

**POLIAMINAS COMO MODULADORES DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE
*Araucaria angustifolia***

Dutra N.T.¹, Gomes-Neto L.R.², Azevedo I.G.³, Silveira V.⁴, Santa-Catarina C.⁵

¹UENF/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, nt.dutra@gmail.com

²UENF/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, lupisribeiro@hotmail.com

³UENF/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, inga@uenf.br

⁴UENF/Laboratório de Biotecnologia, vanildo@uenf.br

⁵UENF/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, claudetesc@gmail.com

Resumo - Poliaminas (PAs) são compostos policatiônicos envolvidos em vários processos de crescimento e desenvolvimento vegetal. Estudos recentes revelaram um requerimento das PAs na embriogênese zigótica e somática. O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito das PAs Putrescina (Put), Espermidina (Spd) e Espermina (Spm) e do inibidor da síntese de Spd e Spm, metilgloxal bis-guanilhidrazona (MGBG), na modulação da embriogênese somática de *A. angustifolia* avaliando o crescimento, morfologia, níveis endógenos de PAs e atividade das bombas de prótons, após 24 horas e 21 dias de incubação. Verificou-se respostas diferenciadas entre os tratamentos com PAs, as quais alteram a morfologia e crescimento das culturas, possivelmente pela modulação dos níveis endógenos de PAs e atividade das bombas de prótons. Os resultados sugerem que Put está relacionada com a proliferação celular, enquanto Spd e Spm com a evolução morfo genética das culturas, sendo o efeito observado com 24 horas de incubação e mantido ao longo do crescimento (21 dias). Sugere-se que as PAs atuam em aspectos bioquímicos relacionados com sinalização celular e modulam o desenvolvimento das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

Palavras-chave: evolução morfo genética, sinalização celular, bombas de prótons.

Área do Conhecimento: Botânica

Introdução

PAs são compostos policatiônicos ubíquos que estão envolvidos em processos de crescimento e desenvolvimento vegetal. Na última década estudos com mutantes revelaram um requerimento obrigatório das PAs na embriogênese zigótica e somática. Além disso, o uso de inibidores da síntese de PAs foi essencial para identificá-las como reguladores específicos de processos fisiológicos vegetais (BARON & STASOLLA, 2008).

Os sistemas de embriogênese somática, além de permitirem o estudo dos aspectos básicos da embriogênese, têm contribuído para a

propagação e conservação de várias espécies. Sistema de embriogênese somática tem sido desenvolvido para *A. angustifolia*, uma espécie de importância econômica em risco de extinção, entretanto a conversão de embriões somáticos em plantas completas ainda é um desafio.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito das PAs: Put, Spd e Spm e o inibidor MGBG no crescimento, morfologia, metabolismo endógeno de PAs e atividade das bombas de prótons – H⁺-ATPases tipo P e V e H⁺-PPase, visando identificar os fatores que influenciam o estabelecimento, a multiplicação e evolução de culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

Metodologia

Para realização dos experimentos, culturas embriogênicas de *A. angustifolia* mantidas em meio BM2 (GUPTA & PULLMAN, 1991) com 15 dias de crescimento foram incubadas isoladamente com as PAs: Put, Spd e Spm e o inibidor MGBG (1 mM) durante o período de 24 horas e 21 dias, e mantidas no escuro a 25°C sob agitação (100 rpm).

Após 21 dias de incubação o crescimento das culturas foi analisado pelo incremento do Peso Fresco (g). Para as análises morfológicas, as culturas foram tratadas com Azul de Evans 0,1% por 5 min, para marcar células do suspensor e em seguida com Carmim acético 2% por 30 segundos, para marcar células embriogênicas. As células foram observadas em microscopia de luz.

Para determinar o conteúdo endógeno de PAs livres, amostras (300mg cada) em triplicata, oriundas de cada tratamento foram maceradas com 1,4ml de ácido perclórico a 5% (v/v), e incubadas a 4°C por 20 min. Em seguida, foram centrifugadas a 20.000 x g por 20 min. As PAs livres extraídas foram dansiladas e identificadas utilizando-se cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com coluna C18 fase reversa, de acordo com a metodologia descrita por Silveira *et al.* (2004). As áreas e tempos de retenção de cada PA foram analisados por comparação com concentrações padrões conhecidas de Put, Spd, Spm e DAH (diaminoheptano) utilizado como padrão interno).

As frações microsossomais foram isoladas através de centrifugação diferencial, como descrito por GIANNINI & BRISKIN (1987), com algumas modificações. Primeiramente as células foram incubadas por 2h em meio BM2 com metade da concentração salina, acrescido de celulase 1% para facilitar o rompimento da parede celular. Posteriormente foram

centrifugadas a 3000 x g por 15 min. As células obtidas foram maceradas em tampão de extração composto de 250 mM de sacarose, 10% (v/v) de glicerol, 100 mM de tampão Tris pH 8,0, 5 mM de EDTA, 100 mM de KCl, 5mM de DTT, 1mM PMSF, 0,4% de PVPP (p/v), 0,3% de BSA (p/v) e 1 mM de Benzamidina. O material homogeneizado foi centrifugado a 150 x g por 15 min. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 min. Finalmente, o sobrenadante foi centrifugado a 51.000 rpm por 35 min, a 4°C, onde o precipitado foi resuspenso em solução tampão composta de 10% de glicerol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 5 mM de EDTA, 5 mM de DTT, 1 mM de Benzamidina e 1 mM de PMSF.

As dosagens das proteínas foram realizadas segundo o método descrito por Bradford (1976). As atividades ATPásica e PPásica foram determinadas colorimetricamente, consistindo na determinação do Pi liberado durante a hidrólise do ATP e do pirofosfato (PPi), respectivamente, segundo o método descrito por FISKE & SUBBAROW (1925). A hidrólise de ATP da H⁺-ATPase tipo P e V foram representadas como atividade sensível ao inibidor específico ortovanadato de sódio e bafilomicina, respectivamente.

Os experimentos foram realizados em triplicata, e representados usando média e desvio padrão.

Resultados

Culturas tratadas com Spm apresentaram uma redução acentuada no crescimento (50%) comparado ao controle, enquanto a Put (13%), Spd (20%) e MGBG (14%) apresentaram uma redução menor (Tabela 1).

Tratamentos	Peso Fresco (g)
Controle	0,509 ± 0,022
Put	0,439 ± 0,025
Spd	0,410 ± 0,025
Spm	0,260 ± 0,006
MGBG	0,436 ± 0,053

Tabela 1: Efeito da Put, Spd, Spm e MGBG no crescimento (g) das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* após 21 dias de incubação (média ± desvio padrão, n=3).

Na análise morfológica as culturas celulares foram classificadas em Massas Pró-Embriogênicas (PEM) nos estágios I, II e III, segundo a descrição de Filonova *et al.* (2000). No controle foram observados PEMs nos estágios I e II, contendo em média 10 células embriogênicas e 1 suspensor. O tratamento com Put apresentou na maioria PEMs no estágio II, contendo em média 21 células embriogênicas e 2 suspensores, enquanto Spd e Spm apresentaram, na maioria, PEMs no estágio III, contendo em média mais de 30 células embriogênicas e 7 suspensores. O MGBG resultou na formação de PEMs no estágio I, com média 12 células embriogênicas e 1 suspensor, entretanto com um padrão morfológico distinto comparado ao controle, com células menores e o suspensor corando em vermelho (Figura 1).

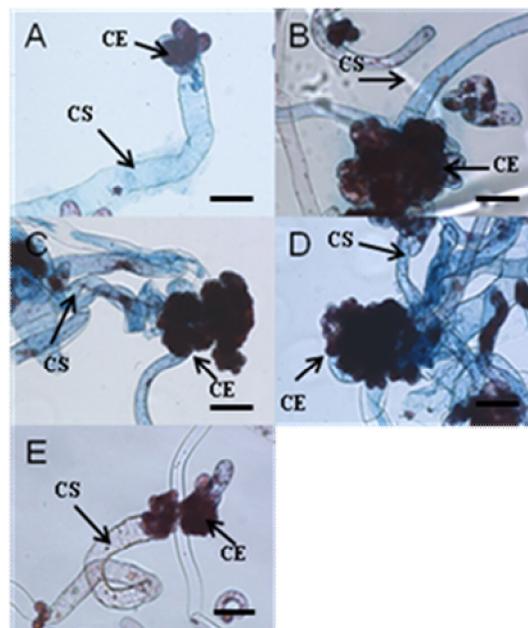


Figura 1: Aspectos morfológicos das culturas embriogênicas de *A. angustifolia* após 21 de incubação sem PAs (A) e com Put (B), Spd (C), Spm (D) e MGBG (E). CE= células embriogênicas; CS= células do suspensor. Barras=150μm.

Pela análise dos níveis endógenos de PAs observou-se que houve incorporação endógena das respectivas PAs quando adicionadas, observado já nas primeiras 24 horas, mantendo-se o mesmo perfil após 21 dias de incubação. A adição de MGBG reduziu os níveis de Spd e Spm e aumentou os níveis endógenos de Put somente após 21 dias, sugerindo que sua ação inibitória sobre a síntese de Spd e Spm pode ser observada após um período mais prolongado de incubação (Figura 2).

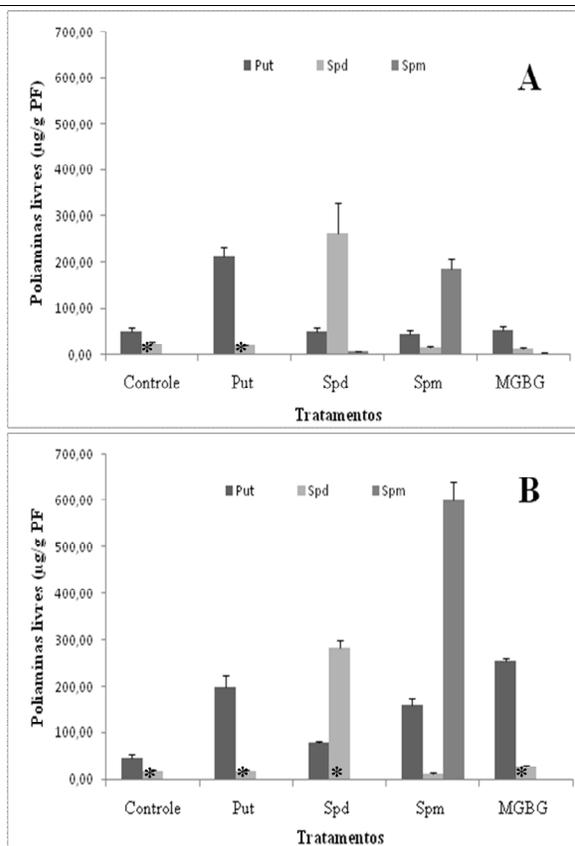


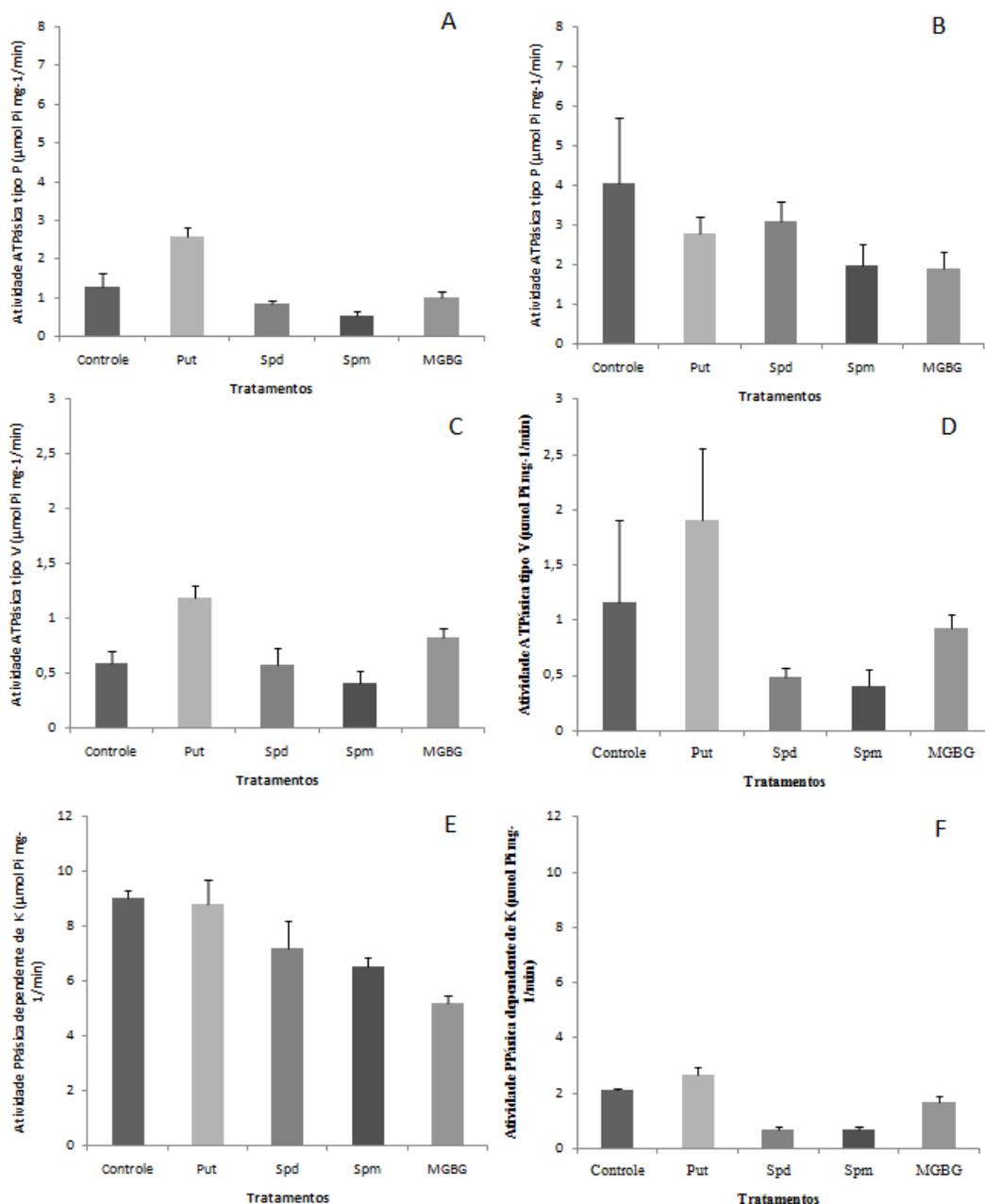
Figura 2: Níveis endógenos de PAs em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* após 24 horas (A) e 21 dias (B) de incubação com Put, Spm, Spd e o inibidor MGBG (média ± desvio padrão, n=3). *=não detectado

Para a H^+ -ATPase do tipo P, verificou-se após 24 horas que a Put estimulou, enquanto Spd e Spm inibiram a atividade em relação ao controle, e o MGBG não apresentou diferenças acentuadas. Porém, após 21 dias, todos os tratamentos apresentaram resultados similares. Nas atividades vacuolares, verificou-se que a Put e o MGBG ativaram a H^+ -ATPase do tipo V após 24 horas, enquanto a Spm inibiu. Após 21 dias, a adição de Put manteve a maior atividade, MGBG foi similar e Spd e Spm diminuíram em relação ao controle. Para a H^+ -ATPase observou-se após 24 horas, nos tratamentos controle e Put, as maiores atividades PPásicas. Porém, após 21 dias de

cultivo observou-se um padrão similar ao da H^+ -ATPase tipo V (Figura 3).

Discussão

Os resultados mostram que as PAs e o inibidor MGBG induziram respostas distintas nas culturas embriogênicas de *A. angustifolia* para o crescimento e morfologia, possivelmente, em decorrência da modulação no conteúdo endógeno de PAs e atividade de bombas de prótons. Culturas incubadas com Put apresentaram crescimento similar ao controle, com PEMs II para ambos os tratamentos. Por outro lado, a adição de Spm inibiu o crescimento das culturas apresentando em sua maioria PEMs no estágio III, similar a Spd, embora esta não tenha reduzido o crescimento. De acordo com FILONOVA *et al.* (2000) a presença de PEMs III são essenciais para a progressão da embriogênese somática, sugerindo que a Spd e Spm estão associadas a evolução morfo genética das culturas embriogênicas em *A. angustifolia*. Em relação ao conteúdo endógeno de PAs livres, verificou-se uma incorporação das diferentes PAs com 24 horas de incubação, mantendo o perfil até os 21 dias de crescimento, sugerindo que as PAs Spd e Spm estejam associadas à maturação das culturas, devido à evolução morfo genética observada. As PAs modularam também as atividades de bombas de prótons. Os resultados após 24 horas de incubação sugerem que a Put pode estar relacionada com a ativação para a divisão celular, uma vez que a adição desta PA resultou numa maior atividade ATPásica do tipo P e do tipo V. A acidificação do apoplasto resultante do transporte de prótons pela H^+ -ATPase de membrana plasmática, contribui para o afrouxamento da parede celular e alcalinização do citoplasma, sendo um dos fatores que pode estar associados com a ativação da divisão celular (Kutschera, 2001). A homogeneidade na resposta da atividade



ATPásica do tipo P entre os tratamentos após 21 dias, sugere que esta bomba apresente pouca participação no metabolismo energético das culturas embriogênicas na transição da fase exponencial para a estacionária de crescimento, neste período. Por outro lado, nas bombas vacuolares verificou-se diferenças acentuadas entre os tratamentos após 21 dias de incubação, com Spd e Spm apresentando uma redução na atividade. Esta resposta pode estar relacionada à redução do crescimento das culturas e ao estímulo à diferenciação das culturas embriogênicas. Estes resultados corroboram com os observados por Santa-Catarina *et al* (2007), os quais sugerem que a Put é uma PA relacionada com o crescimento celular, enquanto a Spd e Spm direcionam a morfogênese. Desta forma, sugerimos que Put está associada à proliferação celular, enquanto Spd e Spm a evolução morfogenética em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*.

O MGBG, ao inibir a síntese de Spd e Spm, aumentou os níveis endógenos de Put. Entretanto, os resultados observados foram diferentes daqueles com a adição de Put. Este inibidor está associado também com a via de síntese de etileno, que pode ter resultado num aumento deste composto pela não utilização dos grupos aminopropil na rota de síntese de PAs. Maiores estudos devem ser feitos para melhor compreensão dessa via regulatória.

Conclusão

Sugere-se que as PAs atuam na sinalização celular em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, ao verificar que estas alteram o crescimento e a morfologia, possivelmente, pela modulação dos níveis endógenos de PAs e atividade de bombas de prótons. Estudos futuros devem ser realizados com inibidores da rota de biossíntese de PAs tanto para obtenção de análises profundas em relação a ação das PAs nos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, quanto para estudos

básicos de sinalização celular e integração de rotas bioquímicas.

Esse trabalho possibilitou respostas sobre diferentes funções da PAs no processo de embriogênese somática de *A. angustifolia*, permitindo o conhecimento importante para direcionamento de futuras pesquisas.

Referências

- BARON K. & STASOLLA C. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant** 44: 384-395, 2008.
- BRADFORD M.M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254, 1976.
- FISKE C.F. & SUBBAROW Y.. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.** 66: 375, 1925.
- FILONOVA L.H.; BOZHKOVA P.V. & VON ARNOLD S.. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **J. Exp. Bot.** 249-264, 2000.
- GIANNINI J.L. & BRISKIN D.P.. Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) Storage tissue. **Plant Physiol.** 84: 613-618, 1987.
- GUPTA P.K. & PULMAN G.S.. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. **US patent.** 5: 036-007, 1991.
- KUTSCHERA U.. Stem elongation and cell wall proteins in flowering plants. **Plant Biol.** 3: 466-480, 2001.
- SANTA-CATARINA C.; SILVEIRA V.; SCHERER G.F.E. & FLOH E.I.S Polyamine and nitric oxide levels correlate with morphogenetic evolution in somatic

embryogenesis of *Ocotea catharinensis* **Plant**

Cell. Tiss. Org. Cult. 90: 93-101, 2007.

SILVEIRA V.; FLOH E.I.S.; HANDRO W. & GUERRA M.P.. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell. Tiss. Org. Cult.** 69: 233-249, 2004.