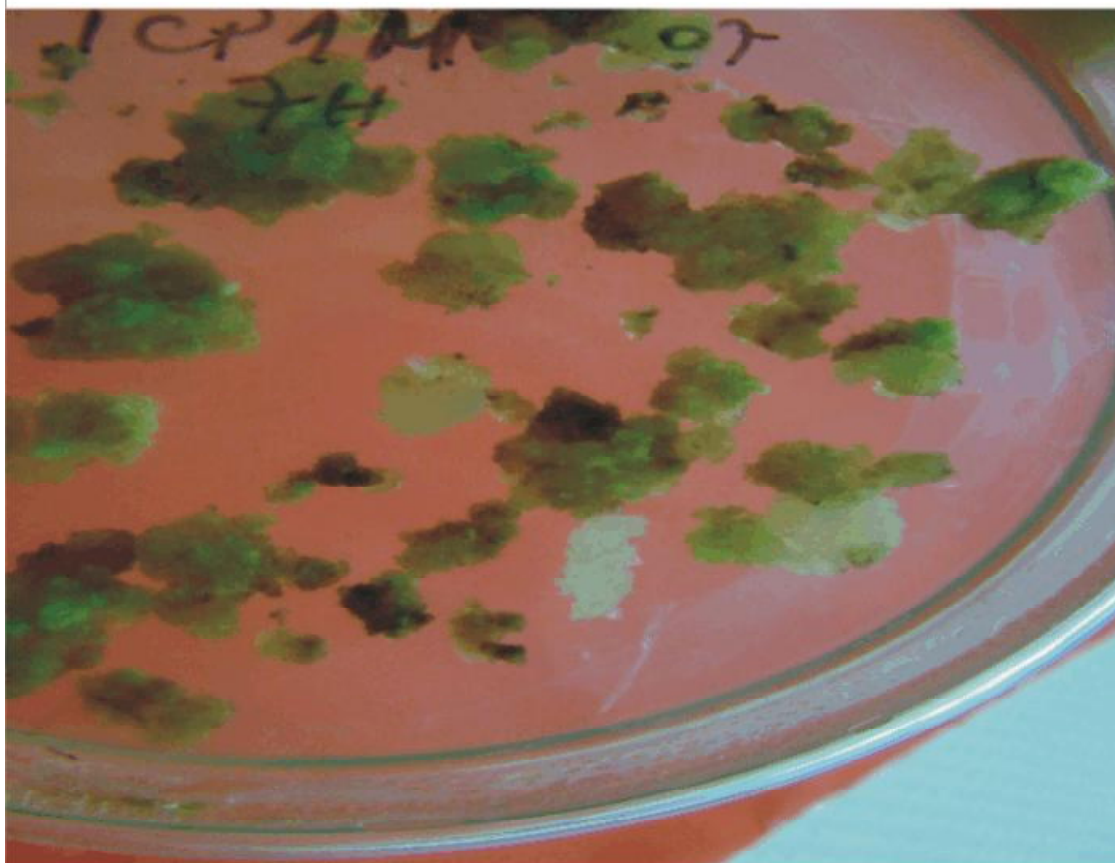


Documentos

ISSN 0103 - 0205
Outubro 2009

223

Mecanismos Antioxidativos Associados à Embriogênese Somática



Embrapa

ISSN 0103-0205

Outubro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 223

Mecanismos Antioxidativos
Associados à Embriogênese
Somática

*Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Marina Medeiros de Araújo Silva
Terezinha Rangel Camara*

Centro Nacional de Pesquisa de Algodão
Campina Grande, PB
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário
CEP 58428-095
Caixa Postal 174
Fone: (83) 3182 4300
Fax: (83) 3182 4367
Home page: <http://www.cnpa.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Carlos Alberto Domingues da Silva*

Secretário-Executivo: *Renato Wagner da Costa Rocha*

Membros: *Fábio Aquino de Albuquerque, Giovani Greigh de Brito, João Luis da Silva Filho, Máira Milani, Maria da Conceição Santana Carvalho, Nair Helena Castro Arriel, Valdinei Sofiatti, Wirtton Macêdo Coutinho.*

Supervisão editorial: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Revisão de texto: Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Normalização bibliográfica: Valter Freire de Castro

Tratamento de ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Edição eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôres de Moura

1ª edição

1ª impressão (2009): 500

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Algodão

Carvalho, Julita Maria Frota Chagas.

Mecanismos Antioxidativos Associados à Embriogênese Somática/por Julita Maria Frota Chagas Carvalho, Marina Medeiros de Araújo Silva e Terezinha Rangel Camara. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009.

25p. (Embrapa Algodão. Documentos, 223)

1. Embriogênese. 2. Propagação - *In vitro*. 3. Estresse oxidativo. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Silva, M.M. de A. III. Camara, T.R. IV. Título. V. Série.

CDD: 634.8

© Embrapa 2009

Autores

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Engenheira agrônoma, Ph.D. em Microbiologia,
pesquisadora da Embrapa Algodão, Campina Grande,
PB, julita@cnpa.embrapa.br

Marina Medeiros de Araújo Silva
Bióloga, Mestranda em Melhoramento Genético de
Plantas - UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos, Recife, PE.
marinamedeirosas@yahoo.com.br

Terezinha Rangel Camara
Engenheira Agrônoma, D.Sc., Professora do Departamen-
to de Química - UFRPE, Rua Dom Manoel de
Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE.
tkrcamara@pq.cnpq.br

Apresentação

A embriogênese somática tem sido uma técnica alternativa com potencial de aplicação na propagação clonal de plantas e na regeneração de células transformadas geneticamente, além de auxiliar nos estudos básicos e análise dos eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem durante o processo embriogênico. Embora visíveis, os avanços da biotecnologia e dos estudos relacionados à Embriogênese Somática (ES), a compreensão dos estímulos e condições ideais à indução, no que se refere ao conhecimento sobre os mecanismos deste processo ainda são limitados. Estudos adicionais para a determinação dos processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos durante o desenvolvimento embrionário se fazem necessários.

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Mecanismos Antioxidativos Associados à Embriogênese Somática.....	9
Introdução.....	9
Morfogênese <i>in vitro</i>	10
Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS).	11
Algumas enzimas envolvidas na detoxificação de ROS....	13
Atividade do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e enzimas antioxidativas durante a embriogênese somática.....	14
Considerações finais.....	19
Referências.....	21

Mecanismos Antioxidativos Associados à Embriogênese Somática

Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Marina Medeiros de Araújo Silva

Terezinha Rangel Camara

Introdução

A embriogênese somática (ES) é um caso particular de morfogênese, onde há formação de estruturas semelhantes aos embriões zigóticos, a partir de células somáticas; destaca-se entre os vários sistemas de cultivo *in vitro* por oferecer a oportunidade de propagação clonal de plantas férteis e geneticamente "sólidas" e de regeneração de plantas geneticamente modificadas. Esta técnica constitui também uma ferramenta bastante útil para estudos básicos de processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos dos sistemas vegetais. As fases iniciais dessa via morfogênica são caracterizadas pela indução de muitos genes relacionados ao estresse, o que leva à hipótese de que a ES é uma resposta extrema ao estresse de células de plantas cultivadas *in vitro*. Alguns autores têm correlacionado o aumento da atividade de enzimas antioxidativas com a resposta embriogênica dos tecidos somáticos, sugerindo que o aumento da atividade dessas enzimas estaria relacionado ao estresse oxidativo e que esse estresse contribuiria para acelerar o processo de ES, entretanto, são necessários estudos adicionais para a determinação dos padrões bioquímicos durante o desenvolvimento embrionário, fornecendo assim subsídios para a otimização dos sistemas de propagação *in vitro* baseados nesta técnica.

Morfogênese *in vitro*

O estudo da morfogênese vegetal tem como objetivo fundamental identificar os processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos que conduzem a aparição de novas estruturas organizadas no corpo da planta.

O processo morfogenético é resultado da divisão e diferenciação celular organizada que dependem, basicamente, da atividade e expressão de determinados genes. A diferenciação celular reflete, em última análise, o efeito de, pelos menos, três grupos de fatores. O primeiro é o fator genético, que incorpora o estoque de potencialidades que podem ser expressas durante o desenvolvimento; o segundo fator está representado pelas características originadas durante a ontogênese e, por último, existem as características cuja expressão depende apenas do ambiente (KERBAUY, 1999). O desenvolvimento organizado depende de certos sinais específicos e de uma conseqüente mudança no metabolismo, além da capacidade de recepção dos sinais pelas células.

A ES é um caso particular de morfogênese, onde há formação de estruturas semelhantes aos embriões zigóticos, a partir de células somáticas (HANDRO; FLOH, 1990). Embriões somáticos podem se diferenciar diretamente do explante, sem ocorrência de uma fase de calo ou indiretamente após a fase de formação de calo (ARNOLD et al., 2002).

A ES destaca-se entre os vários sistemas de cultivo *in vitro* por oferecer a oportunidade de propagação clonal de plantas férteis e geneticamente "sólidas", e de regeneração de plantas geneticamente modificadas (GAJ, 2004). Esta técnica constitui também uma ferramenta bastante útil para alcançar diversos objetivos, desde estudos básicos de processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, até o desenvolvimento de tecnologias com alto grau de aplicação prática (JIMÉNEZ, 2001).

O processo de aquisição da competência embriogênica por células somáticas envolve uma necessária reprogramação nos padrões de expressão gênica assim como mudanças na morfologia, fisiologia e metabolismo (NAMASIVAYAM, 2007).

Diversos fatores do cultivo *in vitro* interferem na indução deste processo. De fato, a ES também tem sido estimulada por fatores reconhecidos como agentes estressantes, sejam de natureza mecânica (ferimentos, cortes), física (frio, luz) ou química (altas concentrações de sacarose, manitol, polietileno glicol, cádmio, ferro, cloreto de sódio, etc).

Embora o mecanismo molecular estimulatório não esteja elucidado, todos os fatores de estresse supracitados induzem uma reação comum nas células somáticas que se manifesta por meio da desdiferenciação e rediferenciação em embriões somáticos (GAJ, 2004). Uma das hipóteses sobre o mecanismo envolvido na indução da ES pelo estresse destaca a importância da interação entre auxinas e a sinalização do estresse, que resulta na aquisição da competência embriogênica da célula somática por meio da reprogramação celular manifestada em diferentes níveis (FEHÉR et al., 2003).

Muitos estudos tem se preocupado apenas com a morfogênese do processo embriogênico, entretanto, para contribuir com o entendimento eficiente, são necessários estudos que busquem informações reunindo dados fisiológicos, bioquímicos e moleculares sobre a ES (THORPE; STASOLLA, 2001).

Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS)

Uma das mais importantes funções das células das plantas é sua habilidade em responder às flutuações ambientais. Entender as conexões entre as respostas iniciais das plantas aos variados tipos de estresses que conferem a ela sucesso no ajuste às condições de crescimento alteradas é uma das grandes metas da biologia de plantas (GRENE, 2002).

Processos metabólicos tais como a respiração e a fotossíntese, naturalmente produzem como sub-produtos diferentes espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS) nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Figura 1). Moléculas de ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e radicais hidroxila (HO^{\bullet}) são capazes de reagir com as demais classes de biomoléculas, como proteínas, fosfolípidos e

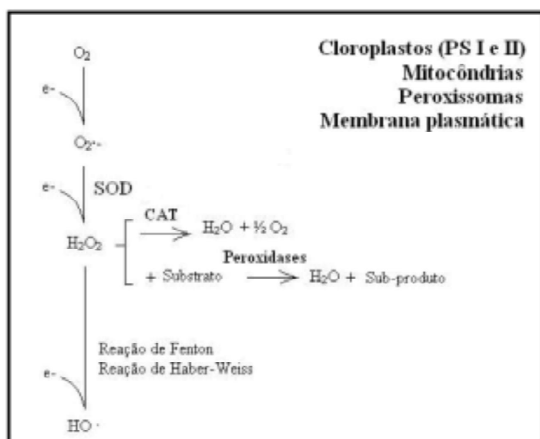


Fig. 1. Principais espécies de oxigênio reativo (ROS), locais de produção e respectivos produtos finais após a sua neutralização em células vegetais.

Adaptado de MØLLER et al., (2007) e APEL e HIRT, (2004).

DNA, afetando a integridade e função das células. No entanto, em baixas concentrações elas atuam como moléculas sinalizadoras nos processos de crescimento e desenvolvimento celular (DEL RÍO et al., 2006). ROS também podem ser geradas por processos metabólicos como autooxidação de pequenas moléculas (hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, ferredoxinas reduzidas) produzindo $O_2^{\bullet -}$. Além disso, fatores ambientais, como irradiação, poluição ambiental e produtos tóxicos são potenciais geradores de ROS (HENRIQUES et al., 2001).

Essas propriedades citotóxicas, levaram ao desenvolvimento de complexos mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos de neutralização de ROS (APEL; HIRT, 2004; MØLLER et al., 2007). No entanto, este equilíbrio entre a produção e a neutralização pode ser alterado, aumentando significativamente os níveis intracelulares dessas moléculas quimicamente ativas, ocasionando o chamado "estresse oxidativo" (APEL; HIRT, 2004).

O papel das ROS durante o crescimento e morfogênese vem sendo investigado, sugerindo que estas moléculas não são apenas simples sinalizadoras do estresse, mas apresentam também fundamental importância na sinalização do crescimento e desenvolvimento das plantas (OBERT et al., 2005). Essas espécies reativas induzem mudanças no padrão de expressão gênica, metabolismo celular e totipotência, importantes para a competência embriogênica em células somáticas, portanto, acredita-se que um certo

nível de estresse oxidativo é requerido para promover a formação de células embriogênicas e desencadear uma rota morfogênica específica (BLAZQUEZ et al., 2009).

Algumas enzimas envolvidas na detoxificação de ROS

Incluída na resposta ao estresse oxidativo celular está a regulação da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, as quais amenizam os danos causados pelas ROS (CYRNE et al., 2003). Estas enzimas são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico, servindo como sinalizadores do estresse. Destacam-se entre elas: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), as peroxidases (POD) e as polifenoloxidasas (PPO).

A superóxido dismutase é a primeira enzima que age no sistema antioxidante celular, catalisando a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxidos (Figura 2.A) (OLMOS et al., 2003). Por ser uma metaloenzima, apresenta isoformas que variam conforme o metal utilizado pela enzima. Assim, tem-se a Mn-SOD, Fe-SOD e Cu/Zn-SOD, localizadas em diferentes compartimentos celulares.

A catalase tem função de quebrar o peróxido de hidrogênio, resultando em água e oxigênio estável (Figura 2.B). É a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 que não consome equivalentes redutores da célula e que possui mecanismo muito eficiente para a remoção do peróxido de hidrogênio formado sob condições de estresse (MALLICK; MOHN, 2000).

As peroxidases convertem o H_2O_2 em água (Figura 2.C), além de estarem envolvidas em ligações de polissacarídeos e lignificação da parede celular e na diminuição do processo peroxidativo dos lipídios de membrana (LIBIK et al., 2005; PASTERNAK et al., 2002).

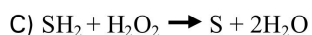
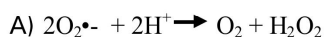


Fig. 2.A) Reação geral da superóxido dismutase (SOD); 2.B) Reação geral da catalase (CAT); 2.C) Reação geral da peroxidase (POD).

As polifenoloxidasas catalisam a hidroxilação e a degradação oxidativa de compostos fenólicos (CAMPOS et al., 2004), os quais, além do papel estrutural na parede celular, exercem uma função protetora contra a ação das ROS (ALI et al., 2006). A oxidação fenólica é uma resposta característica a ferimentos no tecido vegetal (BORÉM; VIEIRA, 2005) e muito comum no cultivo in vitro. O teor de fenóis e a medida da atividade das enzimas responsáveis pela oxidação fenólica podem contribuir como indicadores de estresse.

Atividade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e enzimas antioxidativas durante a embriogênese somática

A morfogênese vegetal é consequência dos processos de divisão e diferenciação celular organizada. Tais processos dependem de certos sinais que desencadeiam processos específicos de síntese, e como consequência, alterações bioquímicas e metabólicas diversas.

A ES constitui um exemplo da expressão da totipotencialidade, postulada por Haberlandt em 1902, em que as células vegetais possuem a capacidade de regenerar indivíduos completos a partir de uma única célula. Sua utilização como técnica para propagação clonal tem sido tema de diferentes estudos, entretanto, a embriogênese também constitui um modelo bastante interessante para estudos básicos de fisiologia, biologia celular, bioquímica, genética da diferenciação e morfogênese em vegetais. Estudos dessa natureza têm sido realizados em especial com abordagens morfológicas e cito-histológicas (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004 citado por FLOH et al., 2008). Neste aspecto, deve-se destacar que as limitações impostas pela falta de estudos básicos sobre a ontogênese dos embriões zigóticos e embriogênese somática, nos seus aspectos fisiológicos e bioquímicos complementados com a caracterização molecular, torna frequentemente, os protocolos de cultivo in vitro bastante empíricos e pouco eficientes.

Como outros processos do desenvolvimento vegetal, a ES compreende diversas fases fisiológicas com diferentes requerimentos (KEVERS et al., 2002). As fases iniciais dessa via morfogênica são caracterizadas pela

indução de muitos genes relacionados ao estresse, o que leva à hipótese de que a ES é uma resposta extrema ao estresse de células de plantas cultivadas *in vitro* (PASTERNAK et al., 2002). De fato, a competência embriogênica de células somáticas pode ser estimulada por vários fatores reconhecidos como agentes estressantes, tais como: alta pressão osmótica (AKULA et al., 2000; CHOI et al., 1998; IKEDA-IWAI et al., 2003), metais pesados ou variações no pH do meio (PASTERNAK et al., 2002), deficiência nutricional e/ou hídrica (LEE et al., 2001; KUMRIA et al., 2003), entre outros.

De uma maneira geral, os agentes indutores de estresse podem provocar uma reação em células somáticas que se manifesta pela desdiferenciação e rediferenciação em embriões somáticos. Sob condições extremas, as células têm que mudar sua rota: ou elas morrem (apoptose), ou se diferenciam e dividem (FEHÉR et al., 2003). Essa plasticidade ocorre tanto em células meristemáticas como em células diferenciadas, as quais retêm a habilidade de expressar genes ou podem readquirir este potencial pela desdiferenciação e, então, manter-se potencialmente competentes (JOYCE et al., 2003). O fracasso em compensar um estresse severo pode resultar em variação somaclonal ou mutação (CASSELLS et al., 1999; CASSELLS; CURY, 2001), perda total da totipotência organogênica, desenvolvimento de uma progressão neoplásica (GASPAR et al., 1998) e morte da planta ou da célula (BRAY et al., 2000).

As células vegetais possuem sistemas bem desenvolvidos para regular o nível de ROS, e as concentrações dessas moléculas quimicamente ativas podem sofrer alteração, entre outros motivos, pela ação de várias enzimas antioxidantes, que são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse (MITTLER, 2002).

Mais recentemente, alguns experimentos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer o papel do estresse oxidativo na morfogênese vegetal. O estudo das respostas antioxidantes durante os eventos morfogênicos da ES tem sido feito principalmente com amostras de calos nos estágios críticos desse processo (indução e desenvolvimento de ES e conversão) e nos próprios embriões somáticos.

Alguns autores correlacionam o aumento da atividade de enzimas antioxidativas com a resposta embriogênica dos tecidos somáticos, sugerindo que o aumento da atividade dessas enzimas estaria relacionado ao estresse oxidativo e que esse estresse contribuiria para acelerar o processo de ES (CUI et al., 1999; GANESAN; JAYABALAN, 2004; KONIECZNY et al., 2008; LIBIK et al., 2005). Dentre a maquinaria antioxidativa, destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD). O produto da atividade da SOD é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é tóxico em níveis elevados e precisa ser reduzido à H_2O em reações subseqüentes. Nas plantas, os níveis intracelulares de H_2O_2 são regulados, principalmente, pela CAT e POD. Assim, estas enzimas podem ser consideradas como possíveis "marcadores da morfogênese" (KAWANO, 2003 citado por KONIECZNY, 2008).

Libik et al. (2005) relatam a determinação da atividade da superóxido dismutase e catalase através da eletroforese em calos embriogênicos e embriões somáticos de *Mesembryanthemum crystallinum*. Ganesan e Jayabalan (2004) detectaram um aumento na atividade da superóxido dismutase e peroxidase nos calos de *Gossypium hirsutum* L., os quais produziram maior quantidade de embriões somáticos.

Cui et al. (1999) mostraram a mudança na atividade das enzimas antioxidantes e o efeito do H_2O_2 exógeno na frequência da ES em *Lycium barbarum* L. Seus resultados apontaram que a atividade da superóxido dismutase aumentou gradualmente nos primeiros dias de cultivo, diminuindo com as divisões adicionais e o desenvolvimento de embriões multicelulares; enquanto que a atividade da peroxidase e catalase foi alta em calos e decaiu rapidamente nos primeiros dias da diferenciação, sugerindo que um aumento intracelular de H_2O_2 foi determinante na formação de células embriogênicas. A ES em *Lycium barbarum* L. também foi estimulada pela adição de até 200mM de H_2O_2 ao meio de diferenciação, enquanto que a concentração de 300mM foi inibitória por promover o aumento dos níveis endógenos a patamares tóxicos. Os autores sugerem que o H_2O_2 endógeno atua como um mensageiro celular capaz de induzir a expressão de genes e a síntese protéica, promovendo a ES. O H_2O_2 age numa rota dupla nas

plantas: em baixas concentrações, atua como um mensageiro molecular envolvido na sinalização adaptativa, disparando a tolerância a vários estresses abióticos e, em altas concentrações, promove a morte celular programada (DAT, et al., 2000; KARPINSKI, et al., 1999). O H_2O_2 é um possível intermediário entre o estresse oxidativo e a regeneração de plantas na cultura de tecidos.

Resultado semelhante foi proposto por Konieczny et al. (2008), também avaliando a atividade antioxidante e o nível de H_2O_2 durante a ES direta de *Helianthus annuus* L. A atividade da superóxido dismutase foi obtida por análise eletroforética, mostrando a presença das isoformas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD. A atividade da peroxidase e catalase e conteúdo de H_2O_2 foi semelhante ao relatado por Cui et al. (1999) e por Gupta e Datta (2004) com cultura de *Gladiolus hybridus*, onde a produção de embriões somáticos foi precedida por declínio na atividade da catalase e da peroxidase, com um aumento no conteúdo endógeno de H_2O_2 . A essência da diferenciação e desenvolvimento de células é a expressão diferencial de genes, portanto, o metabolismo de ROS representa um papel decisivo na diferenciação e desenvolvimento celular. Assim, podemos supor que o H_2O_2 produzido devido ao desbalanço oxidativo, deve promover a expressão de alguns genes responsáveis pela indução dos processos morfogênicos.

No estudo dos componentes do sistema enzimático antioxidante durante a ES em *Crocus sativus* L., foi detectado um aumento significativo da SOD durante a formação de calos embriogênicos, seguido por progressivo decréscimo durante os estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos. Também foram detectadas as isoformas Mn-SOD e Cu/Zn-SOD, com predominância desta última, a qual apresenta aumento drástico quando células vegetais se encontram sob estresse. Quanto a CAT, verificou-se uma maior atividade durante o desenvolvimento dos embriões em comparação aos estágios anteriores (BLAZQUEZ et al., 2009).

Outros tipos de estresses já foram relatados como indutores de ES em diversas espécies de plantas. Este fato indica que o tratamento estressante induz uma reação comum, onde haveria a indução da expressão de fatores que controlam o início da ES (IKEDA-IWAI et al., 2003).

Ikeda-Iwai et al. (2003) obtiveram embriões somático de *Arabidopsis thaliana* a partir de um tratamento de estresse osmótico, que consistia de 6 a 9h de cultura em meio com 0,7M de manitol em explantes de meristema apical. A indução de ES também já foi obtida a partir de estresse com macrossais em *Panax ginseng* (CHOI et al., 1998).

Kouakou et al. (2007) estudando a formação de compostos fenólicos em duas cultivares (embriogênica e não-embriogênica) de *Gossypium hirsutum* L., verificou que a quantidade destes compostos diferiu significativamente para a cultivar. Na embriogênica, a quantidade de fenóis foi aumentando durante os subcultivos, enquanto na cultivar não-embriogênica, houve um decréscimo no conteúdo dos mesmos; implicando dizer que a ES é influenciada pela produção de compostos fenólicos e que estes podem servir como marcadores desta via morfogênica em *Gossypium hirsutum* L. Embora a produção de compostos fenólicos dependa de múltiplos fatores, como o tipo e genótipo da cultura, sua síntese durante a cultivo de suspensões celulares parece promover a indução de estruturas embriogênicas. No metabolismo, assim como o conteúdo de fenóis, os padrões de isoenzimas são distintos em células embriogênicas e não-embriogênicas, implicando num papel fundamental para o estado de oxidação na diferenciação do tecido (THOMPSON; THORPE, 1991).

A relação entre diferentes condições de estresse e a ES ainda não está bem entendida, no entanto, as informações apresentadas sugerem uma forte conexão entre estes fatores, sendo a ES uma rota seguida em resposta ao estresse (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). Lichtenthaler (1998) propôs que a resposta fisiológica a condições de estresse é dependente de dois fatores, o estágio fisiológico das células e o nível (tempo e intensidade) da condição de estresse. Quando o nível de estresse excede a tolerância celular, leva à morte das células, mas se o nível é "baixo", as células podem induzir mecanismos de adaptação.

Segundo Ikeda-Iwai et al. (2003), diferentes tipos de estresse podem induzir um mesmo fenômeno, como por exemplo, a ES. Provavelmente, cada tipo de estresse induz a expressão de um fator que controla o início do processo embriogênico, através de uma reação comum.

Dentre os principais limitantes na maturação e conversão dos embriões está o restrito conhecimento das mudanças bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento e maturação do embrião zigótico. Assim, a determinação dos padrões bioquímicos durante o desenvolvimento embrionário pode fornecer subsídios para a otimização dos sistemas de propagação *in vitro* baseados na ES (PULLMAN et al., 2003).

Desse modo, é requerido um detalhado conhecimento dos fatores que afetam a diferenciação, a qual pode ser afetada por manipulações do ambiente de cultura e pelo estado do explante, não sendo um fenômeno simples. O sucesso da regeneração de plantas na cultura de tecidos requer o entendimento de como essas manipulações afetam fisiologicamente e bioquimicamente o estado do explante em cada estágio de seu desenvolvimento.

Considerações finais

Embora tenham ocorrido avanços notáveis na elucidação dos mecanismos associados à modulação de sistemas embriogenéticos, pouco se sabe sobre os marcadores associados aos pontos críticos deste processo.

A identificação das enzimas antioxidantes, bem como a atividade de cada uma delas, é um recurso importante para o entendimento da regulação do processo de ES em plantas. Ressalta-se que estes possíveis marcadores bioquímicos, podem representar uma importante estratégia para a otimização e controle dos processos morfogenéticos *in vitro*, podendo representar um papel crucial para estudos básicos em biologia celular, bioquímica e fisiologia vegetal utilizando sistemas de cultura de tecidos de plantas. Esta estratégia pode ser importante para a viabilização da cultura de tecidos na propagação de genótipos superiores e conservação de germoplasma, assim como sua utilização como ferramenta complementar em programas de melhoramento genético que utilizam técnicas biotecnológicas, como a transformação, para aumentar o ganho genético.

Referências

- AKULA, A.; BECKER, D.; BATESON, M. High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plan recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. *Plant Cell Report*, v. 19, p. 1140-1145, 2000.
- ALI, M. B.; SINGH, N.; SHOHAEL, A. M.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Phenolic metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science*, v. 171, p. 147-154, 2006.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARNOLD, S. V.; SABALA, I.; BOZHKOVA, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture*, v. 69, p. 233-249, 2002.
- BLAZQUEZ, S.; OLMOS, E.; HERNÁNDEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ, J.A.; PIQUERAS, A. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 97, p. 49-57, 2009.
- BORÉM, A.; VIEIRA, M. L. C. Glossário de biotecnologia. Viçosa: UFV, 2005. p. 126.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 2000. p. 1189-1197.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P. da; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CASSELLS, A. C.; CURY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 64, p. 145-157, 2001.

CASSELLS, A. C.; JOYCE, S. M.; CURY, R. F.; MCCARTHY, T. F. Detection of economically important variability in micropropagation. In: ALTMAN, A.; IZHAR, S.; ZIV, M. *Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999.

CHOI, Y. E.; YANG, D. C.; CHOI, K.T. Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 52, p. 177-181, 1998.

CUI, K.; XING, G.; LIU, X.; XING, G.; WANG, Y. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant science*, v. 146, p. 9-16, 1999.

CYRNE, L.; MARTINS, L.; FERNANDES, L.; MARINHO, H. S. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 34, p. 385-393, 2003.

DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVA, E., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D.; BREUSEGEM, F.V. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 57, p. 770-795, 2000.

DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *Plant Physiology*, v. 141, p. 330-335, 2006.

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

FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C.; VANILDO, S. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese *in vitro*. Disponível em: < <http://www.biota.org.br/publi/banco/index?show+129212167> > Acesso em: 01 nov. 2008.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, v. 43, p. 27-47, 2004.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrocyte) for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). *Plant Cell Rep*, v. 23, p. 181-187, 2004.

GASPAR, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; LE DILLY, F. Atypical metabolism and biochemical cycles imposing the cancerous state on plant cells. *Plant Growth Regulation*, v. 24, p. 135-144, 1998.

GREENE, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. In: SOMERVILLE, C. R.; MEYEROWITZ, E. M. *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2002.

GRUPTA, S. D.; DATTA, S. Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidant on plant regeneration. *Biol Plant*, v. 47, p. 179-183, 2004.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*, Brasília: Embrapa - SPI/ Embrapa - CNPH, 1990. p. 203-211.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKELI, E. P.;

- GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. e PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 2001. p.651-666.
- IKEDA-IWAI, M.; UMEHARA, M.; SATOH, S.; KAMADA, H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. The plant journal, v. 34, p. 107-114, 2003.
- JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Brazilian Journal of Plant Physiology, v. 13, n. 2, p.196-223, 2001.
- JOYCE S. M., CASSELLS A. C., JAIN S.M. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 74, p. 103-121, 2003.
- KARPINSKI, S., REYNOLDS, H., KARPINSKA, B., WINGSLE, G., CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. Science, v. 284, p. 654-657, 1999.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, 1999. v. 2, p. 519-531.
- KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J. The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 70, p. 181-188, 2002.
- KOUAKOU, T. H.; WAFFO-TÉGUO, P.; KOUADIO, Y. J.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DECENDIT, A.; MÉRILLON, J.M. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 90, p. 25-29, 2007.
- KONIECZNY, R.; LIBIK, M.; TULEJA, M.; NIEWIADOMSKA, M. Oxidative events during *in vitro* regeneration of sunflower. Acta physiol plant, v. 30, p. 71-79, 2008.

KUMRIA, R.; SUNNCHAN, V. G.; DAS, D. K.; GUPTA, S. K.; REDDY, V. S.; BHATNAGAR, R. K.; LEELAVATHI, S. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. *Plant Cell Report*, v. 21, p. 635-639, 2003.

LEE, E. K.; CHO, D. Y.; SOH, W. Y. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell Report*, v. 20, p. 408-415, 2001.

LIBIK, M.; KONIECZNY, R.; PATER, B.; SLESIAK, I.; MISZALSKI, Z. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. *Plant cell rep.*, v. 23, p. 834-841, 2005.

LICHTENTHALER, H. K. The stress concept in plants: an introduction. *New York Academy of Sciences*, v. 851, p. 187-198, 1998.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response to alga cells. *Journal of Plant Physiology*, v. 157, p. 183-193, 2000.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Science*, n. 7, p. 405-410, 2002.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 58, p. 459-481, 2007.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture*, v. 90, p. 1-8, 2007.

OBERT, B.; BENSON, E. E.; MILLAM, S.; PRET'OVÁ, A.; BREMNER, D. H. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax in vitro cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. *Journal of Plant Physiology*, v. 162, p. 537-547, 2005.

OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J. R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. Early steps in oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of Experimental Botany*, v. 54, p. 291-301, 2003.

PASTERNAK, T. P.; AYAYDIN, E. P. F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; ONCKELEN, H. A. V.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, v. 129, p. 1807-1819, 2002.

PULLMAN, G. S.; JOHNSON, S.; PETER, G.; CAIRNEY, J.; XU, N. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Report*, v. 21, p. 747-758, 2003.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 86, p. 285-301, 2006.

THOMPSON, M. R.; THORPE, T. A. Biochemical perspectives in tissue culture for crop improvement. In: KHANNA, K. R. *Biochemical aspects of crop improvement*. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 327-358.

THORPE, T. A.; STASOLLA, C. Somatic embryogenesis. In: BHOJWANI, S. S.; SOH, W. Y. *Current trends in the embryology of angiosperms*. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. p. 279-336.

Embrapa

Algodão

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



CGPE 8333