of polyamines in different tissues of seed and fruit of a normal and a hull-less seed variety of pumpkin during development. **Plant Science**. v. 164, p.743-752, 2003.

BHATTACHARYA, A.; SHARMA, P.; PANDEY, S.; NAGAR, P.K.; AHUJA, P. S. ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze **Journal of Plant Physiology** . v. 161, p.1269-1276, 2004.

BONETTA, D.E.; MCCOURT, P. Genetic analysis of ABA signal transduction pathways **Trends in plant science**. v. 3, p.231-235, 1998.

BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development **Plant Science** . v. 140, p. 103- 125, 1999.

BRYANT, D. S.; LANE, E. F. Indole-3-acetic acid oxidase from Peas. **Plant Physiology**. v. 63, p.696-699, 1979.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. Caracterização Morfofisiológica, Bioquímica e proteoma da embriogênese zigótica e somática de Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg)Burret.). Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis- SC. 2007.

CHENG, W-H.; ENDO, A.; ZHOU, L.; PENNEY, J.; CHEN, H-C.; ARROYO, A.; LEON, P.; NAMBARA, E.; ASAMI, T.; SEO, M.; KOSHIBA, T.; SHEENA, J. A Unique Short-

Chain Dehydrogenase/Reductase in Arabidopsis Glucose Signaling and Abscisic Acid Biosynthesis and Functions. **The Plant Cell**. v. 14, p.2723-2743, 2002.

COLLET, C.E.; HARBERD, N.P.; LEYSER, O. Hormonal Interactions in the Control of Arabidopsis Hypocotyl Elongation. **Plant Physiology**. v. 124, p.553-562, 2000.

DEGENHARDT, J.; ORTH, A. I.; GUERRA, M. P.; DUCROQUET, J. P.; NODARI, R. O.; Morfologia floral da goiabeira Serrana (*Feijoa Sellowiana*) e suas implicações na polinização. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 23, p.718-721, 2001.

DUCROQUET, J. P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. Goiabeira-Serrana (*Feijoa sellowiana*). **Série Frutas nativas Funep**. v. 5. 66p., 2000.

FINARDI, C. Caracterização da Biologia Reprodutiva da Goiabeira-Serrana (*Acca Sellowiana* Berg.). Dissertação (mestrado em Recursos genéticos Vegetais). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis -SC. 2003.

FINATTO, T. Caracterização morfofisiológica do sistema de Incompatibilidade atuante em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (berg) burret) (Myrtaceae). Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis- SC. 2008.

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L.; ROCK, C.D. Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. **The Plant Cell**. v.14, p.S15-S45, 2002.

FREY, A.; BOUTIN, J-P.; SOTTA, B.; MERCIER, R.; MARION-POLL, A. Regulation of carotenoid and ABA accumulation during the development and germination of *Nicotiana plumbaginifolia* seeds. **Planta** . v. 224, p. 622-632, 2006.

GRAPPIN, P.; BOUINOT, D.; SOTTA, B.; MIGINIAC, E.; JULLIEN, M. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-inhibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. **Planta**. v. 210, p.279-285, 2000.

HAN, S-Y.; KITAHATA, N.; SEKIMATA, K.; SAITO, T.; KOBAYASHI, M.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; YOSHIDA, S.; ASAMI, T. A Novel Inhibitor of 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase in Abscisic Acid Biosynthesis in Higher Plants **Plant Physiology**. v. 135, p. 1-9, 2004.

IMAI, A.; AKIYAMA, T.; KATO, T.; SATO, S.; TABATA, S.; YAMAMOTO, K. T.; TAKAHASHI, T. Spermine is not essential for survival of Arabidopsis. **FEBS**. v. 556, p.148-152, 2004a.

IMAI, A.; MATSUYAMA, T.; HANZAWA, Y.; AKIYAMA, T.; TAMAOKI, M.; SAJI, H.; SHIRANO, Y.; KATO, T.; HAYASHI, H.; SHIBATA, D.; TABATA, S.; KOMEDA, Y.; TAKAHASHI, T. Spermidine Synthase Genes Are Essential for Survival of Arabidopsis. **Plant Physiology**. v. 135, p.1565-1573, 2004b.

KAUR-SAWHNEY, R.; TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; GALSTON, A.W. Polyamines in plants: An overview **Journal of Cell and Molecular Biology**. v. 2, p.1-12, 2003.

KERMODE, A.R. Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 24, p. 319-344, 2005.

KOJIMA, K. Changes of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberellin-like substances in the flowers and development fruitlets of citrus cultivar 'Hyuganatsu'. **Scientia Horticulturae, Amsterdam**, v. 65, p. 263-272, 1996.

NKANG, A. Carbohydrate composition during seed development and germination in two subtropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*) **Journal of Plant Physiology**. v.159, p.473-483, 2002.

KOVALEVA, L.V.; RAKITIN, V.Y.U.; DOBROVOL'SKAYA, A.A. Gametophyte-Sporophyte interaction in the Pollen-Pestil System: 2. The Evolution of Ethylene and CO<sub>2</sub> after Pollination. **Russian Journal Plant Physiology**. v. 47, p.492-495, 2002.

KOVALEVA, L.V.; ZAKHAROVA, E.V. Gametophyte–Sporophyte Interactions in the Pollen–Pistil System: 4. The Hormonal Status and the Mechanism of Self-Incompatibility. **Russian Journal of Plant Physiology**. v. 51, p.402-406, 2004.

KUZNETSO, V.V.; RADYUKINA, N.L.; SHEVYAKOVA, N.I. Polyamines and Stress: Biological Role, Metabolism, and Regulation. **Russian Journal of Plant Physiology**. v. 53, p. 583-604, 2006.

KUSANO, T.; BERBERICH, T.; TATEDA, C.; TAKAHASHI, Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. **Planta**. v. 228, p. 367-381, 2008.

PENCE, V.C. Abscisic Acid and the Maturation of Cacao Embryos in Vitro. **Plant Physiology**. v. 98, p.1391-1395, 1992.

PESCADOR, R. Aspectos Fisiológicos-Estruturais das Embriogêneses Zigótica e Somática de *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae). Tese, Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PULLMAN, G.S.; BUCHANAN, M. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.): Stage-specific analyses of zygotic embryo and female gametophyte tissue. **Plant Science**. v.164, p.943-954, 2003

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

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

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; MORAES, F.M.S.; RICART, C.A.O.; SOUSA, M.V.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia* **Biologia Plantarum**. v. 52, p.101-104, 2008.



TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T.; BORRELL, A.; MASGRAU, C. Polyamine metabolism and its regulation. **Physiology Plantarum**. v.100, p.664-674, 1997.

URANO, K.; HOBO, T.; SHINOZAKI, K. Arabidopsis ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. **FEBS** v. 579, p.1557-1564, 2005.

### **CAPÍTULO 3**

Fenóis totais em sementes de *Acca sellowiana* em diferentes estágios de desenvolvimento e oriundas de diferentes polinizações.

## RESUMO

O crescimento e desenvolvimento vegetal podem ser afetados, positivamente ou negativamente, pelos metabólitos secundários. Estes agem como precursores na síntese de auxinas, ácido salicílico, aminoácidos aromáticos e participam da regulação da biosíntese de etileno. Os Fenilpropanóides e derivados do ácido benzóico são frequentemente citados como tendo atividades alelopáticas. Em culturas *in vitro*, altos teores de fenóis são limitantes à expressão da morfogênese, ou então, em outros casos, parecem ser essenciais para o controle da morfogênese *in vitro*, incluindo a organogênese e a embriogênese somática. O objetivo do presente trabalho foi investigar os teores de fenóis totais de sementes de *Acca sellowiana* oriundas de diferentes genótipos e diferentes estágios de desenvolvimento, visando compreender esse processo *in vivo* e gerar informações para a modulação da embriogênese somática nesta espécie. Foram utilizadas sementes oriundas de diferentes polinizações: polinização com a mesma classe de distância entre estigma e antera (DEA 1, 2 e 3), polinização natural, e polinização cruzada entre os acessos 101 e 458 do BAG da Estação Experimental da EPAGRI de São Joaquim. Sementes em diferentes estágios de desenvolvimento e armazenadas por diferentes períodos, assim como os tegumentos das sementes, também foram coletados para análise. Foram analisados os teores de fenóis totais a partir da leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1230) à 725 nm. De acordo com as análises de variância, os teores de fenóis das sementes de *Acca sellowiana* nos diferentes estágios de desenvolvimento não diferiram entre si e o mesmo ocorreu como resultado das diferentes formas de polinização. Altos teores de fenóis foram encontrados no tegumento das sementes. Quando as sementes foram armazenadas por um ano ou mais, seus teores de fenóis foram drasticamente reduzidos. O papel dos fenóis na germinação das sementes e no processo de indução a embriogênese somática é discutido.

Palavras chaves: sementes; *Acca sellowiana*; compostos fenólicos; embriogênese somática.

## ABSTRACT

Secondary metabolites affect positively or negatively the plant growth and development. They are precursor in the synthesis of auxin, salicylic acid, aromatic amino acids and participate in the regulation of the ethylene biosynthesis. The phenylpropanoids and derivatives of benzoic acid are frequently cited as having allelopathic activity. In *in vitro* cultures, high levels of phenols may be limiting for the growth and morphogenesis. In other cases some cultures, phenolic compounds appear to be essential for the control of *in vitro* morphogenesis such as organogenesis and somatic embryogenesis. The present work attempted to investigate the levels of total phenols in the seeds of *Acca sellowiana* different genotypes and at different development stages, in order to better understand their role in the seed metabolism and in somatic embryogenesis. Seeds from different pollination systems were obtained: pollination with the same class of distance between stigma and anther (DEA 1, 2 and 3), natural pollination and cross-pollination among 101 and 458 accessions of the Experimental Station of EPAGRI of San Joaquin collection. Seeds at various development stages and stored for different periods, as well as the seed coat were also collected for analysis. The total phenols were obtained by means of absorbance spectrophotometer (Shimadzu UV-1230) to 725 nm. According to the ANOVA the levels of phenols in *Acca sellowiana* seeds in different stages of development do not differ among them. High phenols levels were found in the seed coat. When the seeds were stored for a year or more the phenols levels were drastically reduced. The role of phenols in the seed germination as well as in the somatic embryogenesis of this species is discussed.

Keywords: seeds, *Acca sellowiana*; phenolic compounds; somatic embryogenesis.

## 1 INTRODUÇÃO

Metabólitos secundários podem afetar positivamente ou negativamente o crescimento e desenvolvimento vegetal (Reigosa et al., 1999). Os compostos fenólicos apresentam várias funções durante o desenvolvimento e crescimento das plantas, tais como suporte mecânico, atração de polinizadores e dispersores de frutos, absorção da radiação ultravioleta maléfica e na redução do crescimento de plantas vizinhas competidoras (Taiz e Zeiger, 2004; Muscolo et al., 2005). Existem evidências da participação de compostos fenólicos, como os flavonóides, na comunicação e sinalização planta-microorganismo, assim como em funções antioxidantes e antifúngicas, indutores da germinação do pólen e elongações do tubo polínico (Yoshitama, 2000). Alguns autores descrevem os fenóis como precursores na síntese de auxinas, ácido salicílico, aminoácidos aromáticos e participam da regulação da biosíntese de etileno (Piruzian et al., 2001).

Os compostos fenólicos das plantas estão também sendo estudados por suas propriedades medicinais. Estudos com espécies tropicais mostraram que *Psidium guajava* L. (Mirtáceas), *Mangifera indica* L., *Litchia chinensis* Sonn. contêm altos níveis de compostos fenólicos, e são recomendadas na prevenção da aterosclerose (Gorinstein et al., 1999). A Oliva (*Olea europaea* L.) é muito conhecida pelas suas propriedades antioxidantes, conferidas pelos altos teores de compostos fenólicos que inibem a oxidação de lipídios e do DNA, o que previne doenças cardiovasculares (Torre, 2008). Muitas outras plantas estão sendo investigadas visando mensurar o seu potencial antioxidante como é o caso de *Trigonella foenum graecum*, a qual possui sementes com altíssimos níveis de polifenóis, sendo considerada anti-diabética e hepatoprotetora contra injúrias em lipídios e proteínas causadas pelo álcool. A suplementação dessas plantas na dieta podem trazer benefícios anti-inflamatórios, prevenção à oxidação de lipoproteínas, hipertensão e ações carcinostáticas (Kaviarasan et al., 2004; Kaviarasan et al., 2007).

Compostos como os Fenilpropanóides e derivados do ácido benzóico são freqüentemente citados como tendo atividades alelopáticas. Compostos como cafeína e ácido felúrico ocorrem em quantidades consideráveis nos solos, e agem inibindo a germinação e crescimento de muitas plantas, porém as verdadeiras atividades alelopáticas das plantas ainda não foram bem esclarecidas (Taiz e Zeiger, 2004). Muitas investigações sobre interações alelopáticas demonstram a influencia de compostos fenólicos nos processos fisiológicos tais como a expansão celular, permeabilidade da membrana, fluxo de nutrientes, síntese de clorofila, fotossíntese, síntese de proteínas, atividades enzimáticas, respiração e equilíbrio osmótico (Reigosa et al., 1999). Atuam também como reguladores de transcrição e

componentes dos sinais de transdução (Yoshitama, 2000). A combinação das ações dos compostos fenólicos pode ser aditiva, antagonística ou sinérgica (Reigosa et al., 1999).

Fenóis endógenos inibem a pré-produção de grãos em trigo (*Triticum turgidum* ssp), e centeio (*Secale cereale* L.). Em trigo e algumas coníferas, fenóis exógenos inibem a germinação de sementes (Kong et al., 2008). Benech-Arnold et al. (2006) sugerem que esta inibição é devido a oxidação de compostos fenólicos na glumela, responsável pela dormência de sementes de cevada (*Hordeum vulgare*), limitando o suplemento de oxigênio para o embrião. Existem muitas evidências sobre a contribuição dos compostos fenólicos na dormência de sementes (Abenavoli et al., 2006; Benech-Arnold et al., 2006), porém pouco se sabe a respeito de compostos fenólicos presentes no tegumento após maturação das sementes, durante a germinação (Kong et al., 2008).

Quanto aos efeitos dos compostos fenólicos em culturas *in vitro*, sabe-se que altos níveis de fenóis e sua oxidação podem ser fatores limitantes às propriedades de multiplicação das células dos tecidos cultivados, e de sua manutenção (Alemanno et al., 2003). O fato de os compostos fenólicos possuírem pelo menos um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas, os tornam deletérios durante a cultura *in vitro*, pois a partir de sua oxidação afetam negativamente os explantes, causando necrose e escurecimento, especialmente quando os explantes são tecidos maduros de plantas lenhosas (Martin e Madassery, 2005; Reis et al., 2008). Porém para algumas culturas, os compostos fenólicos parecem ser essenciais para o controle da morfogênese *in vitro* (Reis et al., 2008), como no caso de indução da formação de raízes, brotações, androgênese e embriogênese somática (Sarkar e Naik, 2000; Lorenzo et al. 2001; Cvikrová e Hrubcová, 1999).

Muitos antioxidantes executam papéis importantes na adaptação de plantas, tanto em uma situação de estresse biótico quanto abiótico (Burritt e Mackenzie, 2003). Grande parte dos antioxidantes produzidos nas plantas como mecanismo de defesa e adaptação são metabólitos secundários, que incluem compostos fenólicos oriundos, principalmente, da rota dos fenilpropanóides (Oh et al., 2008). O estudo dos metabólitos secundários e seu metabolismo são ainda pequenos quando comparado com os estudos sobre os metabólitos primários, porém os metabólitos secundários parecem estar relacionados com importantes processos no desenvolvimento vegetal e deveriam ser melhor explorados (Yoshitama, 2000).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou investigar os teores de fenóis totais nas sementes de *Acca sellowiana* de diferentes genótipos e em diferentes estágios de desenvolvimento, visando gerar informações que auxiliem na compreensão do

desenvolvimento metabólico e crescimento da planta e no processo de embriogênese somática nesta espécie.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material Vegetal**

Frutos oriundos do cruzamento entre os acessos 101 e 458, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Estação Experimental da EPAGRI em São Joaquim – SC, foram coletados de acordo com os diferentes estágios de desenvolvimento do embrião: Coração (45 DAP), Torpedo (60 DAP), pré-Cotiledonar (75 DAP) e Cotiledonar (120 DAP). Os frutos foram armazenados em freezer a -20°C até o momento da excisão das sementes. Para a retirada das sementes, a casca dos frutos ainda congelados foi cuidadosamente cortada com estilete, para não atingir as sementes, e então com o auxílio de pinça e estereomicroscópio, as sementes foram retiradas e armazenadas em tubos a -20°C até o momento da análise. Sementes deste mesmo cruzamento, armazenadas há 1 ano e 1 ano e 7 meses, em geladeira, também foram empregadas para análise, assim como sementes oriundas da polinização com mesma Classe de Distância entre Estigma e Antera (DEA 1, 2 e 3) e de polinização natural.

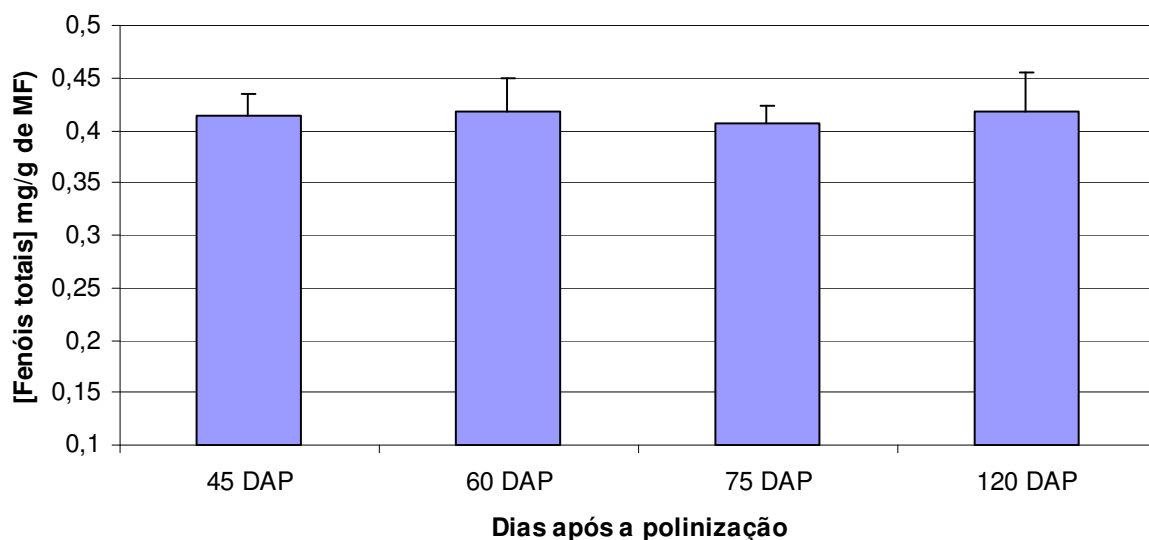
### **2.2 Extração e quantificação dos fenóis totais**

Para extração dos fenóis totais, 300 mg de sementes foram maceradas com Nitrogênio líquido. Ao macerado, adicionou-se 7,5 ml de metanol acidificado com 0,1% de HCl (v/v), e colocado na geladeira por 1 hora, sendo então centrifugado a 1360g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi espalhado em placa de Petri e colocado em estufa a 42°C. O resíduo foi ressuspensionado em 5 ml de metanol 95%. Uma alíquota de 1 ml foi separada em tubos de vidro de 10ml, onde foi adicionado 1 ml de etanol 95%, 5 ml de água ultrapura e 0,5 ml de Folin-Ciocalteu, deixou-se repousar por 5 min. Adicionou-se então 1 ml de carbonato de sódio (5% v/v) e após agitação breve, as amostras foram colocadas em repouso, no escuro, por 1h. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1230) á 725 nm. Foi usado como Branco metanol 95%. Todas as análises foram realizadas em triplicata com base na curva padrão de ácido gálico ( $y = 1,4028x - 0,0259$ ;  $r = 0,999$ ). Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por 1grama de massa fresca. Os dados coletados foram submetidos à análise da variância, com o auxílio do Programa SPSS 11.5 para Windows, detectadas diferenças significativas, foi realizado teste de separação de médias Tukey (Seigel e Castellan, 1995).

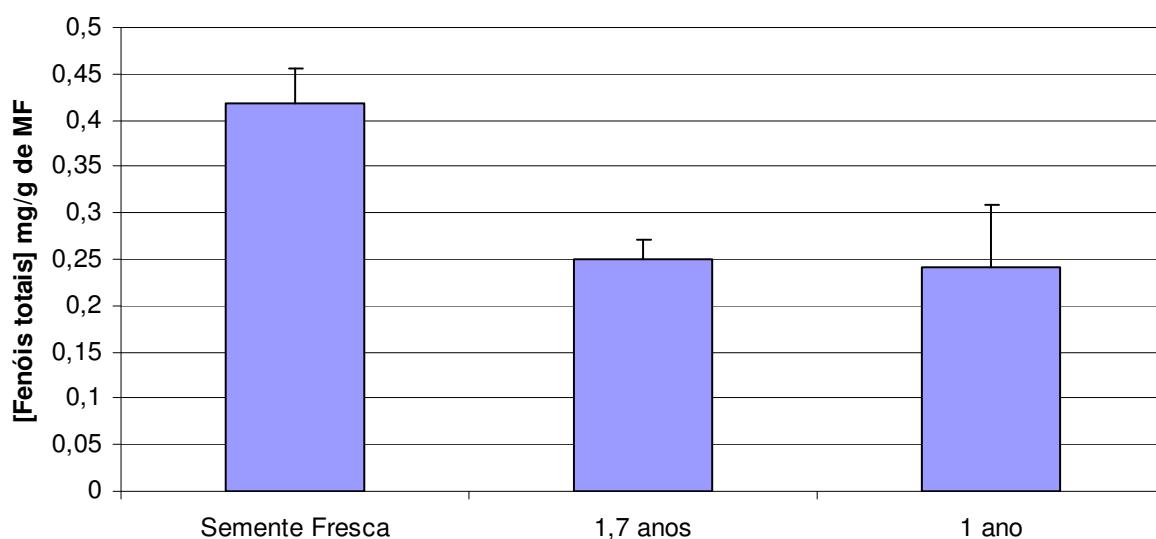


### 3 RESULTADOS

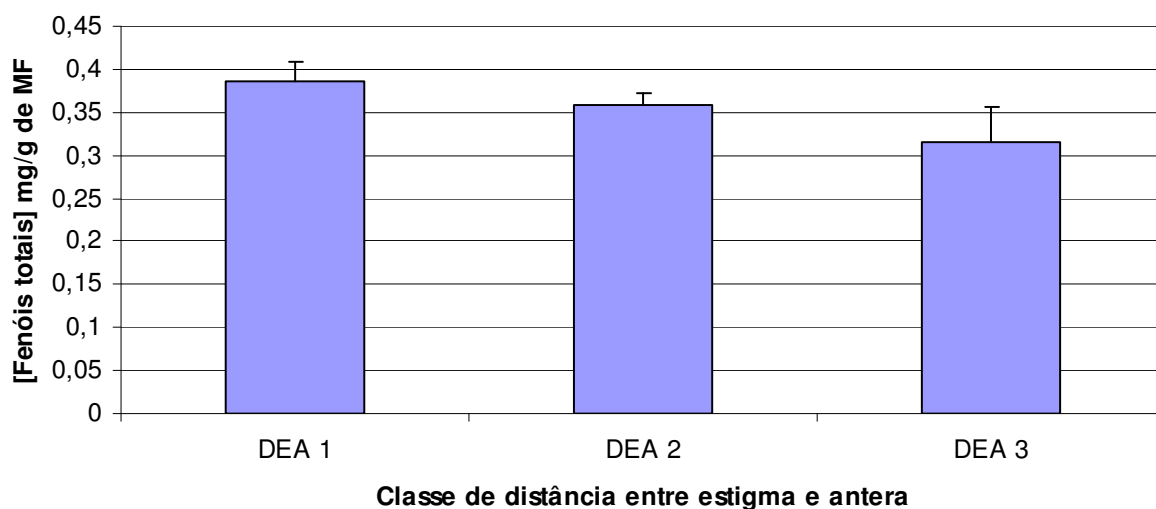
Quando analisadas as sementes de *Acca sellowiana* oriundas do cruzamento 101x458, em diferentes estágios do desenvolvimento verificou-se que as concentrações de fenóis totais se mantiveram altas desde o estágio coração (45 DAP) até o cotiledonar (60 DAP), não havendo diferença significativa ( $p>0,05$ ) (Figura 11). Segundo análise da variância, sementes armazenadas por um ano e por um ano e 7 meses, não diferiram ( $p>0,05$ ) em relação às concentrações de fenóis totais. Porém, quando comparadas com sementes maduras recém tiradas do fruto, seus teores mostram-se muito inferiores (Figura 12). As sementes oriundas de polinização com diferentes classes de DEA (distância entre estigma e antera) não apresentaram diferença ( $p>0,05$ ) nos níveis de fenóis totais, porém os menores níveis foram verificados nas sementes de DEA3 (distância de 1,0 a 1,4cm) (Figura 13).



**Figura 11.** Concentração dos fenóis totais em diferentes estágios de desenvolvimento de sementes de *A. sellowiana* (média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ ).



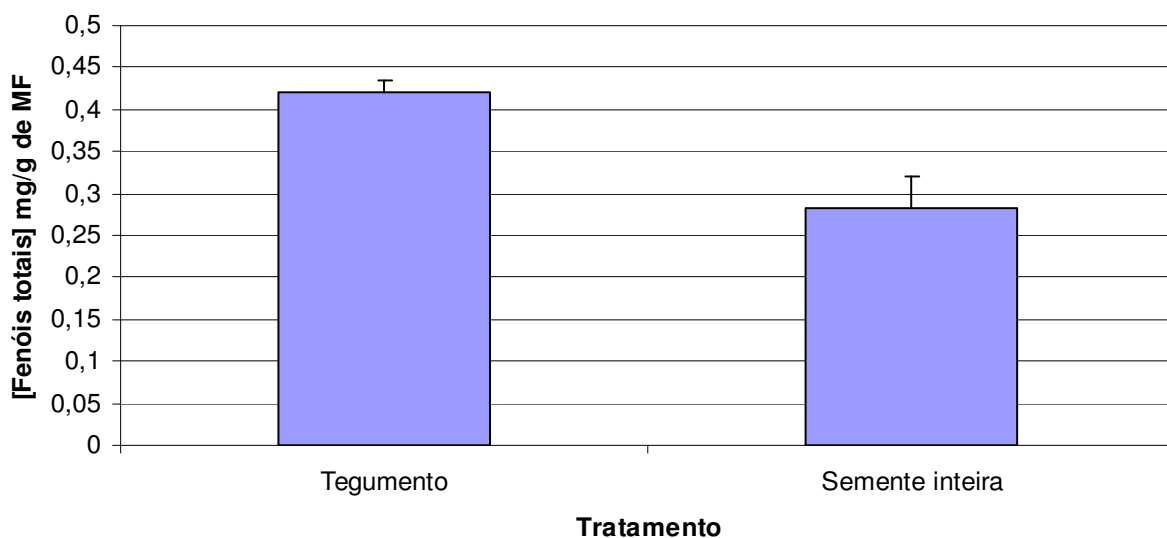
**Figura 12.** Concentração de fenóis totais em sementes de *A. sellowiana* em diferentes períodos de armazenamento (média ± desvio padrão, n=3).



**Figura 13.** Concentração de fenóis totais em sementes de *A. sellowiana* oriundas de diferentes classes de DEA (média ± desvio padrão, n=3).

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os teores encontrados no tegumento e na semente inteira (embrião + tegumento) de *A. sellowiana*. O tegumento apresentou concentrações superiores (0,4217mg/g de MF) às encontradas na semente inteira (0,2822mg/g de MF) (Figura 2d). Quando comparados os teores de fenóis totais de sementes das três

classes de Distância entre Estigma e Antera (DEA1, 2 e 3), de polinização natural e cruzada, não se observaram diferenças significativas, sendo que as sementes oriundas de polinização cruzada (101x458) apresentaram os menores níveis de fenóis totais (0,2420 mg/g de MF) (Tabela 1).



**Figura 14.** Concentração de fenóis totais no tegumento e na semente inteira de *A. sellowiana* (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

**Tabela 5.** Fenóis Totais das sementes *A. sellowiana* oriundas de diferentes tipos de polinização.

Tipo de Polinização	Média (mg/g de MF)
Polinização de mesma Classe de DEA1	0,386 <sup>a</sup>
Polinização de mesma Classe de DEA2	0,358 <sup>a</sup>
Polinização de mesma Classe de DEA3	0,315 <sup>a</sup>
Polinização Natural	0,282 <sup>a</sup>
Polinização Cruzada (101x458)	0,242 <sup>a</sup>
Média geral	0,317
CV(%)	14,10

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV-coeficiente de variação.

#### 4 DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos são os fitoquímicos mais encontrados nas plantas. Em trigo estão concentrados principalmente no tegumento da semente, porém variam significativamente de acordo com o cultivar (Beta et al., 2005). Com isso, verificou-se neste trabalho diferenças significativas entre os teores de fenóis presentes no tegumento e na semente inteira (tegumento+embrião) e isso mostra que grande parte do fenol encontrado na semente de *Acca sellowiana* está no tegumento. Reis et al. (2008), verificou que os níveis de fenóis totais em embriões zigóticos, de *Acca sellowiana*, antes da indução á embriogênese somática foi de 0.017mg ( $\pm$  0.003), o que corrobora com nossos resultados.

Em nossas análises verificamos que as sementes de *A. sellowiana*, independente do genótipo, apresentam teores de fenóis semelhantes, sendo que as sementes oriundas de polinização com a mesma classe de DEA apresentaram teores levemente maiores que as sementes de polinização cruzada ou natural. O fato das sementes de DEA3 apresentarem maior taxa de germinação (dados não publicados) poderia estar relacionado, além de outros fatores, com seu nível inferior de fenóis totais em relação às outras duas classes de DEA. Compostos fenólicos presentes na glumela de sementes de cereais causaram sua dormência e esta dormência somente foi quebrada quando as sementes foram incubadas na presença de agentes fortemente oxidantes, ou seja, que reduziram os níveis de fenóis (Benech-Arnold et al., 2006). Outros autores observaram que altas concentrações de fenóis, de pesos moleculares baixos, inibiram a germinação de sementes de *Chenopodium album* L., *Plantago lanceolata* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Solanum nigrum* L., *Cirsium* sp. e *Rumex crispus* L. *in vitro*, e baixas concentrações dos fenóis não apresentaram efeito ou foram estimulatórias (Reigosa et al., 1999).

Estudos testando os efeitos de fenóis durante a germinação de espécies florestais demonstraram que fenóis de baixo peso molecular, presentes no solo, como ácido felúrico e vanílico, inibiram a germinação de sementes, o que pode estar relacionado com a inibição da atividade de enzimas da glicólise e da rota da pentose fosfato oxidase (Muscolo et al., 2001; Kong et al., 2007). Uma das maiores mudanças que ocorrem durante a germinação é o rápido aumento na respiração. Isso envolve a glicólise, a rota da pentose fosfato oxidase (OPPP), o ciclo tricarboxílico e a fosforilação oxidativa (Muscolo et al., 2001).

Reis et al. (2008) acrescentaram compostos fenólicos exógenos no meio de cultura de indução a embriogênese somática de *Acca sellowiana* e demonstraram que a presença de cafeína em altas concentrações aumentou significativamente a formação de embriões somáticos. As sementes maduras analisadas neste trabalho apresentaram níveis de fenóis

altos, assim como as armazenadas, porém como já mencionado, a maior parte do fenol das sementes desta espécie está no tegumento. Importante mencionar que, para a indução à embriogênese somática o tegumento é retirado, e somente o embrião zigótico é utilizado como explante, o qual apresenta níveis de fenóis muito baixos, como o observado por Reis et al. (2008). No presente trabalho se observou expressiva redução no nível de fenóis totais nas sementes armazenadas a mais de um ano e estes resultados sugerem que o armazenamento da semente causa redução nos níveis de fenóis, e que isso pode ter efeitos negativos na indução da embriogênese somática, reduzindo a capacidade embriogenética do tecido.

Em *Acca sellowiana*, estudos demonstraram que após o aparecimento dos primeiros embriões somáticos, os teores de compostos fenólicos no explante diminuíram drasticamente, o que não é observado quando o meio de cultura é suplementado com fenóis exógenos (Reis et al., 2008). Alguns autores sugerem que a diminuição dos compostos fenólicos da cultura durante a formação dos embriões somáticos está relacionada com o aumento nos teores de auxinas (Alemanno et al., 2003; Cvikrová e Hrubcová, 1999) e que em *A. sellowiana* possa haver um acúmulo de auxinas que favorece a indução da embriogênese somática (Reis et al., 2008). Cangahua-inocente et al. (2004) observou a presença de compostos fenólicos nas células induzidas à embriogênese somática sugerindo que estes compostos inibem a hiperhidricidade, servindo como precursores da síntese de lignina, confirmando a existência de uma possível relação entre os níveis de compostos fenólicos e o sucesso da embriogênese somática. Assim, no caso de *A. sellowiana* seria interessante para a indução da embriogênese somática que os embriões zigóticos apresentassem altos teores de fenóis ou então que compostos fenólicos fosse adicionados ao meio de cultura.

Em resumo, os resultados do presente trabalho demonstram a presença de quantidades consideravelmente altas de fenóis totais nas sementes de *Acca sellowiana* principalmente no tegumento, e que suas concentrações são independentes do genótipo da planta, porém diminuem muito quando as sementes são armazenadas por longos períodos. As altas concentrações destes compostos podem estar influenciando na germinação das sementes e no processo de indução à embriogênese somática. Porém, análises qualitativas necessitam ser realizadas para verificar, com exatidão, quais compostos fenólicos ocorrem com abundância e quais seus respectivos papéis durante estes processos.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALEMANNI, L.; RAMOS, T.; GARGADENEC, A.; ANDARY, C.; FERRIERE, N. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. Somatic embryogenesis. **Annals of Botany**. v.92, p. 613-623, 2003.

ABENAVOLI, M.R.; CACCO, G.; SORGONA A.; MARABOTTINI R.; PAOLACCI A.R.; CIAFFI M. The inhibitory effects of coumarin on the germination of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum. cv. Simeto) seeds. **Journal of Chemistry Ecology**. v.32, p.489-506, 2006.

BENECH-ARNOLD, R.L.; GUALANO, N.; LEYMARIE, J.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. **Journal of Experimental Botany**. v.57, p.1423-1430, 2006.

BETA, T.; NAM, S.; DEXTER, J.E.; SAPIRSTEIN, H.D. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. **Cereal Chemistry**. v. 82, p. 390-393, 2005.

BOGDANOVIĆ, J.; ĐIKANOVIC, D.; MAKSIMOVIĆ, V.; TUFEGDŽIĆ, S.; ĐOKOVIĆ, D.; ISAJEV, V.; RADOTIĆ, K. Phenolics, lignin content and peroxidase activity in *Picea omorika* lines. **Biologia Plantarum**. v.50, p.461-464, 2006.

BURRITT, D. J.; MACKENZIE, S. Antioxidant metabolism during acclimation of *Begonia x erythrophylla* to high light levels. **Annals of Botany**. v. 91, p. 1-12, 2003.

CVIKROVÁ, M.; HRUBCOVÁ, M. The role of phenolic substances in the processes of differentiation and morphogenesis. In: Strnad, M., Pec, P., Beck, E. **Advances in regulation of plant development**. Peres Publications, Prague. 1999

DE LA TORRE, R. Bioavailability of Olive Oil Phenolic Compounds in Humans **Inflammopharmacology**. v.16, p.245-247, 2008.

GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; HARUENKIT, R.; CHUTHAKORN, R.; GRAUER, F.; MARTIN-BELLOSO, O. Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 10, p.367-371, 1999.

KONG, L.; WANG, F.; SI, J.; FENG, B.; LI, S. Water-soluble phenolic compounds in the coat control germination and peroxidase reactivation in *Triticum aestivum* seeds. **Plant Growth Regulation**. v. 56, p. 275-283. 2008.

KAVIARASAN, S.; SUNDARAPANDIYAN, R.; ANURADHA, C.V. Protective action of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed polyphenols against alcohol-induced protein and lipid damage in rat liver. **Cell Biology and Toxicology**. v.23, p. 373-383, 2007.

KAVIARASAN, S.; VIJAYALAKSHMI, K.; ANURADHA, C.V. Polyphenol-Rich Extract of Fenugreek Seeds Protect Erythrocytes from Oxidative Damage. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.59, p.143-147, 2004.

LORENZO, J.C.; BLANCO, M.A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v.65, p.1-8, 2001.

MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M.R.; SIDARI, M. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination Respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. **Plant Growth Regulation**. v.35, p.31-35, 2001.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; PANUCCIO, M.R.; DE SANTIS, C.; FINOCCHIARO, A. Early effects of phenolic compounds, extracted from two forest litters, on ammonium uptake and assimilation in *Pinus laricio* and *Pinus pinaster* seedlings. **Plant and Soil**. v. 269, p.309-320, 2005.

MARTIN, K.P.; MADASSERY, J. Direct and indirect somatic embryogenesis on cotyledon explants of *Quassia amara* L., an antileukaemia drug plant. **In Vitro Cell Development Biology**. v. 41, p. 54-57, 2005.

OH, M-M.; TRICK, H.N.; RAJASHEKAR, C.B. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. **Journal of Plant Physiology**. v. 160, p. 180-191, 2008.

PIRUZIAN, E.S.; GOLDENKOVA, I.V.; LENETS, A.A.; CVIKROVÁ, M.; MACHÁKOVÁ, I.; KOBETS, N.S.; METT, V.L.; MUSIICHUK, K.A. Physiological and Biochemical Characteristics of Tobacco Transgenic Plants Expressing Bacterial Dioxygenase. **Russian Journal of Plant Physiology**. v. 49, p.817-822, 2002.

REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.18, p. 577-608. 1999.

REIS, E.; BATISTA, M.T.; CANHOTO, J.M. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg **Protoplasma** v.232, p.193-202, 2008.

SARKAR, D.; NAIK, P.S. Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 60, p.139-149, 2000.

XIE, Z.; ZHANG, Z-L.; HANZLIK, S.; COOK, E.; SHEN, Q. J. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. **Plant Physiology**. v.64, p. 293-303, 2007.

YOSHITAMA, K. Recent Advances in Secondary Metabolism Research: Regulation of Biosynthesis and Physiological Functions of Flavonoids and Some Phenolics. **Journal of Plant Research**. v. 113, p.285, 2000.



## **CAPÍTULO 4**

Perfil protéico de culturas embriogênicas e não-embriogênicas de *Acca sellowiana*

## RESUMO

A micropropagação é uma alternativa para a propagação de plantas recalcitrantes aos métodos convencionais de multiplicação como é o caso da *Acca sellowiana*. É possível se obter mudas *in vitro* desta espécie por meio de duas rotas metabólicas: a embriogênese somática e a organogênese. Para um melhor entendimento dos processos que desencadeiam a embriogênese e que servem para promover avanços na investigação da biologia desses processos complexos e suas aplicações biotecnológicas, estudos relacionados com o metabolismo protéico destes processo se fazem necessários. O objetivo deste trabalho foi identificar diferenças nos perfis protéicos de culturas embriogênicas e não-embriogênicas de *Acca sellowiana*, obtidas a partir de embriões zigóticos maduros. Cotilédones de embriões zigóticos de *Acca sellowiana*, induzidos a embriogênese somática, que produziram embriões somáticos, foram coletados aos 45 e 60 dias após o cultivo, e os que não produziram, aos 60 dias. As amostras foram submetidas ao método de extração de proteínas descrito por Carpentier et al.(2005), e quantificadas pelo método de Bradford. O perfil protéico das culturas foi analisado por meio da eletroforese-SDS e eletroforese bidimensional. Foram observadas bandas específicas das culturas embriogênicas com, aproximadamente, 5 e 17,21 kDa. Com eletroforese bidimensional, foi possível verificar que grande parte das proteínas expressas nas culturas se encontra com o ponto isoelétrico entre o pH 4 e 7. Três spots foram identificados como comuns às culturas embriogênicas e não-embriogênicas, e dois spots como sendo específicos das culturas embriogênicas. A cultura contendo maior concentração de proteínas foi a embriogênica, a qual produziu embriões somáticos aos 60 dias apresentaram maiores concentrações de proteínas. Conclue-se existem proteínas marcadoras de competência embriogênica, porém análises mais aprofundadas necessitam serem realizadas para a sua identificação.

Palavras chaves: *Acca sellowiana*, culturas embriogênicas, perfil protéico

## ABSTRACT

Micropropagation techniques are valuable tools for the large scale propagation of plants recalcitrant to other propagation methods. This is the case of *Acca sellowiana* in which traditional vegetative propagation methods do not show good standards. It is possible to obtain *in vitro* plantlets by means of two morphogenetic routes: somatic embryogenesis and organogenesis. In somatic embryogenesis the processes that trigger the development of the embryo are complex and the metabolism of proteins plays a major role. The present work aimed to identify differences between protein profiles of embryogenic and non-embryogenic cultures of *Acca sellowiana*, obtained from mature zygotic embryos. Cotyledons of zygotic embryos were inoculated in embryogenic inductive conditions generating two types of cultures: those producing somatic embryos from 45 to 60 days in culture and those that did not produced somatic embryos after 60 days in culture. The samples were submitted to the method of extraction of proteins described by Carpentier et al. (2005), and quantified by the method of Bradford. The protein profile was analyzed by means of SDS-electrophoresis and two-dimensional electrophoresis. There were bands of specific cultures embryogenic with approximately 6,25 and 17.05 kDa. With two-dimensional electrophoresis it was possible to verify that most of the protein is expressed in the cultures with the isoelectric point ranging from pH 4 to 7. Three spots were identified as common crop embryogenic and non-embryogenic culture, and two spots as specific to embryogenic cultures. Embryogenic cultures producing somatic embryos after 60 days showed enhanced protein levels. Thus, there are proteins which are specific markers of embryogenic competence, and further tests need be performed to identify them.

Keywords: *Acca sellowiana*, embryogenic cultures, protein profile

## 1 INTRODUÇÃO

A micropropagação é uma alternativa a espécies que apresentam dificuldades nas outras formas de propagação, como é o caso da *Acca sellowiana* cuja, propagação vegetativa por estaquia e enxertia não apresenta bons resultados (Facchinello et al., 1992). Neste caso a aplicação de técnicas baseadas na micropropagação se torna uma alternativa concreta. Assim, nas condições *in vitro* é possível a obtenção de mudas por meio da embriogênese somática e a organogênese.

A organogênese em *A. sellowiana* foi descrita a partir de microestacas que foram enraizadas *in vitro* em meios de cultura com reguladores de crescimento específicos possibilitando a formação de plântulas completas (Dal Vesco & Guerra, 1999). Segmentos nodais também apresentaram boas taxas de proliferação *in vitro*, e as microestacas resultaram em plantas mais altas (Oltremari et al., 2000). Com relação à embriogênese somática Guerra et al. (1997) desenvolveram um protocolo a partir de embriões zigóticos maduros. Estudos subsequentes foram realizados, visando esclarecer pontos fundamentais no processo de embriogênese somática. Os melhores resultados de indução ocorreram a partir de embriões zigóticos cultivados em meio de cultura LPM, suplementados com 2,4-D. Foi estudada também a competência embriogênica de tecidos florais de *A. sellowiana* e investigada a influência de reguladores de crescimento na indução e desenvolvimento de embriões somáticos, sendo esse o primeiro estudo com esta espécie a partir de tecidos somáticos (Stefanello et al., 2005). Embriões somáticos oriundos de culturas embriogênicas foram encapsulados em alginato de sódio para a obtenção de sementes sintéticas, porém a conversão dos embriões em plântulas foi baixa (Cangahuala-Inocente et al., 2007).

Com relação às abordagens associadas ao metabolismo desta rota morfogênica *in vitro*, detectou-se uma diminuição dos teores de proteínas durante o desenvolvimento das culturas embriogênicas, bem como um aumento nos teores de açúcares solúveis totais e amido, o que afetou a indução e desenvolvimento dos embriões somáticos (Cangahuala-Inocente, 2002). Nestes, os teores de proteínas aumentaram de acordo com a evolução de seus estágios de desenvolvimento. Por sua vez, os níveis de açúcares e amido foram altos nos estágios coração e cotiledonar e baixos nos estágios torpedo e pré-cotiledonar.

Vários estudos nesse sentido foram feitos com diversas espécies, detectando variações nos níveis de expressão de determinadas proteínas, em diferentes condições de cultivo (Dodeman e Ducreux, 1996; Silveira, 2001; Cangahuala-Inocente, 2002; Cangahuala-Inocente et al., 2004; Cangahuala-Inocente, 2007; Lippert et al., 2005). Estudos relacionados com o

metabolismo das proteínas são importantes para um melhor entendimento dos processos que desencadeiam o desenvolvimento do embrião e servem para promover uma renovação tanto da investigação da biologia desses processos complexos quanto para gerar oportunidades para novas pesquisas (Lippert et al., 2005).

Durante o desenvolvimento do embrião, proteínas, lipídios e amido são sintetizados e depositados nos cotilédones para serem utilizados durante a conversão a plântula. Posteriormente o embrião entra em dormência devido à perda de água e interrupção da expressão gênica e síntese de proteínas (Taiz & Zeiger, 2004). Estudos vêm sendo feitos para qualificar e quantificar populações de mRNAs e proteínas, visando decifrar a função e regulação que representam ligações entre o genótipo e fenótipo (Rose et al., 2004). Baba et al. (2008) demonstraram em seus experimentos com 2-DE, que estudos com a proteômica associados a estudos histológicos podem ajudar a identificar proteínas marcadoras do desenvolvimento da embriogênese somática de *Manihot esculenta*, proporcionando evidências no entendimento das causas da baixa taxa de conversão dos embriões somáticos em plântulas.

A ativação do processo de embriogênese somática desencadeia expressão de diversos genes codificando para diferentes proteínas expressas durante a iniciação da embriogênese somática em culturas de embriões zigóticos maduros (Chugh e Khurana, 2002; Guerra et al., 2001). O estudo do proteoma de culturas embriogênicas nos permite identificar marcadores protéicos das culturas e melhorar o protocolo da embriogênese. A técnica da embriogênese somática em *Acca sellowiana* está bem fundamentada, pois tem sido estudada desde 1997 no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC. Uma vez identificadas as proteínas chaves nas culturas embriogênicas seria possível identificar culturas embriogênicas e não-embriogênicas em outros acessos o que poderia aumentar a eficiência do protocolo regenerativo para esta espécie, servindo como referência para outras espécies arbóreas.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar diferenças nos perfis protéicos de culturas embriogênicas e não-embriogênicas de *Acca sellowiana*, obtidas a partir de embriões zigóticos maduros.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material Vegetal**

Foram usados como explantes, cotilédones de embriões zigóticos maduros de *Acca sellowiana*, oriundos do cruzamento entre os acessos 101 e 458 pertencentes ao Banco ativo de Germoplasma da Estação Experimental da EPAGRI de São Joaquim. Os frutos foram coletados aos 120 dias após a polinização e sua polpa foi retirada e colocada em solução de enzima pectolítica (Endozim ICS 10 Rouge) (1,6ml/kg) (J.P.H.J. DUCROQUET, comunicação pessoal). Após 12 hrs, as sementes foram lavadas em água corrente, separadas da polpa com o auxílio de uma peneira e postas para secar em papel toalha em temperatura ambiente. Quando estavam totalmente secas foram armazenadas em geladeira a 4°C, até o momento da inoculação.

### **2.2 Indução a embriogênese somática**

As sementes de *Acca sellowiana*, 12 horas antes da inoculação, foram submetidas a um tratamento com solução de hipoclorito de sódio 1% e posteriormente lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Posteriormente o tegumento e o hilo foram retirados e os embriões zigóticos, após excisados, foram inoculados (20) em placas de petri contendo 30 ml de meio de cultura LPM básico (maltose 3%; vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951)), geleificado com phytigel (0,2%), com pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C a 1ATM por 15 min. Procedeu-se a separação dos cotilédones do eixo embrionário. As culturas foram mantidas em sala de crescimento no escuro à temperatura de 25±2°C. Após dois dias, quando já era possível identificar visualmente os cotilédones, os mesmos foram retirados e inoculados aos pares em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura LPM suplementado com 2,4-D (20µM). Aos 45 dias de cultivo as culturas foram avaliadas, quanto à produção ou não de embriões somáticos. As culturas que produziram embriões somáticos foram separadas dos embriões somáticos e coletadas em tubos eppendorfs e armazenadas a -20°C. O mesmo procedimento foi realizado aos 60 dias de cultivo, porém nesta etapa, foram coletadas também as culturas que não produziram embriões somáticos.

### **2.3 Extração das proteínas solúveis**

Para extração das proteínas solúveis, foi utilizado o método descrito por Carpentier et al. (2005) com modificações. Utilizou-se 300mg de massa fresca de cotilédones induzidos a embriogênese somática. Estes foram liofilizados e macerados com Nitrogênio Líquido, então com o auxílio de uma micropipeta 500 µl de tampão Tris-HCl de extração (Tris-HCl 50mM pH 8,5; EDTA 5mM; KCl 100mM; DTT 1% (v/v); Sacarose 30%; inibidor de protease 1%

(v/v)) foram adicionados ao pó ainda do graal, e então transferido para um tubo eppendorf, onde foi homogeneizado por 30s no vórtex e então adicionado 500 µl de Tampão Fenol ultra-puro Saturado (Invitrogen®), antes da centrifugação a 6000 rpm por 3 min. à 4°C, a amostra foi homogeneizada por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, a fase fenólica (Superior) foi coletada. O procedimento foi repetido para re-extração a partir da fase fenólica. A fase fenólica final foi transferida para um tubo (15ml), onde foi adicionado acetato de amônio (100 mM) em metanol, até completar o volume total do tubo. Após precipitação “overnight” em freezer -20°C, foi centrifugado a 6000 rpm por 30 min. à 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet seco ao ar em temperatura ambiente, o qual foi ressuspensionado com 100µl de tampão de solubilização (Uréia 7M; Tiouréia 2M; CHAPS 4% (v/v); IPG buffer 0,8% (v/v); DTT 1% (v/v)). As amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o momento da quantificação.

#### **2.4 Quantificação das Proteínas**

A quantificação foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Foram coletados 10µl da amostra e separada em um tubo (2 ml), onde foi adicionado 10 µl de tampão de solubilização, então 2ml de solução de Bradford 20% (v/v) em água ultrapura. As amostras foram colocadas em repouso, no escuro, por 10min. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV1230) a 595nm. Como branco foi utilizado 20µl de solução de solubilização. Todas as análises foram realizadas em triplicata com base na curva padrão de albumina de soro bovino ( $y = 0,0088x + 0,0279$  ;  $R = 0,987$ ).

Os dados coletados foram submetidos à análise da variância, com o auxílio do Programa SPSS 11.5 para Windows, detectadas diferenças significativas, foi realizado teste de separação de médias Tukey (0,05).

#### **2.5 Eletroforese-SDS das proteínas solúveis**

O equivalente á 20µg de proteínas foi usado para análise eletroforética. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 12%, 0,75mm de espessura, em condições desnaturantes, com 60v/gel por 15min. e 120v/gel por ± 1hora. Os géis foram fixados em solução de metanol (50%), ácido acético (12%) e água destilada por 6 horas, e então corados com Azul de Coomassie Coloidal G-250 (Sulfato de amônio 10%, ácido fosfórico 1% (w/w), azul de Coomassie G-250 0,1%, 400ml de água), por 12 horas, e descorados com ácido acético 1% (v/v). Os géis foram armazenados em solução de ácido acético 0,1% a 4°C. Após as imagens dos géis serem geradas, os pesos moleculares das proteínas foram inferidos a partir da curva

de migração (Log.peso de padrão molecular;  $y = -0,5817x + 5,4605$   $R^2 = 1$ ) baseada nas distâncias percorridas pelas bandas ao longo do gel (6,61cm).

## 2.6 Eletroforese Bidimensional (2-DE)

A eletroforese foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Carpentier et al. (2005). O equivalente a 100 $\mu$ g de proteínas foram ressuspensas em 125 $\mu$ l tampão de rehidratação (Uréia 7M; Tiouréia 2M; CHAPS 2%; IPG buffer (0,5%); azul de bromofenol 0,002% (1%); DTT (1%)), para tiras desidratadas (IPG dry strips) de 7cm, com gradiente de pH de 3 a 10, mantidas em repouso por 12 horas. A eletrofocalização (IEF-1<sup>o</sup> dimensão) das Proteínas no gradiente de pH, foi realizada em Ettan IPGPhor (General Electric Healthcare) a 20°C com limite de corrente de 50mA/strip. Durante 1hr e 30 min, a voltagem foi de 300V, então em modo gradiente passou para 1000V por 30 min. em modo gradiente aumentou para 5000V por 1 hora e 20 min. A 5000V permaneceu durante 30 min. Totalizando, aproximadamente, 6500 Vh.

Para a segunda dimensão, as tiras foram tratadas em 6 ml de solução de equilíbrio (Tris-HCl 1,5M pH 8,8; Uréia 6M; Glicerol (30%); SDS (2%); Azul de bromofenol (1%)) contendo de DTT (125mM) durante 15 minutos, em seguida por mais 15 minutos na mesma em solução de equilíbrio contendo 125mM de iodoacetamida. As tiras equilibradas, contendo as proteínas, foram fixadas ao gel SDS de eletroforese com agarose 0,5%. A separação das proteínas de acordo com o peso molecular (2<sup>o</sup> dimensão), foi realizada em gel de poliacrilamida SDS 12%, com 1,5mm de espessura, a corrida eletroforética se deu com 20mA/gel por 15 min, e 30mA/gel por 1 hora. O marcador protéico padrão de peso molecular utilizado, foi com peso molecular de 6,5 a 196 kDa (Bio Rad).

Os géis foram fixados em solução de metanol (50%), ácido acético (12%) e água destilada por 6 horas e corados com Azul de Coomassie Coloidal G-250 por 12 horas, e descorados com ácido acético 1% (v/v). Os géis foram armazenados em solução de ácido acético 0,1% a 4°C.



### 3 RESULTADOS

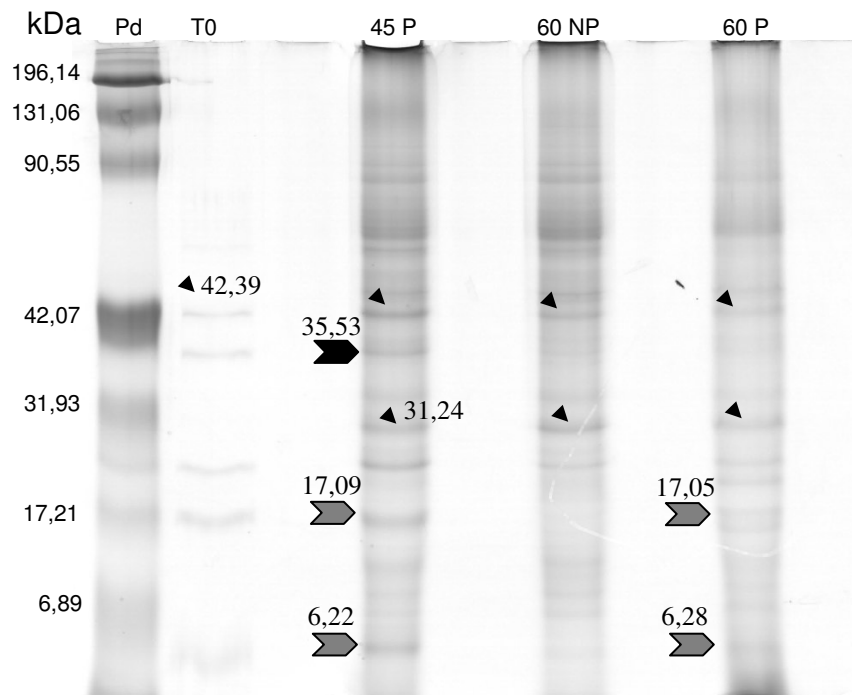
As culturas que produziram embriões somáticos aos 45 dias de cultivo apresentaram teores protéicos de 39,97 µg/g de MF, enquanto que as culturas de 60 dias de cultivo apresentaram 51,16 µg/g de MF. As culturas, que aos 60 dias de cultivo ainda não haviam produzido embriões somáticos apresentaram níveis intermediários de proteínas solúveis, 47,46 µg/g de MF. De acordo com a análise da variância observou-se diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), sendo que aos 60 dias as culturas que produziram embriões somáticos apresentaram os teores mais elevados de proteínas solúveis (Tabela 4a). Os dados de quantificação para o tempo 0 (zero) de cultivo, não foram considerados devido a perda de grande parte da amostra antes da leitura.

**Tabela 6.** Proteínas solúveis de culturas embriogênicas e não-embriogênicas de *Accasellowiana*, obtidas a partir de embriões zigóticos.

<b>Tempo de cultivo e produção de embrião somático</b>	<b>Médias (µg/g de MF)</b>
45 dias /produziu embrião somático	39,97c
60 dias / produziu embrião somático	51,16a
60 dias/ não produziu embrião somático	47,46b

Letras diferentes na mesma coluna representam médias estatisticamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

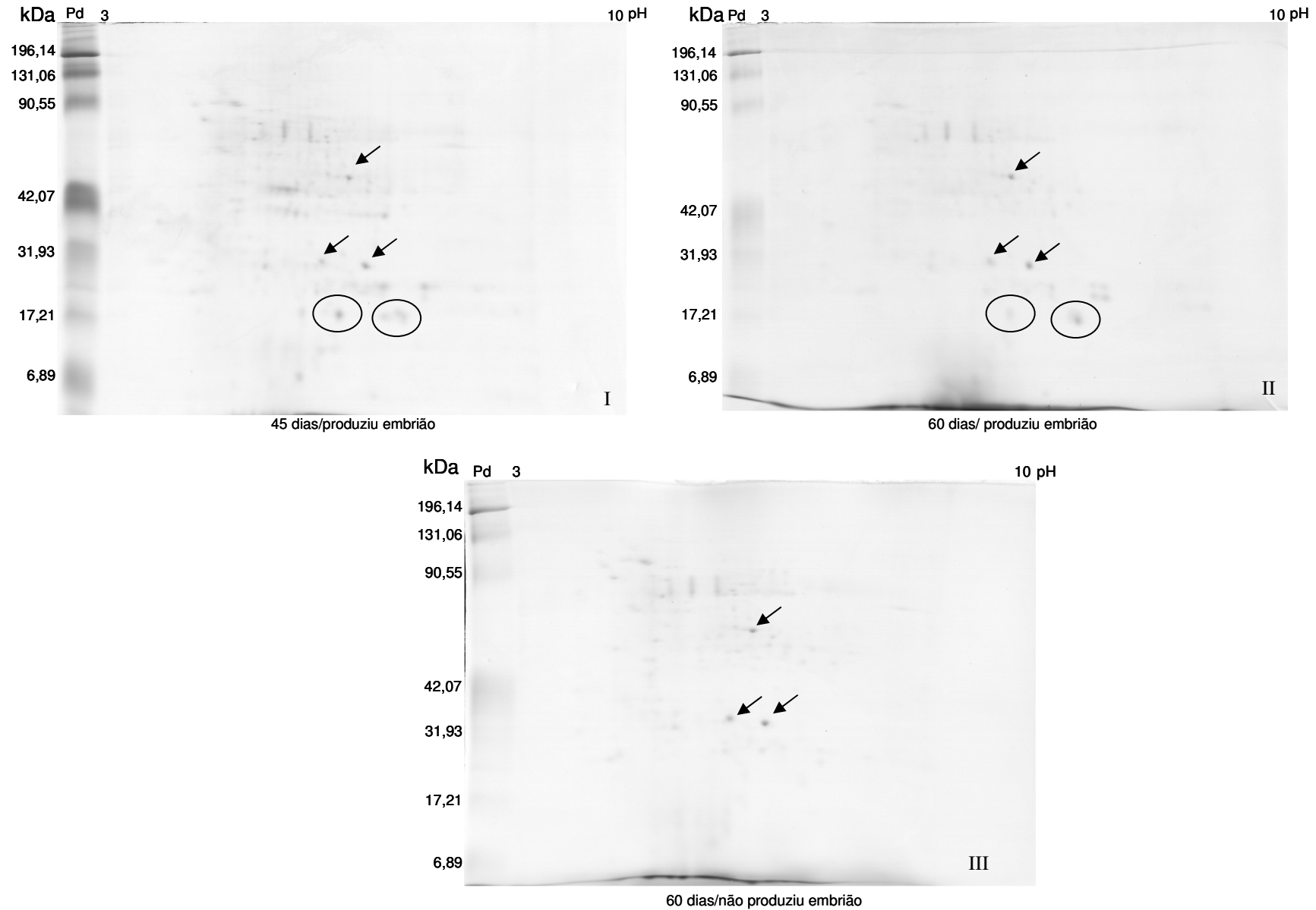
A análise das proteínas por eletroforese SDS revelou diferenças nos perfis protéicos das culturas embriogênicas e não-embriogênicas. As culturas embriogênicas aos 45 dias, apresentaram 3 bandas que se destacam, com 35,53, 17,09 e 6,22 kDa, das quais duas ocorreram também no perfil da cultura que produziu embriões somáticos aos 60 dias de cultivo (17,05 e 6,28 kDa), embora não na mesma intensidade. Das três bandas observadas, nenhuma apareceu no perfil da cultura não-embriogênica, a qual não apresentou bandas específicas (Figura 4b).



**Figura 15.** Perfil protéico em gel de poliacrilamida-SDS de culturas embriogênicas, aos 45 e 60 dias de cultivo, e não-embriogênica aos 60 dias de cultivo. Pd-padrão de peso molecular Kaleidoscope Precision Plus Protein Prestained Bio-Rad (10-250kDa); T0-tempo zero de cultivo; 45P- produziu embriões somáticos aos 45 dias de cultivo; 60NP- não produziu embriões somáticos até os 60 dias de cultivo; 60P- produziu embriões somáticos aos 60 dias de cultivo. Esquerda- peso molecular, em kDa, das bandas do Pd.

Nas análises de proteínas por eletroforese bidimensional foi possível detectar spots específicos das culturas embriogênicas e não embriogênicas e comuns entre elas. Estas observações corroboraram com os resultados associados as bandas encontradas no primeiro gel. Três spots comuns entre os tratamentos foram detectados na faixa de pH entre 4 e 7, e com peso molecular de aproximadamente 40 kDa. Spots comuns somente entre as culturas embriogênicas foram observados na mesma faixa de pH, e com peso molecular de aproximadamente 17 kDa (Figura 4c). Como observado nos dois testes de eletroforese, grande parte das proteínas se concentra na faixa de peso molecular entre, 17 e 100 kDa.

**Figura 4c.** Perfil bidimensional das proteínas de culturas embriogênicas e não-embriogênicas de *Acca sellowiana*, obtidas a partir de embriões zigóticos. I- cultura embriogênica que produziu embrião somático aos 45 dias de cultivo. II- Cultura embriogênica que produziu embrião somático aos 60 dias de cultivo. III-Cultura não-embriogênica, aos 60 dias de cultivo. Seta- spots comuns à todos; Circulo-spots comuns somente as culturas embriogênicas.



#### 4 DISCUSSÃO

As análises eletroforéticas mostraram diferenças no perfil protéico das culturas embriogênicas e não-embriogênicas. Houve maior concentração de proteínas na cultura embriogênica que produziu embriões somáticos aos 60 dias. Serra et al. (2000) encontrou teores similares de proteínas em calos não-embriogênicos de *Bertholletia excelsa*, aos 60 dias de cultivo, teores estes menores que os encontrados aos 45 dias de cultivo. Os autores sugeriram que o declínio no teor das proteínas poderia estar relacionado com a fase de desaceleração da curva de crescimento da cultura, momento em que há redução de nutrientes no meio de cultura e o acúmulo de substâncias tóxicas. Um declínio nos teores de proteínas de culturas embriogênicas de *Pinus taeda*, na fase de desaceleração da curva de crescimento, também foi observado (Silveira, 2001), porém as concentrações de proteínas encontradas nas culturas foram superiores às encontradas nas culturas embriogênicas deste trabalho. O mesmo autor, identificou 5 bandas no perfil protéico de culturas embriogênicas com o peso molecular entre 19 e 97 kDa. Em *Ocotea catharinensis*, não foi observada diferença significativa entre as concentrações de proteínas de culturas embriogênicas e não-embriogênicas, mas foram encontradas diferenças sutis no perfil protéico das culturas, porém somente com eletroforese bidimensional foi possível identificar as proteínas diferencialmente expressas, totalizando 30 spots, os quais se encontravam na faixa de pH de 4 a 7, e com peso molecular entre 10 e 30 kDa (Moraes, 2007).

A de-diferenciação e subsequente embriogênese somática estão associadas com mudanças complexas no padrão de proteínas. Mudanças no metabolismo celular e a iniciação de um novo programa de desenvolvimento geram a necessidade de novas proteínas que devem ser adequadas para garantir que suas funções sejam executadas. Essas modificações são controladas por proteínas que apresentam atividades chaperonas, incluindo as proteínas de choque térmico (Fehér, 2003).

Cangahuala-Inocente (2002), detectou níveis de 0,5mg/g de MF de proteínas em culturas embriogênicas de *Acca sellowiana*, aos 60 dias após a indução, valor este muito superior ao encontrado neste trabalho. As proteínas específicas das culturas embriogênicas, do presente trabalho, se encontravam com o peso molecular de aproximadamente 17,6 kDa, com ponto isoelétrico entre pH 4 e 7. Como revisado por Dodeman e Ducreux (1996), em *Oriza sativa* muitas proteínas foram detectadas em calos embriogênicos, entre 40 e 44 kDa, e não apareceram em não-embriogênicos. Proteínas com peso molecular em torno de 24 kDa, foram encontradas especificamente em calos não-embriogênicos. Em calos embriogênicos de *Pisum sativum*, com o auxílio de eletroforese 2DE, foi possível a identificação de duas proteínas de

45 e 70 kDa, com ponto isoelétrico entre o pH 4 e 7, sugerindo se tratar das mesmas proteínas encontradas em arroz e também em cenoura. Porém, existem evidências de que as proteínas específicas de culturas embriogênicas desaparecem nos primeiros estágios dos embriões somáticos e reaparecem nos estágios mais tardios, portanto, não se pode evidenciar proteínas específicas de culturas embriogênicas (Fehér, 2003). Dodeman e Ducreux (1996) observaram que ocorreram mudanças em apenas 7,2% das proteínas identificadas (1000), durante o processo de transição de células embriogênicas, de cenoura, para formação dos embriões, o que confirma a teoria de que poucos genes estão envolvidos no processo de desenvolvimento de embriões somáticos.

Em *Pinus strobus*, a maioria das proteínas detectadas em embriões somáticos e zigóticos eram de peso molecular entre 22 e 50 kDa (Klimaszewska et al., 2004). Estudos com sementes de *Psidium guajava* demonstraram que as proteínas mais abundantes foram as albuminas, globulinas e prolaminas. Em testes de eletroforese, os polipeptídios de Albumina aparecem com o peso molecular entre 14 e 73 kDa. As globulinas se apresentam em sua maioria com 58kDa. As prolaminas apresentam bandas maiores de 94kDa. Glutalinas extraídas com solventes contendo SDS apresentaram bandas com maior intensidade no ponto isoelétrico 7,5 (Bernardino-Nicanor et al., 2005). De acordo com a faixa de peso molecular e pH da proteínas encontradas neste trabalho, sendo o embrião zigótico da *Acca sellowiana* a fonte de explante para induzir embriogênese somática, grande parte das proteínas encontradas, podem pertencer a um ou mais dos grupos de proteínas encontrados por Bernardino-Nicanor et al. (2005) *Psidium guajava*, visto que as duas espécies pertencem á mesma família. Porém, análises mais detalhadas, com o auxílio de software de análise de imagens e análise de massa por espectrômetro, necessitam ser realizadas para inferir conclusões sobre quais proteínas são realmente marcadoras de culturas embriogênicas de *Acca sellowiana*.

Em resumo, neste trabalho foram identificadas diferenças significativas nos perfis protéicos e bidimensionais de culturas embriogênicas e não-embriogênicas. Grande número de proteínas foram expressas em culturas embriogênicas, sendo as possíveis proteínas marcadoras de culturas embriogênicas aquelas com peso molecular de aproximadamente 17 e 6 kDa, e ponto isoelétrico entre o pH 4 e 7.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p.248-254, 1976.

BERNARDINO-NICANOR, A.; SCILINGOB, A. A.; ANONB, M. C.; DAVILA-ORTIZ, G. Guava seed storage protein: Fractionation and characterization **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**. v.39, p.902-910, 2006.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C. Embriogenese somática e sementes sintéticas em *Feijoa sellowiana* Berg. Aspectos fisiológicos, morfo-histológicos e bioquímicos. Mestrado em Recursos genéticos Vegetais. Universidade Federal de Santa Catarina. 2002.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.; TORRES A. C.; GUERRA M. P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds **Scientia Horticulturae** v.111, p.228-234, 2007.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P., SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**. v.5, p. 2497-2507, 2005.

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

DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Organogênese e micropropagação da goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.21, p.60-64, 1999.

DUCROQUET, J. P. H. J.; HICKEL, E. R.; NODARI, R. O. Goiabeira-Serrana (*Feijoa sellowiana*). **Sociedade Brasileira de Fruticultura/FUNEP**, 1. ed. Jaboticabal 66p. 2000.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G. Total protein pattern expression during induction and development of carrot somatic embryos. **Plant Science**. v. 120, p.57-69, 1996.

FACCHINELLO, J.C.; MIELKE, M.S.; NACHTIGAL, J. de C. Propagação vegetativa de goiabeira-serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.14, p. 233-236, 1992.

GUERRA, M.P.; PESCADOR, R.; DAL VESCO, L.L.; NODARI, R.O.; DUCROQUET, J.P.; In vitro Morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration. **Acta Horticulture**. v. 452, p.27-36, 1997.

GUERRA, M.P; DAL VESCO L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS M. S. Somatic Embryogenesis In Goiabeira Serrana: Genotype Response, Auxinic Shock And Synthetic Seeds **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.13, p.117-128, 2001.

FEHER, 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.

KLIMASZEWSKA, K.; MORENCYA, F.; JONES-OVERTONA, C.; COOKE, J. Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. **Physiologia Plantarum**. v.121, p. 682-690, 2004.

LIPPERT, D.; ZHUANG, J.; RALPH, S.; ELLIS, D.E.; GILBERT, M.; OLAFSON, R.; RITLAND, K.; ELLIS, B.; DOUGLAS C.J.; BOHLMANN Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca* **Proteomics**. v.5, p.461-473, 2005.

MORAES, F. M.S. Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriônica de *Ocotea catharinenses* MEZ. (Laureaceae). Mestrado em Biologia Molecular. **Universidade de Brasília**. 2006.

MOREL, G M.; WETMORE, R H. Tissue culture of monocotyledons. **Journal of Botânica**. v.38, p.138-140, 1951.

OLTRAMARI, A. C.; DAL VESCO, L. L.; PEDROTTI, E. L.; DUCROQUET, J-P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M.P. Protocolo De Micropropagação Da Goiabeira Serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) **Ciência Rural**. v. 30, p.61-68, 2000.

ROSE, J.K.C.; BASHIR, S.; GIOVANNONI, J.J.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, R.S. Tackling the Plant Proteome: approaches, hurdles and experimental tools. **The Plant Journal**. v.39, p.715-733, 2004.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. DE O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* h. B. K.). **Ciência e Agrotecnologia**. v.24, p.833-840, 2000.

SILVEIRA, V. Indução e controle da embriogênese somática em *Pinus taeda* L. Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Federal de Santa Catarina. 2001.

STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulture**. v. 105, p.117-126, 2005.



### III-CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados do presente trabalho geraram importantes informações sobre aspectos bioquímicos e fisiológicos do metabolismo da embriogênese zigótica e somática de *Acca sellowiana*. Experimentos testando o efeito do Fluridone, um inibidor da síntese de carotenóides, na conversão de embriões somáticos da espécie, mostram que os embriões somáticos de *Acca sellowiana* são sensíveis à baixas concentrações do composto e que a suplementação do mesmo ao meio de cultura para conversão, aumenta a taxa de conversão dos embriões somáticos em plântulas, embora ainda haja altas taxas de embriões somáticos anormais.

No Capítulo 2, os teores de fenóis encontrados nas sementes oriundas de diferentes genótipos, foram muito elevados, porém não houveram diferenças significativa entre eles. Isso mostra que a síntese de metabólitos secundários das sementes não é genótipo dependente, porém quando as sementes são armazenadas por um ano ou mais, esses teores diminuem pela metade. Não foi encontrada diferença significativa nos níveis de fenóis durante os estágios de desenvolvimento da semente. No tegumento é onde está concentrada a maior parte dos fenóis encontrados na semente. Esses dados são esclarecedores para o processo de embriogênese somática da espécie, visto que a fonte de explante para a indução é o embrião zigótico. E considerando que existem evidências de forte influência, positiva ou negativa, dos fenóis durante o processo de indução à embriogênese somática, este trabalho sugere que análises qualitativas dos fenóis sejam realizadas visando identificar quais compostos fenólicos são mais abundantes.

As análises de ABA, AIA e PAs realizadas em sementes de polinização de mesma classe de DEA e polinização natural mostram que sementes originadas de flores com mesma classe de DEA apresentam maior poder germinativo. Os resultados mostram que o modo de polinização interfere diretamente na síntese de hormônios endógenos. Os resultados com ABA confirmam o maior poder germinativo das sementes de da mesma classe de polinização, sendo seus níveis nesta, muito superiores aos encontrados em sementes originadas de polinização natural. O mesmo foi observado para PAs das quais a Spd é a mais abundante, sendo esta relacionada com a síntese de ABA e a boas condições fisiológicas da semente durante a germinação. Os níveis de AIA estão inversamente correlacionados com os de ABA e PAs, sendo que as sementes originadas de polinização natural apresentaram concentrações mais elevadas deste hormônio.

A utilização da técnica de proteômica para identificar proteínas marcadoras de competência embriogênica mostrou-se eficiente, porém outras análises necessitam serem

realizadas, bem como o aprimoramento do protocolo. Neste trabalho foi possível identificar diferenças nos perfis protéicos das culturas embriogênicas e não-embriogênicas.

Em resumo, a união de várias técnicas possibilitou gerar conhecimento e informações que ajudarão a fortalecer as linhas de pesquisa com esta espécie.