

THAIS RIBEIRO SEMPREBOM

**GLUTAMINA E METABOLISMO ANTIOXIDANTE  
DURANTE A ORGANOGÊNESE ADVENTÍCIA EM  
FOLHAS DE *Ananas comosus***

São Paulo

2008

THAIS RIBEIRO SEMPREBOM

**GLUTAMINA E METABOLISMO ANTIOXIDANTE  
DURANTE A ORGANOGÊNESE ADVENTÍCIA EM  
FOLHAS DE *Ananas comosus***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica, Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Dra. Helenice Mercier

São Paulo

2008

Semprebom, Thais Ribeiro  
Glutamina e metabolismo antioxidante durante a  
organogênese adventícia em folhas de *Ananas  
comosus*  
Total de 76 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Botânica.

1. Bromeliaceae 2. Organogênese 3.  
Glutamina 4. Metabolismo antioxidante  
I. Universidade de São Paulo. Instituto de  
Biotecnologia. Departamento de Botânica.

Apoio de fomento: Fundação de Amparo a  
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr.(a).  
Orientador(a)

*Pelo amor sem limites; pela compreensão infinita; pela paciência e apoio imensuráveis; por acreditarem... dedico este trabalho aos meus pais Severino e Benedita e ao meu irmão, Vinícius.*

## AGRADECIMENTOS

*Meus sinceros agradecimentos...*

À Profa. Dra. Helenice Mercier, pela valiosa orientação, pelos ensinamentos compartilhados, paciência, incentivo, dedicação e amizade desde o primeiro momento.

Ao Dr. Geert Potters, da Universidade da Antuérpia, pelos ensinamentos teóricos e práticos sobre o estresse oxidativo, pela paciência, atenção, disponibilidade, novamente paciência e pela amizade espontânea. *Dank u wel.*

À Dra. Adriana Rios Lopes, da Divisão de Ciências Fisiológicas e Químicas do Instituto Butantã, por ceder espaço em seu laboratório e permitir o uso de equipamentos necessários às análises enzimáticas.

À amiga e doutoranda Auri Rodrigues, pelo exemplo, incentivo, pelos conselhos profissionais e pessoais, por ser minha companheira de surtos libertadores e achocolatados aquecedores da alma.

À doutoranda Marisa Momoli, do laboratório GaTE, pelas incansáveis discussões, apoio e companhia que rondam o estresse oxidativo, pela ajuda com as análises enzimáticas e elucidações bioquímicas.

Ao mestrando Ilton Narita, pela ótima convivência e pela valiosa ajuda nos experimentos de análise de antioxidantes

À doutoranda Camila Cambuí, pela amizade e pela ajuda profissional, que se estende do laboratório até em casa.

Ao doutorando Luciano Freschi, pela amizade, exemplo e suporte técnico-científico-piadinístico.

À mestranda Lia Chaer, pela amizade, pela sinceridade e prontidão tanto profissional quanto pessoal. Pelos cafés, pelos cafés...

Aos amigos e companheiros de laboratório: Bia Maia, Cassia, Cintia, Aline B. e Alessandra, por todo o apoio, pelos ensinamentos, pelas oportunidades e por tornar o trabalho infinitamente mais prazeroso.

Aos companheiros do Laboratório de Fisiologia Vegetal: Flávia, Aline C., Pinho, Giovanna, Mari, Leila, Luís, Adriana G., Adriana Y., Marcelo, Laura e a todos que são ou já foram do laboratório, pelos bons momentos, cooperação, troca e apoio durante diversos momentos desta etapa.

Aos professores Gilberto Kerbauy e Marcos Buckeridge, pelo apoio, convivência e conselhos durante o andamento do trabalho.

Às técnicas do laboratório Ana Maria e Ingrid e à Leonor, do Laboratório GaTE, pela ótima convivência e por possibilitarem as condições necessárias ao bom andamento dos trabalhos.

À minha família, incluindo Henrique de Aragão, por ser exatamente como é, pelo apoio, por não questionar minha ausência e me garantir o valor maior da vida.

Às melhores amigas Marcelle, Milene, Vânia, Renata e Eloíne: essenciais desde 1991 e eternas. À amiga e mãe “fresca” Juliana Carneiro, por deixar que a biologia extrapolasse os limites da universidade.

Ao Junior, pela confiança e pelo apoio em diversos sentidos, em todos esses anos. À família Sciessere, por me acolher como uma de vocês.

Finalmente aos meus pais, que sempre fizeram o possível e o impossível por mim, respeitaram minhas escolhas e meu muito constante silêncio. Ao meu irmão, cuja maior prova de confiança foi deixar um dia escapar que, se pudesse escolher, gostaria de ser igual a mim quando crescesse.

A todos aqueles aqui não nomeados que, de alguma forma muito especial, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e foram importantes para o meu desenvolvimento pessoal.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

## ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
LISTA DE FIGURAS.....	<i>i</i>
LISTA DE TABELAS .....	<i>iii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS.....	<i>iv</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Organogênese Vegetal .....	1
1.1.2 Aminoácidos e Organogênese .....	2
1.1.3 Glutamina e Organogênese .....	4
1.2 Estresse .....	5
1.2.1 Estresse e desenvolvimento vegetal .....	5
1.2.2 Cultivo <i>in vitro</i> , organogênese e estresse .....	6
1.3 Estresse oxidativo .....	8
1.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS) .....	8
1.3.2 ROS e desenvolvimento vegetal .....	9
1.3.3 Peróxido de hidrogênio .....	10
1.4 Antioxidantes .....	11
1.4.1 Ascorbato .....	12
1.4.2 Glutathione .....	14
1.4.3 Superóxido Dismutase .....	16
1.4.4 Catalase .....	17
1.5 Abacaxizeiro e Organogênese .....	18
2. OBJETIVOS .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1 Material Vegetal .....	20
3.1.1 Obtenção das plantas .....	20
3.1.2 Obtenção dos explantes .....	21
3.2 Cultivo <i>in vitro</i> das bases foliares .....	22
3.3 Análises .....	23
3.3.1 Teste de Explantação .....	23
3.3.2 Influência da suplementação de glutamina ou glutathione no SIM .....	24
3.3.3 Acompanhamento da taxa de organogênese .....	25
3.3.4 Teores endógenos de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	25
3.3.5 Determinações de Glutathione (GSH) e Ácido Ascórbico (ASC) .....	26
3.3.6 Atividades das enzimas antioxidantes .....	29
3.4 Análise Estatística .....	31
4. RESULTADOS .....	32
4.1 Teste de Explantação .....	32
4.2 Influência da suplementação de glutamina ou glutathione ao SIM .....	33
4.2.1 Taxa de Organogênese .....	33
4.2.2 Análise de desenvolvimento .....	34
4.3 Teores endógenos de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	39
4.3.1 Acompanhamento da Taxa de Organogênese .....	39
4.3.2 Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
4.4 Determinações de Antioxidantes Não-Enzimáticos .....	41

4.4.1 Acompanhamento da Taxa de Organogênese .....	41
4.4.2 Ascorbato Endógeno .....	42
4.4.3 Glutathiona Endógena .....	44
4.5 Estado Redox .....	46
4.6 Atividades Enzimáticas .....	48
4.6.1 Acompanhamento da Taxa de Organogênese .....	48
4.6.2 Superóxido Dismutase .....	49
4.6.3 Catalase .....	50
5. DISCUSSÃO .....	51
5.1 Teste de Explantação .....	51
5.2 Influência da suplementação de glutamina ou glutathiona ao SIM .....	52
5.3 Teores endógenos de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	56
5.4 Determinações de Glutathiona e Ascorbato Endógenos .....	57
5.5 Enzimas antioxidantes .....	60
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	64
RESUMO.....	66
ABSTRACT.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<p><i>Figura 1 – Esquema representativo do ciclo ascorbato-glutationa (modificado de Inzé &amp; Van Montagu, 1995). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; APX: ascorbato peroxidase; ASC: ascorbato; MDHA: monodehidroascorbato; MDHAR: monodehidroascorbato redutase; DHA dehidroascorbato; DHAR: dehidroascorbato redutase; GSH: glutaciona; GSSG: glutaciona dissulfídeo; GR: glutaciona redutase .....</i></p>	13
<p><i>Figura 2 – Multiplicação de plantas de abacaxizeiro por meio do cultivo de segmentos nodais isolados: a) planta inicial; b) planta com folhas cortadas; c) estiolamento do eixo caulinar após 2 meses em câmara escura; d) segmentos nodais isolados; e) segmento nodal isolado; f) desenvolvimento da gema lateral e g) nova planta com 2 meses. (Foto: Regina Hamasaki).....</i></p>	21
<p><i>Figura 3 – A) Folhas de abacaxizeiro destacadas da planta-mãe e colocadas em ordem crescente em relação aos seus posicionamentos no eixo caulinar no sentido ápice-base (na figura, sentido da esquerda para a direita). B) Detalhe das bases foliares em maior aumento. (Foto: Regina Hamasaki).....</i></p>	22
<p><i>Figura 4 – Taxa de formação de eixos caulinares em explantes foliares de abacaxizeiro cultivados por 30 dias nos tratamentos indicados. Barras indicam erro padrão (n=25).....</i></p>	32
<p><i>Figura 5 – Taxa de organogênese obtida por meio dos explantes foliares cultivados por 30 dias nos tratamentos contendo Gln ou Gln+GSH ou somente GSH. Barras indicam erro padrão (n=8) .....</i></p>	34
<p><i>Figura 6 – Acúmulo de massa fresca por eixo caulinar adventício formado a partir de bases foliares cultivadas por 60 dias nos tratamentos contendo Gln ou Gln+GSH ou somente GSH. Barras indicam erro padrão (n=25) .....</i></p>	36
<p><i>Figura 7 – Acúmulo de massa seca por eixo caulinar adventício formado a partir de bases foliares cultivadas por 60 dias nos tratamentos contendo Gln ou Gln+GSH ou somente GSH. Barras indicam erro padrão (n=25).....</i></p>	37
<p><i>Figura 8 – Eixos caulinares formados a partir de bases foliares de abacaxizeiro cultivadas por 60 dias em meio SIMGln (A); SIM+GSH 10 µM, 100 µM, 1 mM, 5 mM (B-E); SIMGln+GSH 10 µM, 100 µM, 1 mM e 5 mM (F-I) .....</i></p>	38
<p><i>Figura 9 – Taxa de organogênese em explantes foliares de abacaxizeiro cultivados por 30 dias nos tratamentos indicados. Barras indicam desvio padrão (n=15) .....</i></p>	39
<p><i>Figura 10 – Taxa de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln). Barras indicam erro padrão (n=3) .....</i></p>	41

<i>Figura 11 – Conteúdo endógenos de ASC (A) e DHA (B) dos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln). Barras indicam erro padrão (n=3) .....</i>	43
<i>Figura 12 – Conteúdo endógeno de GSH e GSSG dos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln). Barras indicam erro padrão (n=3).....</i>	45
<i>Figura 13 – Taxa de organogênese em explantes foliares de abacaxizeiro cultivados por 30 dias em meio SIM ou SIMGln. Barras indicam desvio padrão (n=15).....</i>	48
<i>Figura 14 – Atividade enzimática da SOD nos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln). Barras indicam erro padrão (n=3) .....</i>	49
<i>Figura 15 – Atividade enzimática da CAT nos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln). Barras indicam erro padrão (n=3).....</i>	50

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
<i>Tabela 1 – Número de eixos caulinares por explante em bases foliares cultivadas por 60 dias nos tratamentos contendo Gln ou Gln+GSH ou somente GSH (n=25).....</i>	35
<i>Tabela 2 – Estado redox de ascorbato (ASC/ASC+DHA) nos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln) .....</i>	47
<i>Tabela 3 – Estado redox de glutathiona (GSH/GSH+GSSG) nos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln) .....</i>	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\gamma$ -ECS	$\gamma$ -glutamilcisteína sintetase
AAP	4-aminoantipirina
ANA	ácido naftalenoacético
APX	ascorbato peroxidase
ASC	ascorbato, ascorbato reduzido
BA	benziladenina
CAT	catalase
DCHBS	ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzesulfônico
DHA	dehidroascorbato, ascorbato oxidado
DHAR	dehidroascorbato redutase
DTT	ditiotreitól
GAL	L-galactono- $\gamma$ -lactona
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona, glutaciona reduzida
GSH-S	glutaciona sintetase
GSSG	glutaciona dissulfídeo, glutaciona oxidada
MDHA	monodehidroascorbato
MDHAR	Monodehidroascorbato redutase
PVPP	polivinilpirrolidona
POX	peroxidase
ROS	espécies reativas de oxigênio
SIM	meio de indução de eixos caulinares
SIMGln	meio de indução de eixos caulinares acrescido de glutamina
SOD	superóxido dismutase

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Organogênese Vegetal

A organogênese é definida como o aparecimento de um novo órgão (raiz, folha ou eixo caulinar), inicialmente como uma protuberância, em um local onde havia somente uma estrutura parental (Green, 1980). Segundo Sugiyama (1999), a organogênese *in vitro* consiste de vários aspectos, tais como a percepção de fitormônios, a aquisição de competência organogenética, a re-entrada das células quiescentes no ciclo celular e a organização da divisão celular para formar primórdios e meristemas de órgãos específicos.

Na chamada organogênese adventícia, novos órgãos se originam a partir de tecidos já diferenciados, normalmente folhas, caules ou raízes (Kerstetter & Hake, 1997). Segundo esses autores, a totipotência demonstrada pela capacidade de células vegetais diferenciadas organizarem meristemas caulinares adventícios sugere que, virtualmente, qualquer célula viva ou grupos de células na planta tem potencial para formar um meristema, dadas as condições e os sinais apropriados.

De maneira geral, podem ser reconhecidas três fases na organogênese, de acordo com o tempo requerido para haver um controle hormonal equilibrado sobre o processo (Christianson & Warnick, 1985). São elas: a) *aquisição de competência* - as células do tecido cultivado tornam-se capazes de responder aos estímulos indutores da organogênese; b) *indução* - as células competentes tornam-se determinadas à formação de um órgão específico, sob a influência da composição hormonal do meio de cultura; c) *diferenciação* - as células do tecido se diferenciam e se desenvolvem em raízes ou eixos caulinares, independentemente dos reguladores de crescimento do meio de cultura.

No que se refere aos estudos da organogênese vegetal *in vitro*, os

trabalhos investigam uma série de fatores envolvidos no controle desse processo, dentre os quais: balanço hormonal (Christianson & Warnick, 1985; Tang & Guo, 2001; Rao *et al.*, 2005; Valdés *et al.*, 2001) e fontes de nitrogênio (Shetty *et al.*, 1992; Milazzo *et al.*, 1998; Kamada & Harada, 1979; Tsai & Saunders, 1999).

### **1.1.2 Aminoácidos e Organogênese**

O nitrogênio é constituinte de um grande número de importantes compostos encontrados nas células vivas, como aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos, entre outros (Lea, 1993). Compostos nitrogenados são considerados limitantes ao crescimento e desenvolvimento vegetal, além de estarem relacionados com a sinalização de eventos fisiológicos, como a embriogênese somática (Kamada & Harada, 1984) e a organogênese (Kamada & Harada, 1979; Tang & Guo, 2001).

Na cultura de tecidos os meios nutritivos comumente utilizados possuem diferentes quantidades de nitrogênio, em grande parte fornecido inorganicamente por alguma combinação de nitrato e amônio (Tsai & Saunders, 1999). Compostos de nitrogênio orgânico, como os aminoácidos, são utilizados por meio de vias metabólicas primárias em vários aspectos do ciclo de vida das plantas, controlando direta ou indiretamente o crescimento e desenvolvimento vegetal (Joy IV *et al.*, 1994; Coruzzi & Last, 2000).

O nitrogênio originado de aminoácidos é assimilado rapidamente em esqueletos carbônicos durante o metabolismo e síntese de proteínas, quando comparado a outras fontes inorgânicas de nitrogênio (Lea, 1993). Ao suplementar o meio de cultura com misturas de aminoácidos ou preparações de proteínas hidrolisadas, freqüentemente intensifica-se o crescimento vegetal, embora certos aminoácidos possam inibi-lo (Gamborg, 1970).

Joy IV *et al.* (1994) sugeriram que o metabolismo primário de nitrogênio foi estimulado durante os primeiros estágios da organogênese de *Pinus radiata* em comparação a tecidos não formadores de órgão, que se tornaram senescentes. De acordo com Kamada & Harada (1979), o nitrogênio na forma de aminoácidos, no meio de cultura, foi essencial à indução da organogênese de *Torenia fournieri*. Milazzo *et al.* (1998) verificaram que a suplementação do meio de cultura com prolina estimulou a organogênese de gemas caulinares induzidas por benziladenina (BA) em cotilédones de melão (*Cucumis melo*). Segundo esses autores, a prolina teria estimulado a organogênese por meio da ligação desse aminoácido à via das pentoses fosfato, que regularia a biossíntese de citocininas e auxinas endógenas.

Aminoácidos podem, ainda, estar envolvidos na maneira como as plantas absorvem e assimilam os nutrientes, em particular o nitrato e o amônio. Dluzniewska *et al.* (2006) observaram que, ao adicionar glutamina à solução nutritiva empregada no cultivo de álamo, houve um aumento na concentração de diferentes compostos nitrogenados nas raízes, correlacionando negativamente com a capacidade de absorção de nitrato, além de ter alterado a distribuição da assimilação de nitrogênio entre raiz-parte aérea em favor das folhas e de ter alterado a ciclagem interna de nitrogênio da planta.

Em bromélias cultivadas *in vitro*, a substituição das fontes nitrogenadas originais do meio de cultura ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) por glutamina ou nitrato de amônio resultou em melhor crescimento do eixo caulinar, expressado pelo aumento da massa seca (Mercier & Kerbauy, 1998). As fontes nitrogenadas exerceram uma forte influência sobre o balanço entre auxinas/citocininas, cujos conteúdos endógenos variaram acentuadamente dependendo da fonte de nitrogênio utilizada (Mercier *et al.*, 1997).

### 1.1.3 Glutamina e Organogênese

A glutamina é uma fonte de nitrogênio orgânico comumente utilizada em meios de cultura de tecido de plantas superiores (Franklin & Dixon, 1994), sendo que vários pesquisadores demonstraram o envolvimento benéfico da suplementação do meio de cultura com esse aminoácido. Entretanto, poucas são as hipóteses acerca do modo de ação desse aminoácido.

Altas concentrações de glutamina no meio de cultura aumentaram a proliferação de tecidos embriogênicos de *Cryptomeria japonica*, sugerindo-se que o tratamento com glutamina teria aumentado a síntese de macromoléculas ou metabólitos essenciais à manutenção da competência das células à embriogênese (Ogita *et al.*, 2001). O conteúdo endógeno de glutamina aumentou rapidamente durante os primeiros estágios de iniciação de gemas adventícias em segmentos caulinares de *Torenia*, sugerindo que o acúmulo desse aminoácido nas células deva ser um dos fatores necessários para a iniciação de gemas adventícias (Tanimoto & Harada, 1989).

Hamasaki *et al.* (2005) observaram que o período de indução da organogênese de bases foliares de abacaxizeiro ocorreu entre o primeiro e o sétimo dias de cultivo *in vitro* no meio de cultura suplementado com 8 mM de glutamina. Nesse período, as células competentes da base foliar responderam aos sinais gerados pela adição do aminoácido no meio de cultura. Ao se quantificar o conteúdo endógeno de glutamina nos explantes foliares de abacaxizeiro, observou-se que houve uma drástica redução na quantidade desse aminoácido nas primeiras horas de cultivo *in vitro* (Kitakawa, 2004). Entretanto, quando o meio de cultura continha glutamina, o reaparecimento da glutamina endógena se fez mais rapidamente do que em explantes cultivados sem o aminoácido. Imaginou-se que nesse período inicial do cultivo *in vitro*, quando se acredita que o estresse deva ser bastante elevado, a glutamina endógena poderia ser um marcador do tempo em que o explante está submetido a um alto grau de



estresse. Assim que a glutamina reaparecesse endogenamente, marcaria o final do período crítico do estresse.

## **1.2 Estresse**

A investigação das bases fisiológicas e moleculares das alterações fenotípicas, que possibilitaram que as plantas se adaptassem à grande variedade de ambientes, explora uma rica gama de informações (Weigel & Dean, 2002) e muito se tem estudado a respeito dos estresses aos quais as plantas podem estar sujeitas.

Para Larcher (1980), estresses são mudanças na fisiologia quando da exposição das plantas a condições desfavoráveis, que não necessariamente representem ameaça à vida, mas induzirão uma resposta defensiva ou adaptativa ao estímulo. Segundo Nilsen & Orcutt (1996), fisiologicamente, estresse é a condição causada por fatores que tendem a alterar um equilíbrio.

O estresse desencadeia uma série de respostas nas plantas, desde expressão gênica e metabolismo celular alterados até mudanças nas taxas de crescimento (Bray *et al.*, 2000). Dependendo das características do estresse e da planta, haverá uma resposta de resistência ou suscetibilidade a ele, resultando na morte do organismo ou em sua sobrevivência e crescimento (Bray *et al.*, 2000). Entretanto, ainda é pouco explorado como uma planta percebe alterações ambientais e como ela desencadeia sinais ativadores das respostas fisiológicas (Hung *et al.*, 2005).

### **1.2.1 Estresse e desenvolvimento vegetal**

Sob condições de estresse, uma das estratégias adotadas pelas plantas é

desacelerar o crescimento, conservando energia para defesa e limitando o risco de danos (Vranová *et al.*, 2002). Dessa forma, o estresse pode aumentar a tolerância da planta ao próprio fator estressante durante respostas de indução e aclimação, sendo que essa tolerância se relaciona a uma série de respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que diminuem a exposição ao estresse, limitam o dano ou facilitam o reparo de sistemas danificados (Potters *et al.*, 2007).

Se o estresse for suportável, ele intensifica o metabolismo e induz mecanismos adaptativos, que incluem a reprogramação da expressão gênica e alterações na fisiologia e no metabolismo celular, gerando uma homeostase na nova condição (Féher *et al.*, 2003). No entanto, a capacidade das plantas de neutralizar as condições de estresse depende da eficiência e da velocidade com que elas reconhecem o estresse, geram moléculas sinalizadoras e ativam mecanismos de proteção (Pasternak *et al.*, 2005). Sabendo-se que as plantas podem perceber o estresse, desencadeando eficientemente as respostas de defesa apropriadas, entretanto pouco se conhece sobre como essa informação é veiculada à maquinaria do ciclo celular (May *et al.*, 1998).

Diferentes estresses abióticos induzem respostas morfogênicas que compreendem uma mistura de inibição e ativação do crescimento (Potters *et al.*, 2007). Dentre os diferentes fatores abióticos que podem levar uma planta ao estresse, os metais pesados, a hipoxia, as deficiências nutricionais e a radiação UV-B têm sido reconhecidos como indutores de respostas morfogênicas, enquanto que alterações no metabolismo de auxina e espécies reativas de oxigênio (ROS) são consideradas sinalizadores dessas respostas induzidas por estresse (SIMR) (Potters *et al.*, 2007).

### **1.2.2 Cultivo *in vitro*, organogênese e estresse**

O cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais fornece um modelo benéfico

para a investigação dos eventos morfológicos, bioquímicos e moleculares que ocorrem no início do desenvolvimento das plantas (Kanmegne & Omokolo, 2003). No entanto, a técnica pode expor as plantas a fatores considerados estressantes, tais como: remoção do ambiente original do tecido, perturbação mecânica, composição do meio de cultura (reguladores de crescimento, sais, compostos orgânicos), acúmulo de gases (especialmente o etileno), umidade aumentada, corrente transpiratória diminuída, alta ou baixa luminosidade e variação de temperatura.

A organogênese de tecidos cultivados *in vitro* resulta da influência das condições intrínsecas do desenvolvimento e de fatores ambientais, incluindo componentes do meio. A cultura de tecido *in vitro* leva a alterações no ambiente celular, expondo os explantes a estresses significativos, sendo um deles a injúria causada pela explantação, que é considerada um dos sinais envolvidos com a indução da desdiferenciação (Féher *et al.*, 2003).

Acredita-se que a resistência da planta aos efeitos do estresse seja determinada pelo nível de atividades das enzimas antioxidantes e a capacidade de aumentar rapidamente essas atividades (Polesskaya *et al.*, 2004). Além disso, alterações nas concentrações de aminoácidos têm sido associadas ao estado metabólico, o qual controla vários processos de crescimento de maneira homeostática. A prolina, por exemplo, foi considerada uma fonte de nitrogênio orgânico com papel protetor contra o estresse associado ao cultivo *in vitro*. Ela apresentou efeito promotor no processo de regeneração e embriogênese somática de *Vigna mungo* (L.) (Sen *et al.*, 2002).

Pasternak *et al.* (2002) mostraram que o estresse oxidativo induzido pela adição de ferro ao meio de cultura aumentou a quantidade de auxinas endógenas e promoveu a divisão em protoplastos de folhas de alfafa (resultando em uma linhagem embriogênica), além de aumentar a atividade da peroxidase do ascorbato (um sequestrador de peróxido de hidrogênio) no primeiro dia de cultivo. Esses autores

sugerem que o aumento de auxinas e a sinalização do estresse podem ser eventos-chave na adaptação celular, reprogramando o padrão de expressão gênica, metabolismo e fisiologia celular, resultando na totipotência e competência à formação de embriões somáticos.

### **1.3 Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo é descrito como um desbalanço entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes nos sistemas biológicos. Pode ser desencadeado pela formação aumentada de ROS e/ou pela redução nas defesas antioxidantes, sendo que uma variedade de condições estressantes, tanto bióticas quanto abióticas, desencadeia um aumento de ROS em células animais e vegetais (Mahalingam & Fedoroff, 2003). O estado redox é um determinante crítico da função celular e grandes desbalanços nesse estado podem causar danos severos à planta ou levá-la à morte (Dietz & Scheibe, 2004).

#### **1.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS)**

As plantas, como qualquer outro organismo aeróbico, requerem oxigênio para a produção eficiente de energia. Se a redução do  $O_2$  a  $H_2O$  for parcial, podem ser formadas ROS, como radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, além de espécies reativas de enxofre e nitrogênio, particularmente o óxido nítrico e hidroperóxidos de lipídio (Vranová *et al.*, 2002; Mahalingam & Fedoroff, 2003). As ROS são altamente reativas com lipídeos de membrana, proteína e DNA; acredita-se que elas sejam os fatores que mais contribuem para as injúrias decorrentes do estresse e causem rapidamente danos celulares (Hung *et al.*, 2005).

As fontes enzimáticas de ROS estão localizadas tanto extra quanto intracelularmente, sendo que as mais importantes são as peroxidases e amino-oxidases (localizadas nas paredes celulares), NADPH-oxidases da membrana plasmática, oxidases e peroxidases da mitocôndria, cloroplastos, peroxissomos e núcleo (Mahalingam & Fedoroff, 2003). Dado o fato de que as enzimas produtoras de ROS estão localizadas em diferentes compartimentos celulares, suas ativações dependem da natureza do estímulo desencadeador e da rota pela qual ele é percebido (Mahalingam & Fedoroff, 2003).

A produção endógena de ROS é uma característica geral do estresse vegetal, visto que sua produção aumentada é observada em resposta a uma variedade de agentes estressantes abióticos, incluindo temperaturas extremas, alta luminosidade, déficit hídrico, herbicidas, entre outros (Mahalingam & Fedoroff, 2003). As ROS não são unicamente moléculas sinalizadoras de estresse, mas podem também ser um sinal intrínseco do crescimento e desenvolvimento vegetal (Vranová *et al.*, 2002). Altas concentrações de ROS podem levar à fitotoxicidade, enquanto concentrações relativamente baixas podem ser utilizadas para sinalização de aclimatação, o que confere extrema importância à modulação dos conteúdos de ROS nas plantas (Dat *et al.*, 2000).

### **1.3.2 ROS e desenvolvimento vegetal**

Alguns trabalhos sugerem uma ligação entre ROS e a fisiologia do desenvolvimento, embora a relação entre ROS e a diferenciação e regeneração de plantas ainda não seja bem compreendida.

A formação de radical hidroxila foi detectada durante respostas morfogênicas em hipocótilo de diferentes genótipos de linho (*Linum usitatissimum* L.) cultivados *in vitro*, com ou sem a adição de reguladores de crescimento (Obert *et al.*,

2005). O monitoramento da reatividade do radical hidroxila pôde dar uma indicação do potencial que os radicais livres têm para mediar o estresse em tecidos cultivados *in vitro*.

A diferenciação de células embriogênicas foi afetada positivamente por alta quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular, o qual induziu e promoveu a embriogênese somática de *Lycium barbarum* (Kairong *et al.*, 1999). Tian *et al.* (2003) investigaram a liberação de radicais peróxidos, peróxido de hidrogênio e a atividade de enzimas antioxidantes durante a organogênese. Os resultados dessa pesquisa sugerem que o peróxido de hidrogênio esteja correlacionado com o processo morfogênético em calos de morango, podendo atuar como mensageiro no processo de formação de primórdios de gemas.

### **1.3.3 Peróxido de hidrogênio**

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é uma forma de ROS gerada no estresse oxidativo, moderadamente reativa, formada nos peroxissomos como parte da via fotorespiratória (Neill *et al.*, 2002; Vranová *et al.*, 2002). Quando formado pela oxidação de amins, pode ser diretamente utilizado por peroxidases ligadas à parede na lignificação e fortalecimento da parede celular, tanto durante o crescimento normal quanto em resposta a estímulos externos. Além disso, desempenha possivelmente uma função na sinalização de respostas de defesa, não só contra patógenos, mas também na sinalização de estresses abióticos como ferimentos, alterações térmicas ou excesso de luz (Vranová *et al.*, 2002). Alguns outros processos biológicos que também utilizam a sinalização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são: a morte celular programada, o fechamento estomático e o gravitropismo de raiz regulado por auxina (Neill, Desikan & Hancock, 2002).

Kairong *et al.* (1999) afirmam que, embora o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja um agente oxidante fraco entre as ROS, o fato de ele poder ser gerado em uma grande variedade de

tipos celulares e de ser capaz de penetrar membranas celulares rapidamente faz com que tenha o mais importante papel em funções celulares. Hung *et al.* (2005) sugerem que entre as ROS, o  $H_2O_2$  parece ser o mais adequado para desempenhar o papel de molécula sinalizadora, devido à sua alta estabilidade e longa meia-vida. Ainda segundo esses autores, o  $H_2O_2$  agiria como um sinal de estresse, ao mesmo tempo em que a flutuação do seu conteúdo endógeno nas plantas refletiria alterações espaciais e temporais do meio ambiente.

O  $H_2O_2$  modula a expressão de vários genes, incluindo aqueles que codificam enzimas antioxidantes e moduladores da sua produção, indicando a maneira complexa pela qual as concentrações endógenas de  $H_2O_2$  podem ser monitoradas e mantidas em nível constante. (Neill *et al.*, 2002). A enzima catalase e o ciclo ascorbato-glutationa são importantes vias no seqüestro de  $H_2O_2$  e, embora suas propriedades sejam diferentes, funcionam efetivamente em paralelo (Dat *et al.*, 2000).

#### **1.4 Antioxidantes**

As plantas têm um sistema de defesa bem desenvolvido contra as ROS, tanto limitando sua formação quanto instituindo sua remoção (Alscher *et al.*, 2002). Esse sistema constitui uma complexa gama de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que regulam as ROS, protegendo as células dos danos oxidativos (Vranová *et al.*, 2002). Enzimas, incluindo catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX) e glutaciona redutase (GR) e os antioxidantes não-enzimáticos como tocoferóis, ácido ascórbico e glutaciona trabalham em conjunto para regular as quantidades de ROS (Hung *et al.*, 2005).

O grau de estresse oxidativo em uma célula pode ser determinado pelas quantidades de radicais superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio (Apel & Hirt,

2004). Portanto, o balanço das atividades de SOD, APX e CAT é essencial para suprimir quantidades tóxicas de ROS em uma célula.

#### **1.4.1 Ascorbato**

O ácido ascórbico, também conhecido como ascorbato, desempenha um papel essencial na sobrevivência dos organismos vegetais. É um agente antioxidante que, em associação com outros componentes do sistema antioxidante, protege as plantas contra danos oxidativos resultantes dos metabolismos aeróbico, fotossintético e da poluição (Smirnoff, 1996). Ele está presente no citossol, cloroplasto, vacúolo, mitocôndria e matriz extracelular (Potters *et al.*, 2002).

O ascorbato pode ser encontrado na forma reduzida (ASC), semi-oxidada (monodehidroascorbato - MDHA) e totalmente oxidada (dehidroascorbato - DHA) (Potters *et al.*, 2002). A oxidação do ASC resulta inicialmente na formação do radical MDHA, o qual pode ser convertido em ASC ou DHA, sendo este último instável em pH acima de 7, portanto é necessário manter o pool de ascorbato total na forma reduzida para evitar perdas rápidas (Smirnoff, 1996). A ciclagem eficiente entre as formas oxidadas e reduzidas do ASC minimiza a degradação do DHA e diminui a necessidade por altas taxas de síntese de novo (Horemans *et al.*, 2000). O esquema representativo da ciclagem do ascorbato, conhecido por ciclo ascorbato-glutationa, está representado na figura 1.

Uma maneira pela qual as plantas sintetizam o ASC envolve intermediários da produção de L-galactono- $\gamma$ -lactona (GAL), precursora imediata do ASC (Horemans *et al.*, 2000). Esse processo de biossíntese parece ocorrer na membrana mitocondrial interna. Segundo Smirnoff (1996), essa via é apoiada pela rápida conversão da GAL exógena a ASC e pela caracterização de uma enzima mitocondrial (GAL desidrogenase) que catalisa a oxidação de GAL a ASC.



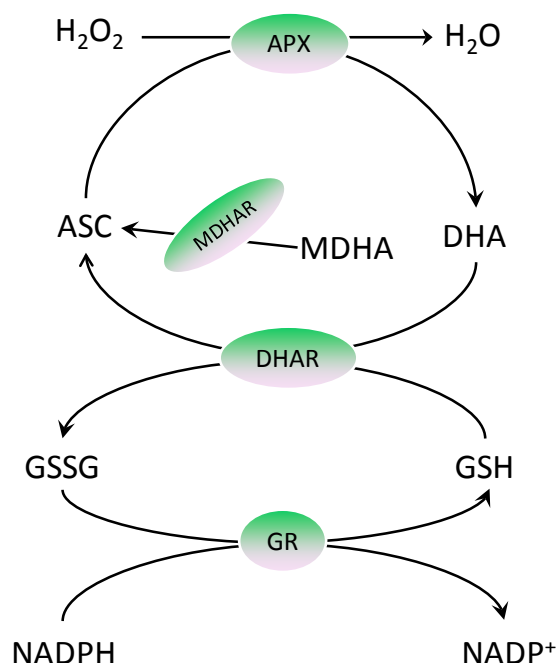


Figura 1 – Esquema representativo do ciclo ascorbato-glutationa (modificado de Inzé & Van Montagu, 1995).  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio; APX: ascorbato peroxidase; ASC: ascorbato; MDHA: monodehidroascorbato; MDHAR: monodehidroascorbato redutase; DHA deidroascorbato; DHAR: deidroascorbato redutase; GSH: glutatona; GSSG: glutatona dissulfídeo; GR: glutatona redutase.

Entre as funções biológicas do ASC descritas em plantas, podem ser citadas as propriedades antioxidantes e as induções da divisão e do alongamento celular (Horemans *et al.*, 2000). Como antioxidante, sugere-se que o ascorbato seja o principal composto para a eliminação de ROS, especialmente o  $H_2O_2$  (Hung *et al.*, 2005). A enzima APX catalisa a redução do  $H_2O_2$  em água e tem alta especificidade e afinidade pelo ascorbato como agente redutor (Smirnoff, 2000). Há evidências sugerindo uma dupla ação do ASC no crescimento celular: primeiro, modificando o ciclo celular e estimulando células quiescentes à divisão; e segundo, acelerando a expansão e o alongamento celular (Horemans *et al.*, 2000). O ascorbato é capaz de influenciar o progresso do ciclo celular em plantas, sendo o DHA a forma redox ativa nesse processo (Potters *et al.*, 2000).

### 1.4.2 Glutathione

A glutathione, um tripeptídeo de glutamato, cisteína e glicina ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), é um metabólito multifuncional nas plantas, ao mesmo tempo em que é um grande “reservatório” de enxofre reduzido não-protéico (Noctor *et al.*, 2002). É um agente antioxidante, que participa do controle da homeostase celular, ajudando a evitar o estresse oxidativo. Ela ocorre nos tecidos animais e vegetais sob duas formas redox: a forma reduzida, glutathione (GSH) e a forma oxidada (GSSG) (Potters *et al.*, 2002).

A biossíntese e o papel da glutathione no metabolismo vegetal têm sido discutidos há vários anos (May *et al.*, 1998; Noctor *et al.*, 1998, 2002). A via de biossíntese é bem estabelecida e similar entre plantas, animais e microrganismos. As plantas sintetizam glutathione a partir de carbono inorgânico, nitrogênio e enxofre, empregando os aminoácidos glutamato, cisteína e glicina (Noctor & Foyer, 1998). Para formar o tripeptídeo completo, os aminoácidos constituintes são unidos em dois passos dependentes de ATP; o primeiro deles, catalisado pela enzima  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -ECS), forma  $\gamma$ -glutamylcysteine e o segundo, catalisado pela glutathione synthetase (GSH-S), produz GSH por meio da adição de um resíduo de glicina (Noctor *et al.*, 2002; Cobbett *et al.*, 1998).

Alguns estudos com animais têm demonstrado uma influência positiva da glutamina sobre a reversão dos efeitos do metabolismo oxidativo. Babu *et al.* (2001) observaram que a glutamina reverteu os efeitos do metabolismo oxidativo em fígado de ratos neonatos e que a efetividade desse aminoácido parece ter sido mediada via síntese de glutathione. Yu *et al.* (1999) observaram em tecido hepático de ratos que a glutamina seria um precursor vital do glutamato para a síntese de glutathione. De acordo com esses autores, o glutamato é pouco transportado para dentro das células e parte da molécula desse aminoácido é derivada da glutamina. Ao contrário, a glutamina seria eficientemente transportada através da membrana celular, sendo desaminada na mitocôndria para

produzir glutamato e  $\text{NH}_3$ . O glutamato seria então transportado de volta ao citossol, ficando disponível para a síntese de glutathione. Portanto, a glutamina atuaria como precursor vital do glutamato para a síntese de glutathione.

Outros autores afirmam que a síntese de glutathione é controlada primariamente pela atividade da  $\gamma$ -ECS e disponibilidade de cisteína (Noctor *et al.*, 2002; Anderson, 1998). Ao contrário da cisteína, há poucos dados que indiquem haver uma limitação da síntese de glutathione pela disponibilidade de glutamato e, pelo menos em folhas iluminadas e sob condições não estressantes, a concentração de glicina seria suficientemente alta para suportar taxas máximas de síntese de glutathione (Noctor *et al.*, 1998).

A biossíntese de GSH parece ser uma resposta intrínseca das plantas ao estresse, sendo estimulada quando as células se encontram sob condições estressantes, aumentando sua capacidade de defesa (May *et al.*, 1998; Potters *et al.*, 2002). Geralmente, o papel fisiológico da glutathione nas células vegetais envolve, além da defesa contra o estresse oxidativo, o metabolismo do enxofre e a desintoxicação de compostos xenobióticos (Potters *et al.*, 2002).

A GSH reage quimicamente com ROS, mas a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependente de GSH não é a principal rota de destruição dessa espécie reativa do oxigênio, já que a reação entre esses dois compostos é lenta (Noctor *et al.*, 1998, 2002). Em plantas, o maior substrato para a desintoxicação redutiva do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é o ascorbato, que deve ser continuamente regenerado a partir de suas formas oxidadas. A principal função da glutathione na proteção contra o estresse oxidativo é a redução do ascorbato oxidado no ciclo ascorbato-glutathione (Noctor *et al.*, 1998) (Fig. 1).

A flutuação do conteúdo de GSH também poderia ser utilizada como um bom indicador do estado redox nas células vegetais (Hung *et al.*, 2005). A avaliação do

estado redox da planta é importante, porque a alteração desse estado apontaria se a planta está submetida ou não a uma condição estressante (Munné-Bosch *et al.* 2004). O balanço GSH/GSSG parece ser mais influente no controle da expressão gênica e atividade protéica que a quantidade absoluta de glutatona, sendo que a proporção de glutatona na forma reduzida (GSH) reflete as taxas relativas de redução e oxidação, sendo sempre maiores que 0,9 sob condições não estressantes (Noctor *et al.*, 1998, 2002).

### 1.4.3 Superóxido Dismutase

A enzima superóxido dismutase (SOD) seqüestra o radical superóxido ( $O_2^-$ ) (Mizuno *et al.*, 1998). Dentro de uma célula, essa enzima constitui a primeira linha de defesa contra as ROS sendo, portanto, crucial que essa enzima esteja presente para a remoção do  $O_2^-$  nos compartimentos onde ele é formado (Alscher *et al.*, 2002).

Segundo Mizuno *et al.* (1998), muitas plantas possuem um número de isoformas da SOD que estão localizadas em diversos compartimentos celulares. Dependendo do co-fator utilizado pela enzima, as SODs são classificadas em três grupos: FeSOD (cloroplastos); MnSOD (mitocôndrias e peroxissomos); e Cu/ZnSOD (cloroplastos, citossol e possivelmente no espaço extracelular) (Bowler *et al.*, 1992; Alscher *et al.*, 2002).

De acordo com Konieczny *et al.* (2008), as diferentes isoformas da SOD são as principais seqüestradoras de  $O_2^-$ , enquanto a remoção do excesso de  $H_2O_2$  da célula é realizada por catalases e peroxidases.

Já foram estudadas diferenças na atividade das enzimas antioxidantes durante a organogênese e embriogênese somática em várias espécies vegetais cultivadas *in vitro* (Cui *et al.*, 1999; Gupta & Datta, 2003; Tang & Newton, 2005;

Konieczny *et al.*, 2008).

A SOD reage com radicais superóxido para produzir  $H_2O_2$ . Como a ação da SOD resulta na formação de  $H_2O_2$ , essa enzima está intimamente ligada ao ciclo ascorbato-glutationa. Assim, a SOD age em paralelo com outras enzimas e antioxidantes conferindo uma regulação altamente otimizada que reduz a formação de radical hidroxila. A discussão da SOD, portanto, precisa considerar o sistema de defesa do estresse oxidativo como um todo (Bowler *et al.*, 1992).

#### **1.4.4 Catalase**

Em plantas, a enzima catalase (CAT) é encontrada predominantemente nos peroxissomos, onde atua principalmente na remoção do  $H_2O_2$  formado durante a fotorespiração (Bowler *et al.* 1992). Essa enzima apresenta baixa ou nenhuma atividade no citossol, na mitocôndria e nos cloroplastos (Mizuno *et al.*, 1998).

Apesar da sua localização restrita, a CAT pode ter um papel significativo na defesa contra o estresse oxidativo, removendo o  $H_2O_2$  de outros compartimentos subcelulares que não os peroxissomos, pois o  $H_2O_2$  pode facilmente se difundir pelas membranas (Bowler *et al.* 1992; Willekens *et al.*, 1997).

A CAT não utiliza poder redutor para sua atividade e possui uma alta taxa de reação e menor afinidade pelo  $H_2O_2$  do que a enzima ascorbato peroxidase (APX) (Inzé & Van Montagu, 1995; Willekens *et al.*, 1970). A APX necessita de ascorbato como poder redutor e possui uma maior afinidade pelo  $H_2O_2$ , permitindo o seqüestro de pequenas quantidades dessa ROS em locais mais específicos (Willekens *et al.*, 1997). Segundo Mittler (2002), a diferença de afinidade da APX e da CAT pelo  $H_2O_2$  sugere que elas pertençam a duas classes distintas de enzimas seqüestradoras de ROS: a APX deve ser responsável pela modulação fina de ROS para a sinalização, enquanto a CAT deve

ser responsável pela remoção do excesso de ROS durante o estresse.

### 1.5 Abacaxizeiro e Organogênese

O cultivo *in vitro* tem sido utilizado para aquisição de conhecimento fisiológico de bromélias como, por exemplo, necessidades nutricionais, produção endógena de hormônios e outros aspectos do desenvolvimento desse grupo de plantas (Mercier & Kerbauy, 1997).

Em abacaxizeiro (*Ananas comosus*), folhas cultivadas *in vitro* representam um modelo de organogênese onde não há a formação prévia de um calo: o desenvolvimento de um eixo caulinar adventício é precedido pela formação, na base da folha, de um aglomerado celular chamado de protuberância (Mercier *et al.*, 2003). Essas protuberâncias diferem dos calos por apresentarem um sistema vascular organizado (Carneiro, 1997).

Os estudos sobre organogênese a partir de explantes foliares de abacaxizeiro têm investigado aspectos relacionados a esse evento morfogênético, como: condições de cultivo para obtenção de novas plantas (Sripaoraya *et al.*, 2003); conteúdos endógenos de auxinas e citocininas associados à formação de eixos caulinares adventícios (Mercier *et al.*, 2003); o envolvimento da glutamina e conteúdo hormonal endógeno no aumento da competência organogenética (Hamasaki *et al.*, 2005); quantificação de aminoácidos endógenos durante a indução da organogênese adventícia (Kitakawa, 2004).

O cultivo *in vitro* das bases foliares de abacaxizeiro pode constituir *per se* uma condição estressante aos explantes, a qual pode estar relacionada com o processo de organogênese adventícia. Entretanto, essa relação estresse *versus* organogênese ainda não foi estudada no modelo citado, sendo o que se propõe este trabalho.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo compreender o papel da glutamina no favorecimento da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro cultivado *in vitro*. Especificamente, procurou-se verificar se a glutamina estaria envolvida com uma possível diminuição do estresse oxidativo durante o período de indução da organogênese.

Para tanto, buscou-se correlacionar a influência do suprimento do meio de cultura com glutamina aos teores endógenos de peróxido de hidrogênio, glutatona, ascorbato e com o estado redox da glutatona e do ascorbato endógenos ao longo do processo de organogênese de gemas caulinares adventícias surgidas nas bases foliares de abacaxizeiro cultivado *in vitro*. Além disso, foram analisadas as atividades de duas enzimas antioxidantes nesses explantes foliares, a superóxido dismutase e a catalase. Tentativamente, a glutatona foi adicionada ao meio de cultura, contendo ou não glutamina, visando conhecer o efeito desse antioxidante no processo organogenético.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

A metodologia de multiplicação e obtenção das plantas e explantes, bem como as condições de cultivo, no que diz respeito ao tipo de frasco utilizado, luminosidade, quantidade e posição dos explantes, foram baseadas no trabalho de Hamasaki (2003), que estabeleceu as condições mais adequadas ao modelo de estudo.

##### 3.1.1 Obtenção das plantas

A espécie utilizada em todos os experimentos deste trabalho foi *Ananas comosus* (L.) Merr var. Smooth Cayenne (abacaxizeiro). As plantas de *A. comosus*, provenientes de um clone existente no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, foram multiplicadas *in vitro* para gerar material suficiente à montagem dos ensaios.

Para cada lote, plantas com aproximadamente 8 cm de altura (Fig. 2 a) tiveram suas folhas cortadas de maneira que os eixos caulinares ficassem com cerca de 1 cm (Fig. 2 b). Estes eixos caulinares foram transferidos para frascos de vidro contendo 80 mL de meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) (MS), geleificado com a adição de 2 mg.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>. Os frascos permaneceram no escuro durante dois meses para o estiolamento dos eixos caulinares uma vez que, em bromélias, o caule é bastante curto, daí a necessidade do estiolamento, possibilitando o alongamento dos entrenós e facilitando a separação dos segmentos nodais (Fig. 2 c-e)

A partir dos eixos caulinares estiolados, os segmentos nodais foram seccionados com aproximadamente 1 cm de comprimento e transferidos em seguida para um novo meio MS, no qual permaneceram por 3 a 4 meses, tempo necessário para o desenvolvimento de cada gema axilar em uma nova planta (Fig. 2 e-g). A multiplicação



por segmentos nodais possibilita a obtenção de um material vegetal homogêneo em termos de tamanho e vigor.

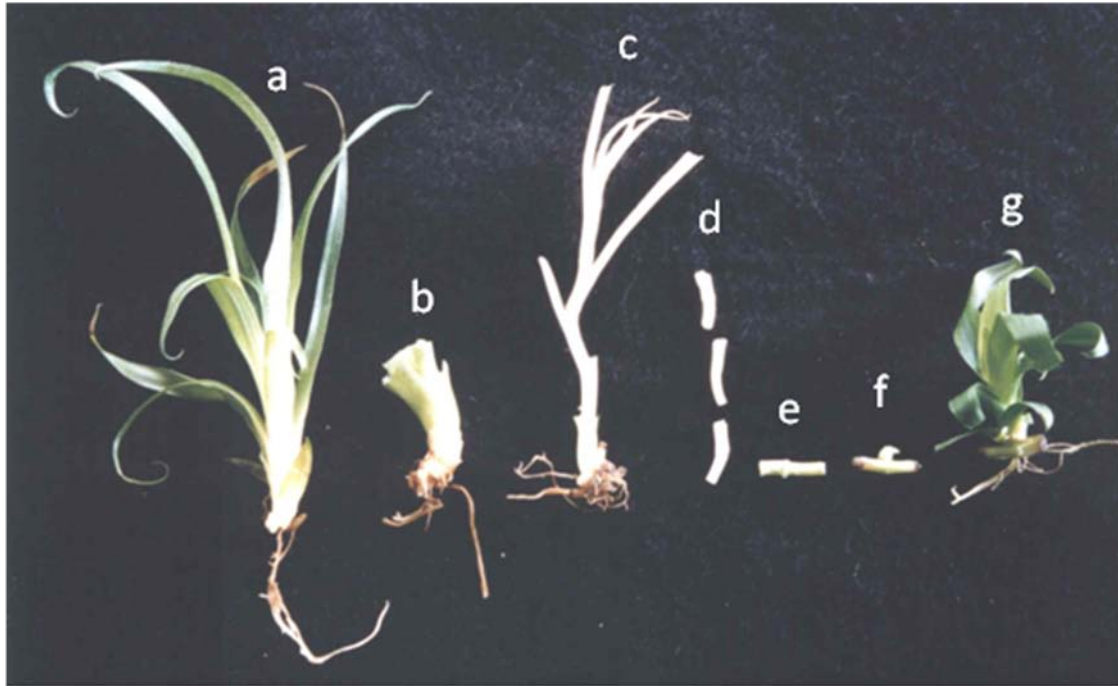


Figura 2 – Multiplicação de plantas de abacaxizeiro por meio do cultivo de segmentos nodais isolados: a) planta inicial; b) planta com folhas cortadas; c) estiolamento do eixo caulinar após 2 meses em câmara escura; d) segmentos nodais isolados; e) segmento nodal isolado; f) desenvolvimento da gema lateral e g) nova planta com 2 meses. (Foto: Regina Hamasaki).

### 3.1.2 Obtenção dos explantes

Para os experimentos realizados foram utilizadas as folhas provenientes do 4º e 5º nós a partir do ápice de plantas de *A. Comosus* (Fig. 3). Nessas folhas isolou-se a porção basal, com aproximadamente 1 cm de comprimento, já que é nessa porção que existem células competentes a responder aos estímulos do meio de cultura (Hamasaki *et al.*, 2005). Os explantes foram inoculados horizontalmente, com a face adaxial em contato com o meio de cultura.

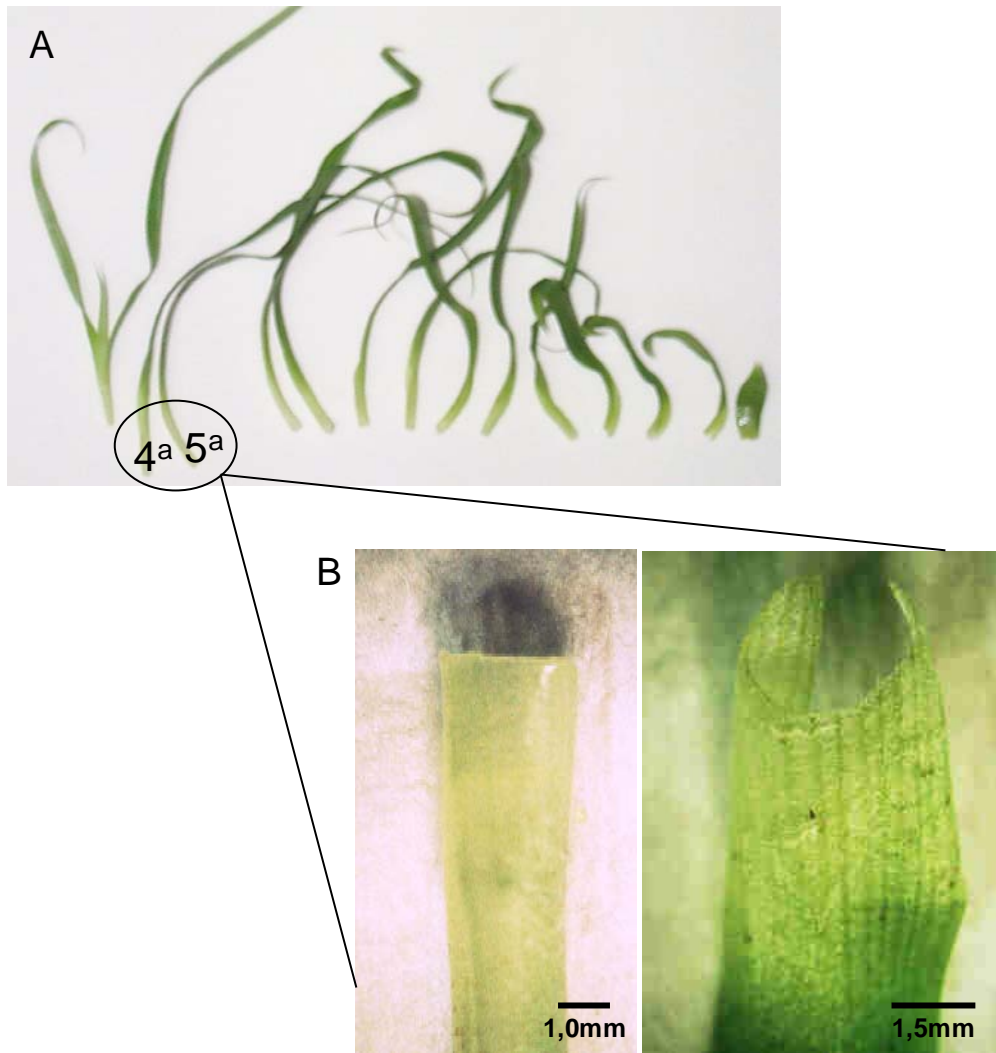


Figura 3 – A) Folhas de abacaxizeiro destacadas da planta-mãe e colocadas em ordem crescente em relação aos seus posicionamentos no eixo caulinar no sentido ápice-base (na figura, sentido da esquerda para a direita). B) Detalhe das bases foliares em maior aumento. (Foto: Regina Hamasaki).

### 3.2 Cultivo *in vitro* das bases foliares

As culturas foram mantidas em sala climatizada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de  $40\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes. As bases foliares foram inoculadas em frascos “Erlenmeyer” (125 mL), contendo 15 mL de meio de cultura com pH ajustado para 5.8 antes da autoclavagem ( $120^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos).

Os meios de cultura utilizados nos experimentos têm como base o meio de regeneração proposto por Mercier *et al.* (2003), denominado de meio SIM ("Shoot Induction Medium"), composto pelos macronutrientes do meio Knudson (1946), micronutrientes do MS e os reguladores de crescimento BA (2,0 mg.L<sup>-1</sup>) e ANA (1,0 mg.L<sup>-1</sup>), geleificado com a adição de 2 mg.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>.

Na descrição de cada experimento estão indicados quais os meios de cultura que foram utilizados:

- 1) SIMGln: meio SIM acrescido de 8 mM do aminoácido glutamina.
- 2) SIM+GSH: meio SIM acrescido de diferentes concentrações de glutathione (10 µM, 100 µM, 1 mM e 5 mM).
- 3) SIMGln+GSH: meio SIMGln acrescido de diferentes concentrações de glutathione (10 µM, 100 µM, 1 mM e 5 mM).

As soluções de glutamina e de glutathione foram feitas com água destilada e adicionadas ao meio de cultura previamente autoclavado, sendo ultrafiltradas em filtro da marca Millipore<sup>®</sup> (0,22 µm), em câmara de fluxo laminar.

### **3.3 Análises**

#### **3.3.1 Teste de Explantação**

Esse teste foi realizado para verificar se a explantação estava sendo feita de maneira adequada, ou seja, se ao separar as folhas da planta-mãe não haveria resquílios de tecido do caule, o qual poderia conter células do primórdio de gema lateral. Essas células poderiam resultar em organogênese de novas plantas mesmo se cultivadas na ausência de reguladores de crescimento, porém não seriam as células de interesse do trabalho.

As bases foliares foram inoculadas em meio SIM, SIMGln ou KN (meio

Knudson, sem a adição de reguladores de crescimento, sendo considerado o controle negativo) e cultivadas por 30 dias. Após esse período foram avaliadas as taxas de formação de eixos caulinares adventícios nos explantes. Adicionalmente, foi feito um tratamento onde o meio KN foi suplementado com 8 mM de glutamina, a fim de verificar se esse aminoácido poderia substituir totalmente os reguladores de crescimento, induzindo a organogênese adventícia nos explantes foliares.

Cada tratamento foi composto por 6 frascos “Erlenmeyer” de 125 mL (replicatas), com 5 bases foliares cada um.

### **3.3.2 Influência da suplementação de glutamina ou glutathiona no SIM**

O objetivo desse experimento foi analisar se a glutathiona intensificaria o efeito da glutamina na regeneração de novas plantas a partir das bases foliares ou se ela própria substituiria o efeito positivo da glutamina. Além disso, foi analisado o desenvolvimento dos eixos caulinares formados a partir dos explantes foliares.

Os tecidos foliares foram inoculados nos frascos contendo meio de cultura SIMGln, SIM+GSH (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM e 5 mM) ou SIMGln+GSH (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM e 5 mM), sendo cultivados e analisados como descrito a seguir:

- a) *taxa de organogênese*: a contagem de protuberâncias ou gemas caulinares nos explantes foi avaliada após 30 dias de cultivo *in vitro*. Cada tratamento consistiu de 8 frascos do tipo “Erlenmeyer” de 125 mL, contendo 5 explantes cada um.
- b) *análise de crescimento*: após 60 dias de cultivo, foram analisados os seguintes parâmetros: número de eixos caulinares por explante, massas fresca e seca, grau de desenvolvimento dos eixos caulinares adventícios. Neste caso, as medidas foram realizadas levando-se em conta somente os eixos caulinares completamente formados, com altura maior que 1 mm quando isolados do

explante inicial. Nessa fase as protuberâncias foram desconsideradas, já que mesmo após 60 dias de cultivo não resultaram em novas plantas.

### **3.3.3 Acompanhamento da taxa de organogênese**

Juntamente com a obtenção de material vegetal para as análises endógenas de  $H_2O_2$  e antioxidantes, cultivaram-se bases foliares com a finalidade de acompanhar sua taxa de formação de eixos caulinares. Para tanto, os explantes foram obtidos e cultivados de acordo com o item 3.1, sendo a taxa de organogênese avaliada após 30 dias. Cada tratamento (SIM e SIMGln) foi composto por 15 frascos “Erlenmeyer” de 125 mL (replicatas), com 5 bases foliares cada um.

### **3.3.4 Teores endógenos de $H_2O_2$**

Para verificar a dinâmica de produção de  $H_2O_2$  pelos explantes foliares ao longo do tempo de indução da organogênese e desenvolvimento das novas plantas, foi realizado o experimento descrito a seguir.

Bases foliares foram cultivadas por diferentes tempos: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias em meio SIM ou SIMGln e a taxa de produção do  $H_2O_2$  foi medida para cada tempo coletado. O tempo zero consistiu em explantes retirados da planta-mãe no momento da realização do ensaio. Para cada tempo de coleta foram realizadas triplicatas contendo 5 explantes cada uma.

A produção do  $H_2O_2$  pelos explantes foliares foi medida de acordo com Van Gestelen *et al.* (1998), cujo método é baseado na oxidação dependente da peroxidase do ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzesulfônico (DCHBS) até sua forma quinona, que reage especificamente com 4-aminoantipirina (AAP), gerando um complexo molecular cuja detecção espectrofotométrica é feita a 510 nm.

Os explantes foram coletados e colocados em pequenas placas de Petri, contendo: meio de cultura líquido (correspondente a cada tratamento), solução 1 mM de DCHBS, solução 0,1 mM de AAP e solução de peroxidase (POX,  $<1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), num volume total de 5 mL. As placas foram mantidas sob leve e constante agitação durante o ensaio. A cada trinta minutos, num total de duas horas, foi retirado 1 mL da solução contida nas placas de Petri para a leitura espectrofotométrica (510 nm) e devolvida em seguida. O cálculo da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi feito com base na interpolação das medidas de absorbância com a curva de calibração.

### **3.3.5 Determinações de Glutationa (GSH) e Ácido Ascórbico (ASC)**

A fim de medir o conteúdo endógeno nos explantes de GSH, ASC e suas formas oxidadas, as bases foliares foram cultivadas de acordo com o item 3.1 e coletadas nos seguintes tempos: 0, 12, 24 e 48 horas; 2, 3, 4 e 5 dias. As análises foram feitas de acordo com o protocolo descrito por Potters (2002).

#### ***a) Coleta do material vegetal***

Os explantes foram coletados em cada um dos tempos citados, determinando-se a massa fresca (aproximadamente 400 mg), congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer  $-80^\circ\text{C}$  até o momento da extração. Tomou-se o cuidado de manter as amostras sempre em temperatura baixa evitando-se, assim, a oxidação dos compostos a serem analisados.

#### ***b) Extração e preparo das amostras***

Os explantes congelados foram macerados em nitrogênio líquido, sempre cuidando para não descongelarem, até a obtenção de um pó fino. Adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$

da solução de extração (ácido metafosfórico 6% = mPA 6%) e após um leve descongelamento do extrato, adicionaram-se mais 500  $\mu\text{L}$  de mPA 6%, macerando-se levemente o extrato. O volume foi transferido para um microtubo, utilizando-se micropipeta com a ponta das ponteiros previamente geladas e cortadas.

As amostras foram então centrifugadas a 14000g por 20 minutos, a 4°C (Centrífuga Eppendorf® 5415 R). Do sobrenadante foram coletadas duas alíquotas de 400  $\mu\text{L}$ , distribuídas em dois novos microtubos, os quais foram estocados no escuro, a -80°C, até o momento do uso.

Para preparar as amostras a serem injetadas no cromatógrafo (HPLC), as mesmas foram diluídas na proporção 3:1 (fase móvel:amostra). A fase móvel utilizada foi preparada com uma solução de KCl 2 mM.

### ***c) Curva de calibração***

A quantificação das amostras baseou-se numa curva de calibração dos compostos estudados, preparada a partir de uma solução 100 mM dos padrões de ácido L-ascórbico (ASC) e glutathiona reduzida (GSH) diluídos em mPA 6%. Os pontos de concentração estabelecidos foram de 500  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 0  $\mu\text{M}$ , de acordo com resultados observados previamente com a injeção de uma amostra teste. Para o ponto 0 $\mu\text{M}$  adicionou-se fase móvel:mPA 6% na proporção 3:1.

### ***d) Análise em cromatógrafo (HPLC)***

As determinações do ascorbato e da glutathiona foram realizadas em cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC Waters® 510), utilizando-se uma coluna C18 (Waters®) de fase reversa (diâmetro de 3  $\mu\text{m}$ , Polaris 3 C18 column, Chromsep SS 100 x 4.6 mm). A fase móvel consistiu de uma solução de KCl 2 mM, com pH 2.5

(ajustado com ácido orto-fosfórico concentrado), filtrada e desaerada previamente ao uso. O fluxo da fase móvel foi mantido no modo isocrático a 0.8 mL/min, aumentando-se o fluxo de 0.1 em 0.1 mL por minuto. Para equilibrar a coluna, essa condição foi mantida por 15 minutos antes das injeções das amostras. O volume injetado das amostras e dos pontos da curva padrão foi de 20  $\mu$ L.

Para a detecção de ascorbato, ajustou-se uma corrida com fluxo de 0.8 mL/min da fase móvel, com duração de 3 minutos. O detector de UV foi ajustado para 252 nm. Para a glutathiona, a corrida teve um fluxo de 0.8 mL/min da fase móvel, com duração de 4 minutos. O detector de UV foi ajustado para 194 nm. Antes de cada injeção das amostras, o injetor foi lavado com um volume de 20  $\mu$ L de fase móvel (injeção “vazia”), a fim de retirar qualquer resíduo da amostra anterior.

#### ***e) Análises de dehidroascorbato (DHA) e glutathiona oxidada (GSSH)***

O protocolo de análise de antioxidantes determina apenas as formas reduzidas tanto do ascorbato quanto da glutathiona. Para a análise das formas oxidadas, procedeu-se a uma redução total das mesmas utilizando-se um tampão de redução preparado com ditioneitol (DTT) e Tris, quantificando-se o total de ascorbato e glutathiona.

Para a redução das formas oxidadas, adicionaram-se 100  $\mu$ L do tampão de redução em 100  $\mu$ L de cada amostra (não diluídas). Após 30 minutos de incubação no gelo e no escuro, a reação foi parada adicionando-se, em cada ponto, 100  $\mu$ L da fase móvel e 100  $\mu$ L de mPA 6%. O tempo de corrida para cada amostra foi de 18 minutos para cada forma reduzida analisada. Esse tempo prolongado foi necessário para que o DTT fosse eliminado da coluna.

O cálculo do conteúdo dos antioxidantes foi feito com base na comparação das medidas de área de cada pico das amostras com as áreas obtidas quando da injeção



de concentrações conhecidas de ascorbato e glutathione.

### **3.3.6 Atividades das enzimas antioxidantes**

#### **a) Extração de enzimas antioxidantes**

A extração das enzimas antioxidantes baseou-se no protocolo descrito por Rao *et al.* (1996). Os explantes congelados (aproximadamente 200 mg) foram triturados em nitrogênio líquido com 100 mg de PVPP até a obtenção de um pó fino, o qual foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 contendo EDTA 2 mM a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 15000 g por 20 minutos a 4°C (Centrífuga Sorvall, rotor SS34). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 contendo EDTA 1mM. Essa solução foi dialisada três vezes a 4°C (3 horas cada diálise em béqueres de 4L) contra o tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 contendo EDTA 1mM. As soluções resultantes da diálise foram estocadas a -80°C e utilizadas posteriormente nos ensaios de SOD e CAT. A quantidade de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando ovoalbumina como padrão.

#### **b) Ensaios de Superóxido Dismutase (SOD)**

Os ensaios de SOD total (CuZnSOD + MnSOD) foram realizados segundo McCord & Fridovich (1969) a 25°C por 1 min e lidos em 550 nm. Devido à instabilidade de seu substrato, os ensaios disponíveis de SOD são indiretos, dependendo da captação de radicais superóxido e, portanto, da inibição de reações causadas por esses radicais. Um fluxo de radicais superóxido é gerado pela ação da xantina oxidase sobre a xantina. Esses radicais são medidos quanto à sua habilidade em reduzir citocromo c ( $Fe^{3+}$ ) a citocromo c ( $Fe^{2+}$ ) e, portanto, SOD é quantificada quanto à sua habilidade em inibir a

redução do citocromo c ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Beauchamp & Fridovich, 1971).

Para os ensaios foram preparadas, no mesmo dia das análises, duas soluções:

Solução A: 26 mg de ferricitocromo c (1 mmol) + 1,32 mg de xantina (5  $\mu\text{mol}$ ) em 100 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8 contendo 0,1 % de EDTA 0,1 M.

Solução B: xantina oxidase, diluída com tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8 contendo 0,01 % de EDTA 0,1 M, em concentração suficiente para produzir uma taxa de redução do ferricitocromo a 550 nm de 0,025 unidades de absorbância por minuto. O melhor resultado foi obtido com a xantina pura.

Utilizou-se para a cinética 170  $\mu\text{L}$  da solução A, 10  $\mu\text{L}$  dos diferentes extratos e 20  $\mu\text{L}$  da solução B, disparadora da reação, sempre com as amostras em triplicata. Para o branco, utilizaram-se 170  $\mu\text{L}$  da solução A, 20  $\mu\text{L}$  da solução B e 10  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8. Os ensaios foram montados em placas de polipropileno com poços de 200  $\mu\text{L}$  e a leitura foi realizada no leitor de placas SpectraMax<sup>®</sup> 190 (Molecular Device). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade desta enzima capaz de causar 50% de inibição da taxa de redução do citocromo c ( $\text{Fe}^{3+}$ ) nestas condições. Foram utilizadas triplicatas de amostras biológicas diferentes.

### ***c) Ensaios de catalase (CAT)***

Os ensaios de catalase foram realizados segundo Aebi (1984), observando-se o consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 20°C por 8 min e lidos em 240 nm (comprimento de onda na faixa da luz ultravioleta). A metodologia se baseia na medida direta da atividade de catalase. Um volume de amostra (que conteria ou não catalase) é adicionado a uma

solução de peróxido de hidrogênio 10 mM (mantida em frasco escuro a 4°C) e tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8. Faz-se, então, a cinética de decaimento da concentração de peróxido de hidrogênio no sistema em comparação ao branco do experimento (sem enzima) e em comparação à curva de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por meio de espectrometria a 240 nm.

Em uma placa de quartzo com poços de 200 µL foram aplicados 182 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM e 18 µL de tampão fosfato 50 mM pH 7,8 para fazer a curva correspondente ao branco; 182 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 µL de tampão fosfato e 4 µL de cada extrato, para a quantificação de catalase em relação ao branco. Para a curva de peróxido de hidrogênio foram utilizadas concentrações entre 100 ηmoles e 1800 ηmoles. As leituras foram realizadas no leitor de placas SpectraMax<sup>®</sup> 190 (Molecular Device). Foram utilizadas triplicatas de amostras biológicas diferentes.

### **3.4 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas por meio de testes específicos. O teste t-student ( $p < 0,05$ ) foi utilizado para analisar os resultados de acompanhamento das taxas de organogênese e a comparação dos resultados obtidos entre os tratamentos SIM e SIMGln nas análises bioquímicas. O teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foi utilizado para o teste de explantação e para comparar as médias obtidas em cada tempo de cultivo em um determinado tratamento (SIM ou SIMGln). Para as análises da influência da suplementação de glutamina ou glutatona no SIM, o teste utilizado foi o Dunnett ( $p < 0,05$ ), que compara cada tratamento ao controle (SIMGln). Os testes utilizados em cada resultado, bem como o  $n$  amostral de cada experimento estão descritos na legenda de cada figura. O programa utilizado para a análise estatística foi o JMP, versão 5.0.1.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Teste de Explantação

A presença dos reguladores de crescimento BA e ANA no meio de cultura é essencial à indução organogênética em folhas de abacaxizeiro. Em suas ausências (tratamento KN) não houve a formação de eixos caulinares; já na presença de BA e ANA (tratamento SIM), a taxa de formação foi de 66,7% (Fig. 4). Quando se acrescentou glutamina, houve um aumento de 20% na capacidade de organogênese. No entanto, a glutamina não pôde substituir os efeitos dos reguladores BA e ANA (tratamento KN+Gln), reduzindo muito a taxa de formação das novas gemas adventícias.

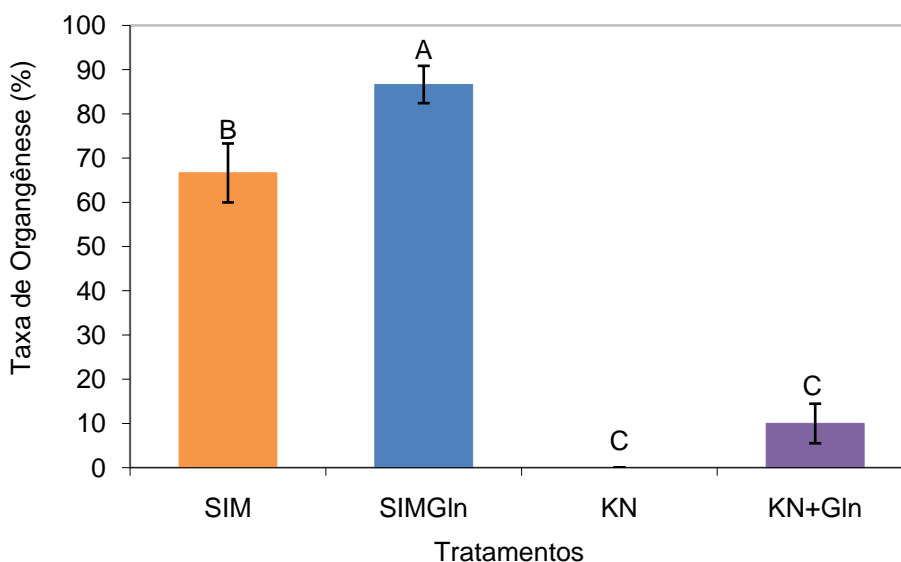


Figura 4 – Taxa de formação de eixos caulinares em explantes foliares de abacaxizeiro cultivados por 30 dias nos tratamentos indicados. Barras indicam erro padrão (n=25).

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

## **4.2 Influência da suplementação de glutamina ou glutathiona ao SIM**

### **4.2.1 Taxa de Organogênese**

Encontraram-se indícios de que a glutathiona pode substituir o efeito benéfico da glutamina, quando adicionada ao meio SIM na ausência desse aminoácido, já que as taxas de organogênese obtidas apresentaram valores semelhantes ou superiores ao tratamento SIMGln (Fig. 5). A adição de glutathiona ao meio de cultura que já continha glutamina não teve efeito promotor, além daquele já obtido para o aminoácido. Ao contrário, quando associados antioxidante e aminoácido, a taxa de organogênese reduziu de 82,5% (SIMGln+GSH 10  $\mu$ M) até 67,5% (SIMGln+GSH 5 mM), conforme se aumentou a concentração de glutathiona (Fig. 5).

Embora essas tendências possam ser observadas, estatisticamente, não houve diferenças entre os tratamentos.

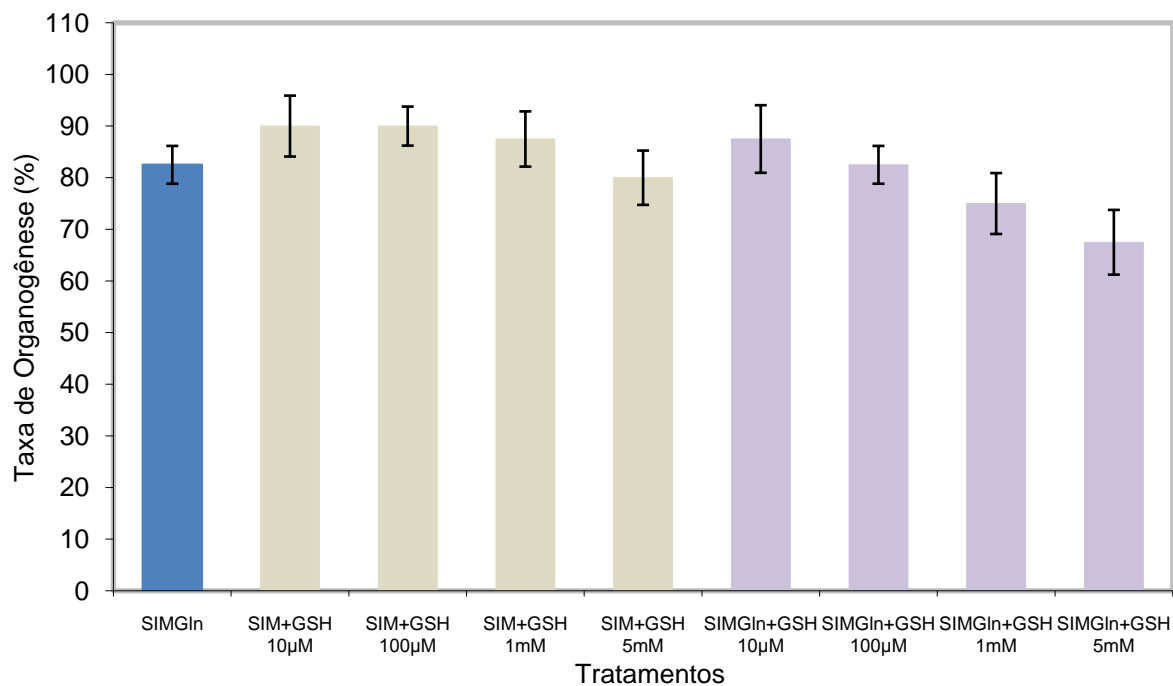


Figura 5 – Taxa de organogênese obtida por meio dos explantes foliares cultivados por 30 dias nos tratamentos contendo Gln ou Gln+GSH ou somente GSH. Barras indicam erro padrão ( $n=8$ ).

#### 4.2.2 Análise de desenvolvimento

De modo interessante, foram observadas diferenças significativas quanto ao número de eixos caulinares formados por explante, dependendo do tratamento. Além disso, os eixos caulinares formados apresentavam graus de vigor variáveis.

##### a) número de eixos caulinares por explante:

Os explantes cultivados na presença de glutatona na concentração de 5 mM apresentaram cerca de duas vezes mais eixos caulinares por explante comparativamente ao controle, SIMGln (Tabela 1). Notou-se que a adição de glutamina conjuntamente com 5 mM de glutatona não incrementou esse efeito positivo, mostrando

que o componente determinante nessa indução de maior número de eixos caulinares por explante foi a glutatona. Quando esta foi adicionada ao meio SIMGln na concentração de 100  $\mu$ M, também ocorreu um incremento significativo no número de gemas caulinares formadas por explante, em relação ao controle (SIMGln).

*Tabela 1 – Número de eixos caulinares por explante em bases foliares cultivadas por 60 dias nos tratamentos contendo Gln ou Gln+GSH ou somente GSH (n=25).*

*(\*) Diferenças significativas entre tratamento e controle (SIMGln) (teste de Dunnett,  $P < 0,05$ ).*

<b>Tratamento</b>	<b>Nº de eixos caulinares por explante</b>
SIMGln	5,44 $\pm$ 0,47
SIM+GSH 10 $\mu$ M	4,80 $\pm$ 0,40
SIM+GSH 100 $\mu$ M	5,24 $\pm$ 0,23
SIM+GSH 1 mM	3,84 $\pm$ 0,28
SIM+GSH 5 mM	10,80 $\pm$ 0,64 *
SIMGln+GSH 10 $\mu$ M	4,28 $\pm$ 0,39
SIMGln+GSH 100 $\mu$ M	8,28 $\pm$ 0,62 *
SIMGln+GSH 1 mM	5,32 $\pm$ 0,36
SIMGln+GSH 5 mM	11 $\pm$ 0,95 *

*b) massa fresca:*

Os novos eixos caulinares que apresentaram diferença significativa em relação ao aumento da massa fresca foram aqueles originados a partir dos explantes cultivados em SIMGln+GSH 5 mM (Fig. 6). Já nos tratamentos onde houve suplementação somente de glutatona (nas concentrações de 10  $\mu$ M ou 1 mM), o desenvolvimento das gemas adventícias foi inferior ao controle (SIMGln).

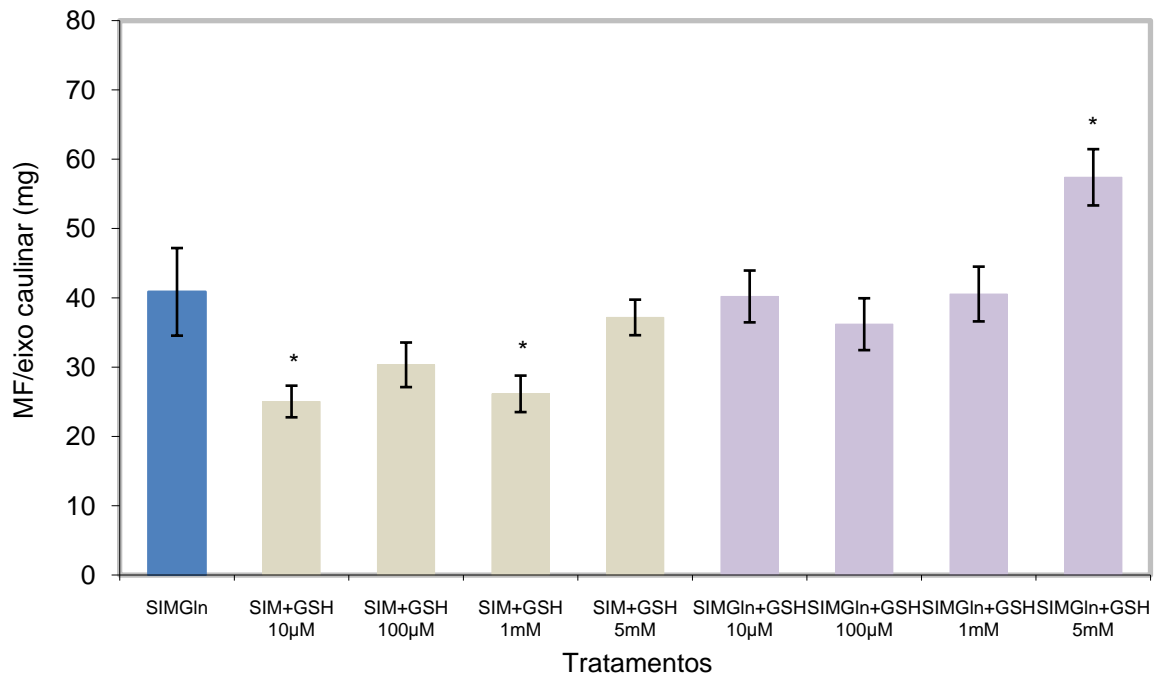


Figura 6 – Acúmulo de massa fresca por eixo caulinar adventício formado a partir de bases foliares cultivadas por 60 dias nos tratamentos contendo Gln ou Gln+GSH ou somente GSH. Barras indicam erro padrão (n=25).

(\*) Diferenças significativas entre tratamento e controle (SIMGln) (teste de Dunnett,  $P < 0,05$ ).

c) massa seca:

Os eixos caulinares de explantes cultivados somente com glutathiona (10 µM, 1 mM ou 5 mM) reduziram suas massas secas, comparativamente ao controle (Fig. 7). A presença conjunta de Gln e GSH não mostrou haver diferenças significativas no acúmulo de massas secas em relação ao cultivo em SIMGln.



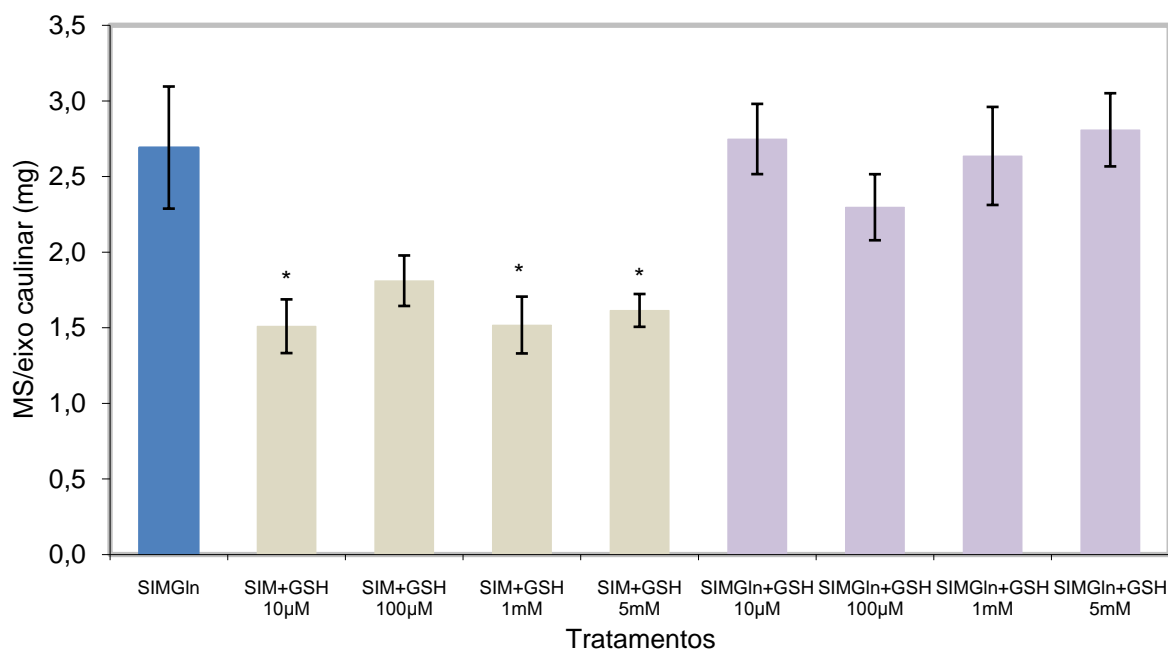


Figura 7 – Acúmulo de massa seca por eixo caulinar adventício formado a partir de bases foliares cultivadas por 60 dias nos tratamentos contendo Gln ou Gln+GSH ou somente GSH. Barras indicam erro padrão (n=25).

(\*) Diferenças significativas entre tratamento e controle (SIMGln) (teste de Dunnett,  $P < 0,05$ ).

d) vigor dos eixos caulinares:

Neste trabalho convencionou-se definir vigor dos eixos caulinares como: eixos com folhas mais compridas e mais bem formadas, com tom mais escuro do verde e maior número de folhas por eixo caulinar.

A figura 8 ilustra as diferentes respostas de desenvolvimento dos eixos caulinares originados de explantes foliares cultivados nos diferentes tratamentos. Pode-se observar o maior número de eixos caulinares por explante obtidos nos tratamentos SIM+GSH 5 mM e SIMGln+GSH 5 mM (E e I, respectivamente) e o maior grau de vigor dos eixos caulinares referentes ao tratamento SIMGln+GSH 5 mM (letra I). Além disso, quando os explantes foram cultivados somente com glutatona nas concentrações de 10

$\mu\text{M}$  (B) ou  $100 \mu\text{M}$  (C), houve a formação de uma massa de protuberâncias que não se desenvolveu em eixos caulinares até o 60º dia de cultivo *in vitro*.

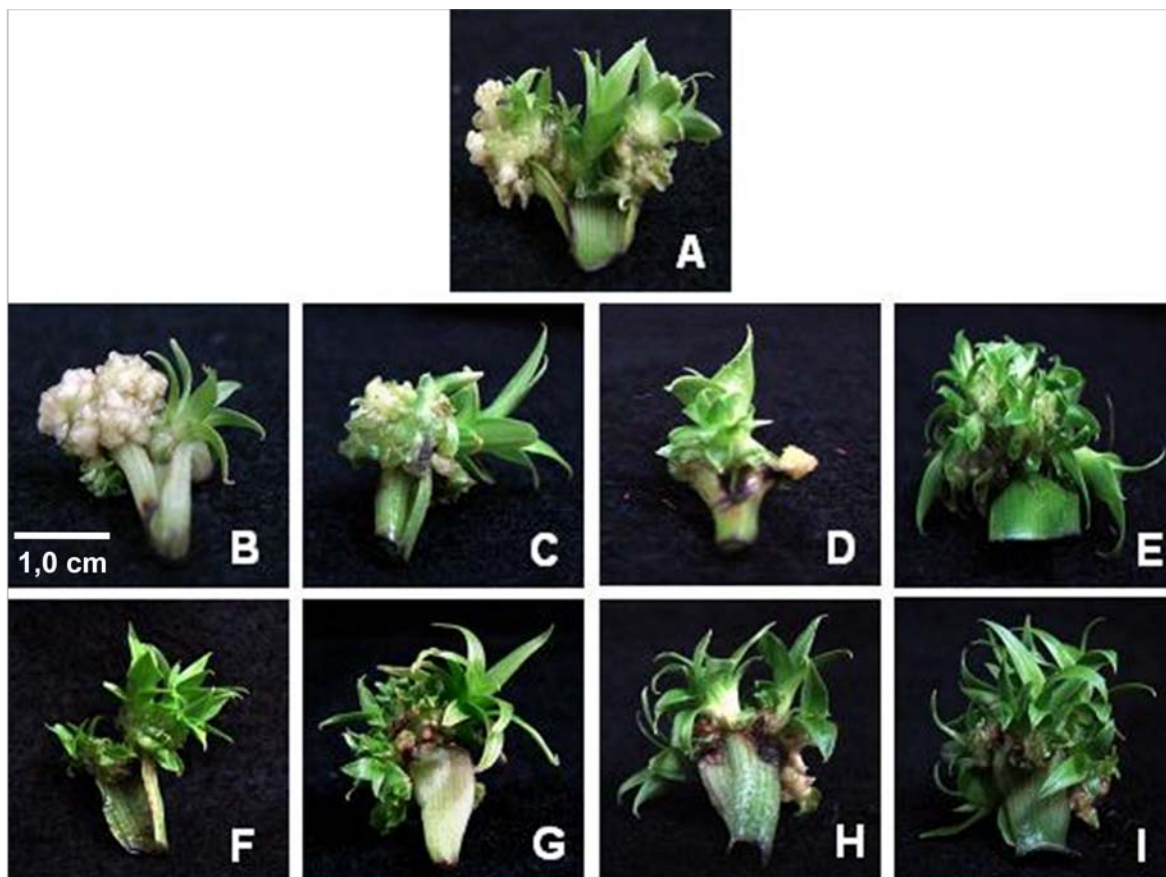


Figura 8 – Eixos caulinares formados a partir de bases foliares de abacaxizeiro cultivadas por 60 dias em meio SIMGln (A); SIM+GSH 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 5 mM (B-E); SIMGln+GSH 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM e 5 mM (F-I).

### 4.3 Teores endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.3.1 Acompanhamento da Taxa de Organogênese

O acompanhamento da taxa de organogênese foi realizado visando assegurar que os dados bioquímicos obtidos a partir do material vegetal cultivado *in vitro* refletissem os perfis de respostas morfogênicas dos explantes cultivados em SIM ou SIMGln. O material vegetal utilizado para a quantificação endógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de antioxidantes proveio do mesmo lote de plantas cultivadas em SIM ou SIMGln, portanto a interpretação dos resultados de tais análises levou em conta a taxa de organogênese observada na figura 9.

Cerca de 70% das bases foliares cultivadas em meio SIM apresentaram formação de eixos caulinares adventícios após 30 dias de incubação (Fig. 9). Quando esse meio foi suplementado com 8 mM de glutamina (SIMGln), a capacidade de formação de eixos caulinares nos explantes foi significativamente aumentada em 22%.

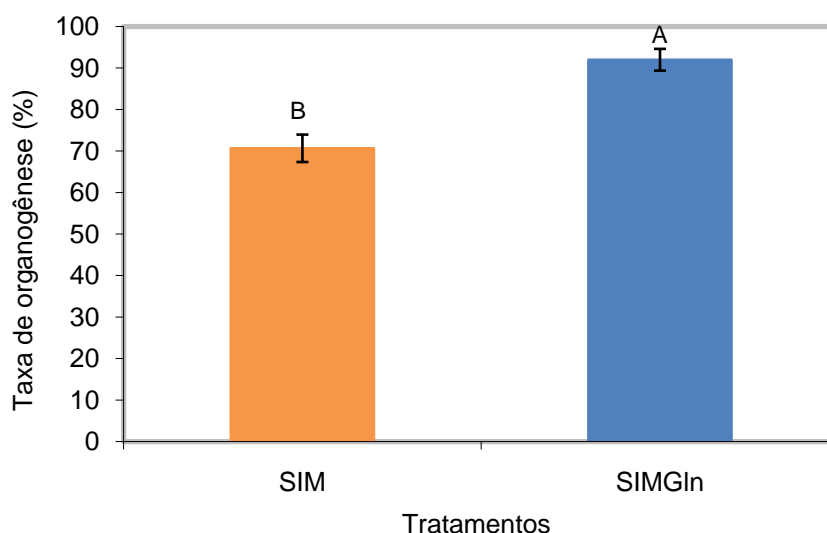


Figura 9 – Taxa de organogênese em explantes foliares de abacaxizeiro cultivados por 30 dias nos tratamentos indicados. Barras indicam desvio padrão (n=15)

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste t-student, P<0,05).

### 4.3.2 Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Testes preliminares realizados em nosso laboratório sugeriram que a cultura *in vitro* das bases foliares causa uma condição estressante para os explantes logo no início do período de cultivo, mas que esse estresse pode ser superado, diminuindo ao longo do tempo. A glutamina pareceu propiciar aos explantes uma recuperação mais rápida em comparação àqueles cultivados na ausência desse aminoácido (dados não mostrados).

Os resultados obtidos acerca da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas bases foliares de abacaxizeiro durante o período de indução da organogênese adventícia estão representados na figura 10.

Nas primeiras 24 horas de cultivo das bases foliares foi observado um pico na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 10), com valores cerca de três vezes superiores aos observados no momento da explantação (tempo zero). A partir do 2º dia, a produção dessa espécie reativa de oxigênio reduziu gradativamente até o 4º dia, com tendência à estabilização após esse período. Já no 4º dia de cultivo, o conteúdo endógeno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medido nos explantes se igualou ao do início, quando do isolamento das bases foliares.

Houve pouca ou nenhuma diferença entre os tratamentos SIM e SIMGln quanto à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao longo do período de indução da organogênese adventícia, com exceção do 3º dia, quando explantes cultivados em meio contendo glutamina apresentaram produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significativamente maior comparativamente aos explantes cultivados em SIM.

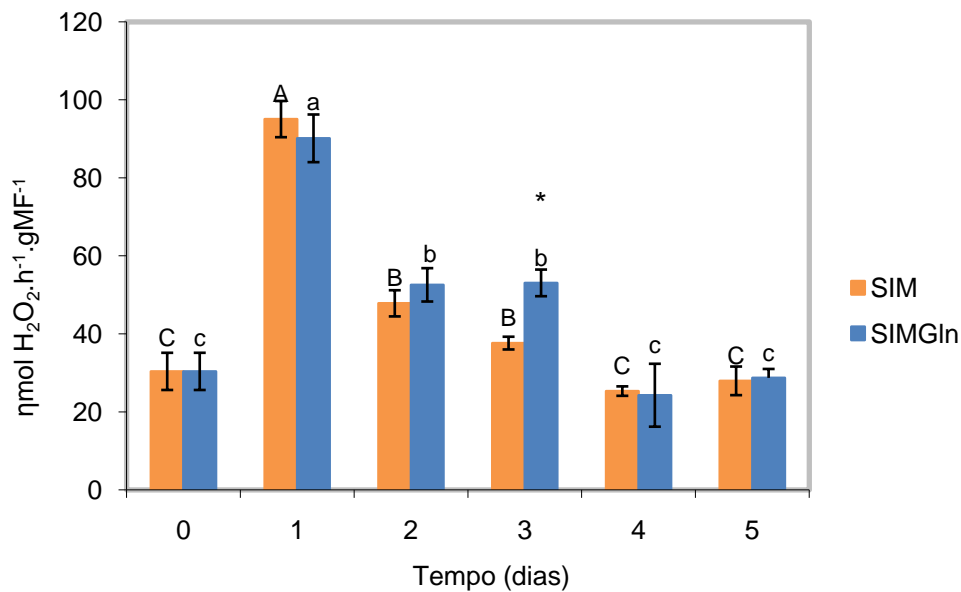


Figura 10 – Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln). Barras indicam erro padrão (n=3).

(\*) Diferenças significativas entre tratamentos (teste t-student, P<0,05).

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos em um determinado tratamento (teste de Tukey, P<0,05). Letras maiúsculas=SIM e letras minúsculas=SIMGln.

#### 4.4 Determinações de Antioxidantes Não-Enzimáticos

##### 4.4.1 Acompanhamento da Taxa de Organogênese

O acompanhamento da taxa de organogênese do material vegetal utilizado para a quantificação endógena de antioxidantes está descrito no item 4.3.1 e a interpretação dos resultados de tais análises levou em conta a taxa de organogênese descrita na figura 9.

As quantificações de antioxidantes não enzimáticos endógenos (ascorbato e glutatona) presentes nos explantes foliares durante o período de indução da organogênese adventícia estão descritas a seguir.

#### 4.4.2 Ascorbato Endógeno

O conteúdo endógeno de ASC nos explantes foliares apresentou um pequeno decréscimo nas primeiras 12 horas de cultivo, seguido de um aumento, de aproximadamente duas vezes, ao final de 24 horas (Fig. 11A). Após o 2º dia de cultivo, esses valores decaíram ligeiramente. De maneira geral não houve diferença entre o controle (SIM) e o tratamento (SIMGln), com exceção do 4º dia.

A forma oxidada, dehidroascorbato (DHA), não foi detectada nas primeiras 12 horas, aparecendo nos explantes cultivados em meio SIM por 24 horas e somente no 2º dia de cultivo em SIMGln (Fig. 11B). Após o 2º dia, houve uma tendência de aumentar a concentração de DHA, com exceção do 5º dia para os explantes cultivados em SIM.

Ainda que na figura pareça haver diferenças entre os tratamentos, com exceção do 1º dia de cultivo, os valores obtidos não foram estatisticamente diferentes entre si. Isto possivelmente se deveu a uma alta heterogeneidade de resposta das amostras biológicas, representada aqui pelas barras de erro.

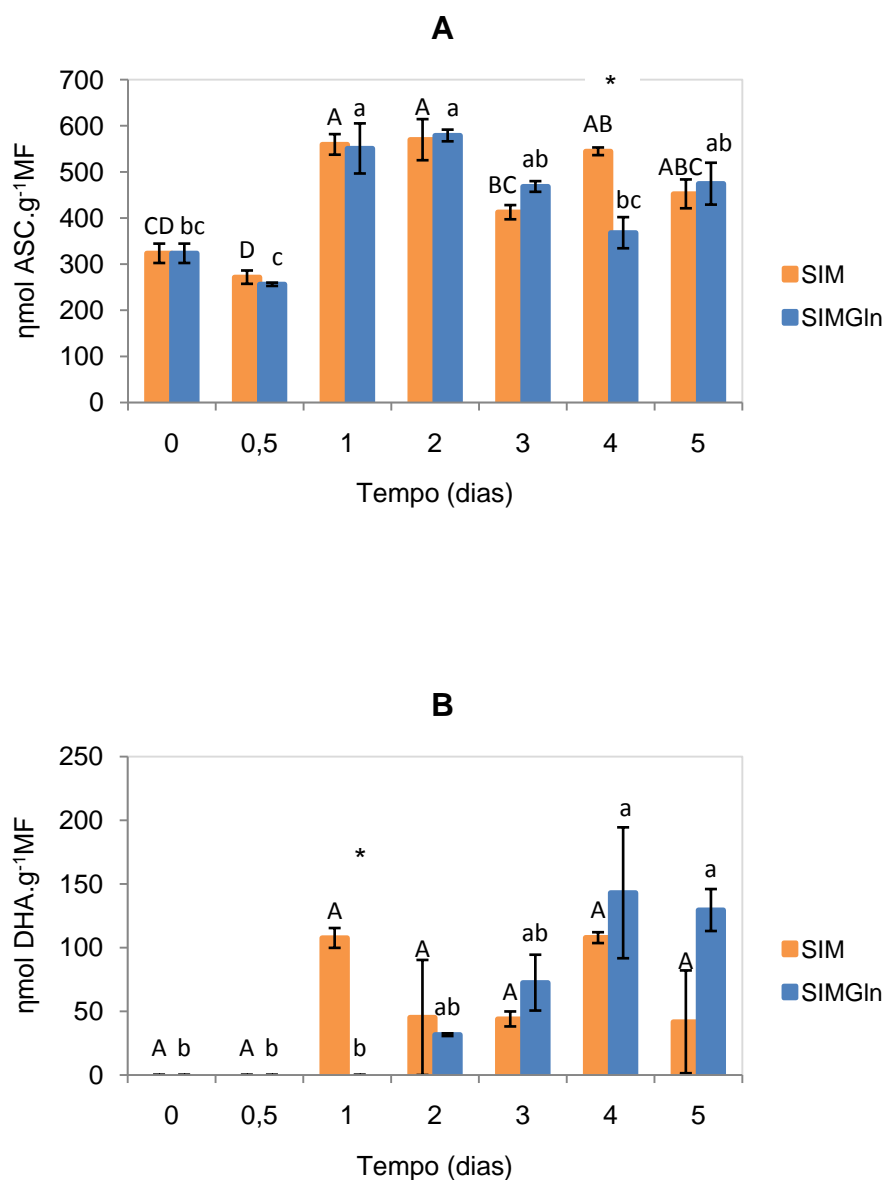


Figura 11 – Conteúdo endógeno de ASC (A) e DHA (B) dos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln). Barras indicam erro padrão (n=3).

(\*) Diferenças significativas entre tratamentos (teste t-student,  $P < 0,05$ ).

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos em um determinado tratamento (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ). Letras maiúsculas=SIM e letras minúsculas=SIMGln.

#### 4.4.3 Glutathiona Endógena

Assim como o ASC, o conteúdo endógeno de glutathiona (GSH) nos explantes foliares decresceu nas primeiras 12 horas de cultivo, tanto para os explantes cultivados em meio SIM quanto em SIMGln. Esse decréscimo correspondeu a 50% da concentração no tempo zero. A partir daí houve um aumento até o 5º dia em todos os tratamentos (Fig. 12A). No 1º e no 3º dias de cultivos os explantes cultivados em meio de cultura suplementado com glutamina apresentaram quantidades de GSH ligeiramente maiores que aqueles cultivados em meio controle.

Quanto aos resultados de GSSG (Fig. 12B), essa forma de glutathiona oxidada não foi detectada nas primeiras 12 horas tanto nos explantes cultivados em SIM quanto em SIMGln. No entanto, no 1º dia foi detectado um pico no tratamento SIM. Somente do 2º dia em diante é que houve a detecção dessa forma oxidada nos explantes cultivados em SIMGln. Estatisticamente não houve diferenças de concentração entre os valores obtidos em SIM e SIMGln, à exceção do 1º dia de cultivo.



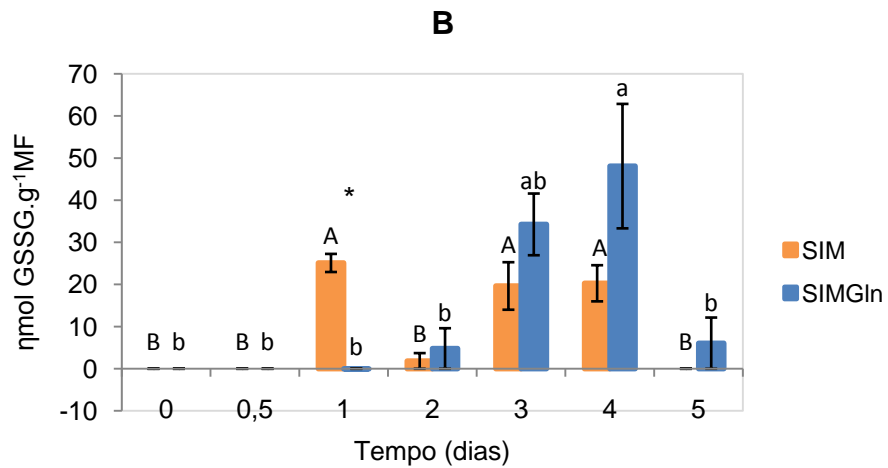
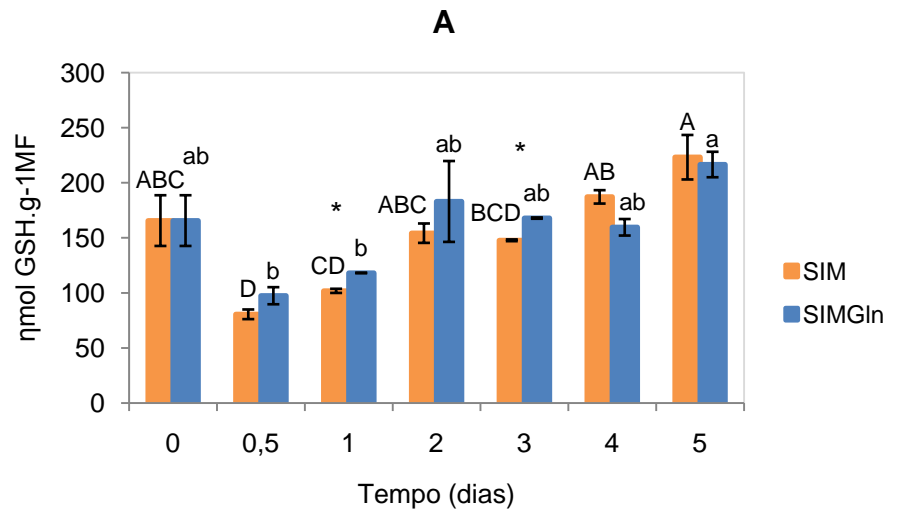


Figura 12 – Conteúdo endógeno de GSH e GSSG dos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln). Barras indicam erro padrão (n=3).

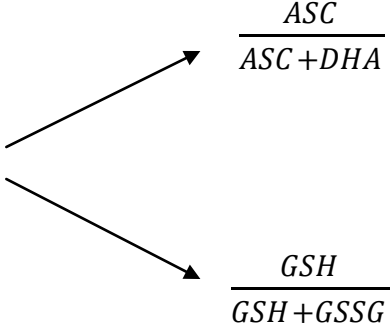
(\*) Diferenças significativas entre tratamentos (teste t-student,  $P < 0,05$ ).

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos em um determinado tratamento (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ). Letras maiúsculas=SIM e letras minúsculas=SIMGln.

#### 4.5 Estado Redox

Ainda que as quantidades endógenas de ascorbato e glutathiona sejam importantes *per se*, faz-se necessária a análise da relação entre suas formas reduzidas e oxidadas conhecendo-se, assim, qual seria o balanço desses antioxidantes no tecido vegetal em determinada condição ambiental e num determinado tempo.

Neste trabalho optou-se por determinar o estado redox dos explantes foliares durante o período de indução da organogênese adventícia, calculando-se a razão entre as formas reduzidas de ASC ou GSH e a somatória das formas reduzidas e oxidadas (total de ascorbato ou glutathiona):

$$\text{estado redox} = \frac{\text{forma reduzida}}{(\text{reduzida} + \text{oxidada})}$$


The diagram shows the general formula for redox state on the left. Two arrows branch out from the right side of the formula to two specific ratios. The upper arrow points to the ratio  $\frac{ASC}{ASC + DHA}$ . The lower arrow points to the ratio  $\frac{GSH}{GSH + GSSG}$ .

Os resultados obtidos para o estado redox, expressos em porcentagem, para ascorbato e glutathiona estão representados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Quanto ao estado redox do ascorbato (Tabela 2), o cultivo por um dia em meio SIM oxidou significativamente o *pool* de ASC, enquanto que em meio SIMGln 100% do *pool* de ASC estava na forma reduzida. Para os explantes cultivados em SIMGln, o estado redox somente diminuiu a partir do 2º dia.

Quanto ao estado redox da glutathiona (Tabela 3), também se notou que no 1º dia de cultivo em SIM aumentou significativamente a forma oxidada, enquanto que para o meio SIMGln esse mesmo comportamento só foi observado a partir do 3º dia de cultivo. No entanto, no 5º dia para ambos os tratamentos o estado redox voltou a ter 100% de GSH.

*Tabela 2 – Estado redox do ascorbato (ASC/ASC+DHA) nos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln).*

*(\*) Diferenças significativas entre tratamentos (teste t-student,  $P < 0,05$ ).*

<b>Estado Redox (%)</b>		
<b>Tempo (dias)</b>	<b>SIM</b>	<b>SIMGln</b>
0	100	100
0.5	100	100
1*	83.9	100
2	94.1	94.8
3	90.4	86.6
4	83.5	72.0
5	91.6	78.6

*Tabela 3 – Estado redox da glutatona (GSH/GSH+GSSG) nos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln).*

*(\*) Diferenças significativas entre tratamentos (teste t-student,  $P < 0,05$ ).*

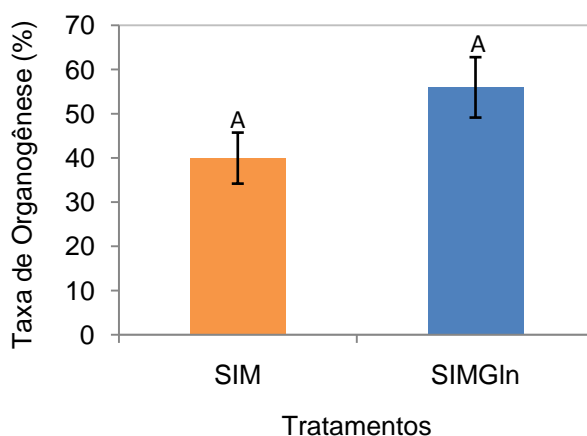
<b>Estado Redox (%)</b>		
<b>Tempo (dias)</b>	<b>SIM</b>	<b>SIMGln</b>
0	100	100
0.5	100	100
1*	80.2	100
2	100	100
3	88.3	83.1
4	90.2	76.8
5	100	100

## 4.6 Atividades Enzimáticas

### 4.6.1 Acompanhamento da Taxa de Organogênese

O acompanhamento da taxa de organogênese foi realizado para o material que forneceu os explantes para as dosagens de atividade enzimática (Fig. 13).

Cerca de 56% das bases foliares cultivadas em meio SIMGln apresentaram formação de eixos caulinares adventícios após 30 dias de incubação. Em contrapartida, somente 40% dos explantes cultivados no meio controle (SIM) formaram eixos caulinares via organogênese adventícia. Entretanto, essa diferença não foi significativa.



*Figura 13 – Taxa de organogênese em explantes foliares de abacaxizeiro cultivados por 30 dias em meio SIM ou SIMGln. Barras indicam desvio padrão (n=15).*

*Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste t-student,  $P < 0,05$ ).*

#### 4.6.2 Superóxido Dismutase

Ao longo do período de indução da organogênese dos eixos caulinares em bases foliares de abacaxizeiro, a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) não apresentou grandes variações (Fig. 14). Nas primeiras 12 horas de cultivo não houve alteração, no entanto a atividade decresceu no 1º dia, voltando a aumentar somente ao final do período de indução, ou seja, no 5º dia de cultivo. Entretanto, nos explantes cultivados em SIM essas mudanças não foram significativas, enquanto naqueles cultivados em SIMGln apenas no 5º dia houve aumento significativo da atividade da SOD. Com exceção do 3º dia, os explantes não apresentaram diferenças quanto à atividade da SOD quando cultivados em SIM ou SIMGln.

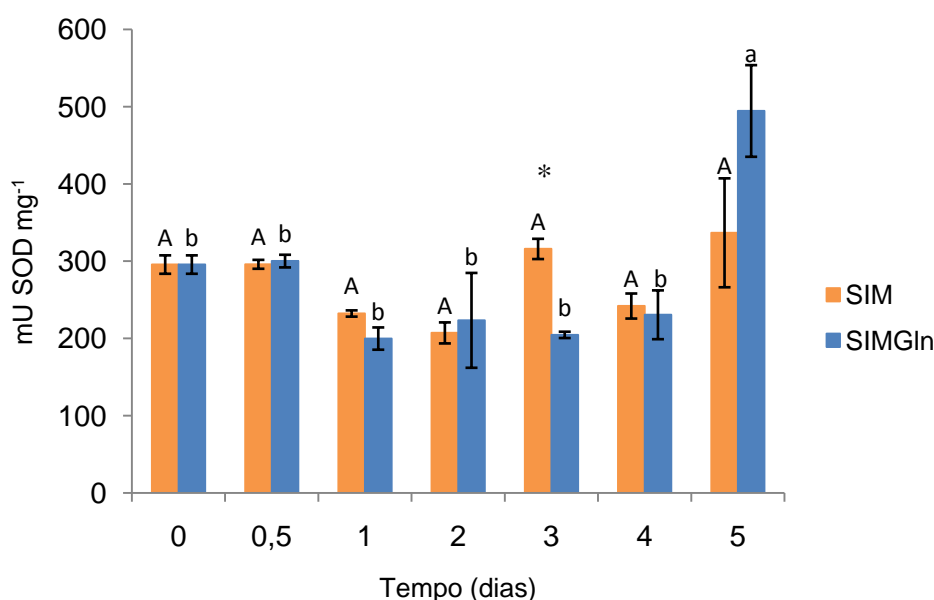


Figura 14 – Atividade enzimática da SOD nos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln). Barras indicam erro padrão (n=3).

(\*) Diferenças significativas entre tratamentos (teste t-student,  $P < 0,05$ ).

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos em um determinado tratamento (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ). Letras maiúsculas=SIM e letras minúsculas=SIMGln.

### 4.6.3 Catalase

No momento em que as bases foliares foram isoladas da planta-mãe a atividade da enzima catalase estava reduzida comparativamente aos demais tempos de cultivo (Fig. 15). No entanto, já a partir das 12 primeiras horas de cultivo, sua atividade começou a aumentar gradativamente até o 5º dia, atingindo cerca de três vezes o valor inicial. Esse padrão de resposta foi observado tanto em explantes cultivados em SIM quanto em SIMGln, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois tratamentos.

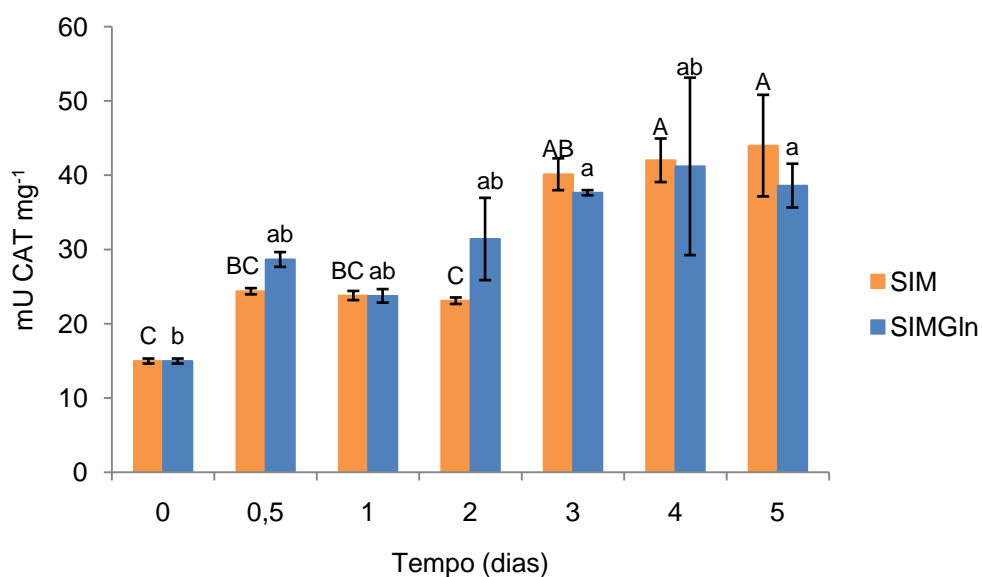


Figura 15 – Atividade enzimática da CAT nos explantes cultivados por até 5 dias em meio de indução de eixos caulinares (SIM) ou em SIM adicionado de 8mM de glutamina (SIMGln). Barras indicam erro padrão (n=3).

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes entre os tempos em um determinado tratamento (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ). Letras maiúsculas=SIM e letras minúsculas=SIMGln.

## 5. DISCUSSÃO

A organogênese em cultura de tecidos tem fornecido modelos bastante úteis aos estudos dos mecanismos regulatórios do desenvolvimento das plantas (Hicks, 1994). No caso de bromélias, o cultivo *in vitro* é utilizado como ferramenta nos estudos de características fisiológicas como nutrição, produção endógena de hormônios e outros aspectos do desenvolvimento desse grupo de plantas (Mercier & Kerbauy, 1997).

Especificamente em abacaxizeiro, estudos têm sido feitos com a finalidade de compreender os mecanismos envolvidos com a organogênese adventícia que ocorre nas bases foliares dessa espécie. Trata-se de um processo direto, sem formação de calo, o que torna o sistema interessante para os estudos dos eventos fisiológicos e bioquímicos associados com a formação de gemas caulinares *in vitro* (Mercier & Kerbauy, 1997).

### 5.1 Teste de Explantação

A organogênese *in vitro* consiste de vários aspectos, dentre os quais a percepção de fitormônios, a aquisição de competência organogenética e a organização da divisão celular para formar primórdios e meristemas de órgãos específicos (Sugiyama, 1999). Quando esses órgãos se originam a partir de tecidos já diferenciados, normalmente folhas, caules ou raízes, convencionou-se chamar esse evento de organogênese adventícia (Kerstetter & Hake, 1997).

Acredita-se que qualquer célula viva ou grupos de células na planta tem potencial para formar um meristema, na presença de condições e sinais apropriados (Kerstetter & Hake, 1997). Segmentos nodais de abacaxizeiro são capazes de formar novas plantas quando cultivados em meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento (Souza *et al.*, 2003). Entretanto, explantes foliares dessa mesma espécie

necessitam ser cultivados em meio de indução de eixos caulinares para que as células da base das folhas sejam capazes de se tornar competentes e se diferenciar, dando origem a novos eixos caulinares (Mercier *et al.*, 2003; Hamasaki *et al.*, 2005).

De acordo com Hamasaki *et al.* (2005), se o meio de indução de eixos caulinares for ainda suplementado com o aminoácido glutamina, o potencial de organogênese dos explantes foliares aumenta em cerca de 30%.

Os resultados do teste de explantação das bases foliares de abacaxizeiro mostraram que a ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura não resultou em organogênese nos explantes. Ao contrário, quando cultivados em meio contendo determinadas concentrações de auxina e citocinina, os explantes apresentaram formação de eixos caulinares. O meio indutor suplementado com glutamina induziu um aumento de 20% na capacidade de organogênese (Fig. 4).

Se nos explantes foliares retirados das plantas-mãe houvesse resquícios do tecido do primórdio de gema lateral, provavelmente haveria regeneração de eixos caulinares, mesmo na ausência dos reguladores de crescimento, o que não ocorreu. Portanto, concluiu-se que a explantação foi realizada adequadamente, isto é, não houve presença de células pertencentes ao primórdio de gema axilar.

Assim, esses testes preliminares corroboraram os resultados de regeneração já obtidos por Mercier *et al.* (2003) e Hamasaki *et al.* (2005), garantindo a confiabilidade da maneira de execução.

## **5.2 Influência da suplementação de glutamina ou glutatona ao SIM**

Compostos nitrogenados são considerados limitantes ao crescimento e desenvolvimento vegetal, além de estarem relacionados com a morfogênese (Kamada & Harada, 1979; 1984; Tang & Guo, 2001). Meios de cultura têm sido suplementados



freqüentemente com aminoácidos ou proteínas hidrolisadas a fim de promover o crescimento do explante (Gamborg, 1970). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais os aminoácidos atuam no processo organogênético *in vitro*.

A glutamina é comumente empregada como fonte de nitrogênio orgânico em meios de cultura de tecido de plantas superiores (Franklin & Dixon, 1994), sendo que vários pesquisadores demonstraram o envolvimento benéfico da suplementação do meio de cultura com esse aminoácido. Entretanto, poucas são as hipóteses de como esse aminoácido agiria.

O nitrogênio originado de aminoácidos é assimilado rapidamente em esqueletos carbônicos durante o metabolismo e síntese de proteínas, quando comparado a outras fontes inorgânicas de nitrogênio (Lea, 1993). O envolvimento de aminoácidos também já foi relacionado com a regulação hormonal durante eventos de organogênese. Milazzo *et al.* (1998) demonstraram que a prolina estimulou a organogênese em *Cucumis melo* pela modificação do metabolismo de citocininas endógenas e biossíntese de auxina. Kamada & Harada (1979) sugeriram que o balanço hormonal em explantes de *Torenia fournieri* foi alterado pela aplicação exógena de aminoácidos, resultando na estimulação ou inibição da organogênese. Sendo assim, os aminoácidos agiriam por meio de vias metabólicas primárias em vários aspectos do ciclo de vida das plantas, controlando direta ou indiretamente o crescimento e desenvolvimento vegetal (Joy IV *et al.*, 1994; Coruzzi & Last, 2000). Além dos aminoácidos, o enxofre é um nutriente inorgânico indispensável para as plantas terrestres (Nikiforova *et al.*, 2006). Sua disponibilidade não só influencia a biossíntese de metabólitos que contêm enxofre, mas também outros processos fisiológicos em plantas.

No presente estudo, bases foliares de abacaxizeiro foram inoculadas em meio indutor de eixos caulinares suplementado com glutamina, um aminoácido essencial e/ou glutatona, um antioxidante não enzimático considerado um “reservatório” de enxofre

reduzido não-protéico (Noctor *et al.*, 2002). A glutatona pareceu poder substituir o efeito positivo da glutamina, quando adicionada ao meio indutor na ausência desse aminoácido, enquanto a adição de glutatona ao meio de cultura contendo glutamina não intensificou o efeito do aminoácido sobre a taxa de organogênese dos explantes foliares.

Hamasaki *et al.* observaram que a organogênese adventícia em folhas de abacaxizeiro foi muito estimulada na presença de glutamina no meio de cultura, passando de 40% para 70%. Foi visto também que as concentrações endógenas de isopenteniladenina (iP - citocinina) e do ácido indolilacético (AIA - auxina) foram muito superiores em relação aos explantes cultivados na ausência de glutamina.

Após 60 dias, os explantes cultivados com a mais alta concentração de glutatona (5 mM) apresentaram um número maior de eixos caulinares por explante e com maior vigor do que aqueles cultivados somente com glutamina. Essa resposta não se intensificou quando o aminoácido e o antioxidante foram adicionados conjuntamente no meio de cultura, sugerindo que o componente determinante nesse aumento de eixos caulinares por explante foi a glutatona. No entanto, a concentração de 1 mM de glutatona causou uma certa inibição da proliferação de gemas adventícias (Tabela 1).

Em relação ao desenvolvimento dos eixos caulinares formados, uma melhor resposta em termos de massa fresca e seca e de vigor foi observada nos eixos originados a partir dos explantes cultivados com alta concentração de glutatona (5 mM) associada à glutamina. O cultivo em meio contendo somente glutamina (controle – SIMGIn) também proporcionou um bom desenvolvimento das gemas adventícias, enquanto nos tratamentos onde houve suplementação somente de glutatona, o desenvolvimento dos novos eixos caulinares foi inferior (Figs. 6 e 7).

Vasudevan *et al.* (2004) mostraram que o tratamento com glutamina induziu um maior crescimento de explantes (ápice caulinar) e maior número de brotos por explante de pepino (*Cucumis sativus*), em relação aos explantes cultivados com outras

fontes de nitrogênio. Segundo Gamborg (1970), o aumento da taxa de crescimento de células em suspensão de *Glicine max* (soja), pela adição de glutamina ao meio, poderia ser explicado pelo fato de que esse aminoácido proporcionou uma fonte de nitrogênio prontamente disponível.

Em *Pinus strobus* L., a organogênese adventícia direta de eixos caulinares foi observada em cotilédones de embriões cultivados na presença de thidiazuron (TDZ), sendo que a frequência de regeneração e o número de eixos caulinares por embrião aumentaram quando o meio de cultura foi suplementado com 500-700 mg.L<sup>-1</sup> de glutamina (Tang & Newton, 2005). Dentre várias fontes de nitrogênio, a glutamina foi a melhor para a produção de eixos caulinares de *Beta vulgaris* L., a partir do cultivo de discos foliares (Tsai & Saunders, 1999).

São poucos os trabalhos que relatam a aplicação de antioxidantes no meio de cultura com o objetivo de entender como eles agiriam em relação a eventos morfogenéticos. Gupta & Datta (2003) observaram um aumento da frequência de organogênese e de eixos caulinares por cultura responsiva quando calos de *Gladiolus hybridus* foram cultivados em meio contendo antioxidantes, particularmente glutathione na concentração de 0,5 mM. Entretanto, o emprego de concentrações maiores mostrou-se inibitório.

Sugere-se, no caso do abacaxizeiro, que o aminoácido glutamina tenha um efeito promotor sobre o desenvolvimento das gemas adventícias, pois os explantes suplementados apenas com glutathione apresentaram desenvolvimento inferior, quando comparados os acúmulos de massa fresca ou seca. No entanto, em meio de cultura suplementado com glutamina e adicionado de glutathione (5 mM), o crescimento desses eixos foi estimulado, além de apresentarem um maior vigor, em relação àqueles que apenas receberam uma das fontes de nitrogênio. A princípio, o meio de cultura utilizado já possuía nitrogênio em abundância para suportar o crescimento e o desenvolvimento

inicial dos eixos caulinares de abacaxizeiro, portanto a adição de Gln e GSH não deveria fazer diferença em termos nutricionais. Acredita-se que esses compostos orgânicos tenham outros papéis importantes, além do nutricional, estabelecendo condições para uma reprogramação com vistas à organogênese.

### 5.3 Teores endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro implica em submeter o tecido foliar a uma perturbação mecânica (explantação) e posterior exposição aos reguladores de crescimento e aos sais minerais componentes do meio de cultura. O balanço entre as reações oxidativas essenciais ao desenvolvimento e as danosas é influenciado pelo *status* fisiológico dos tecidos e fatores exógenos como estresse, doença ou ferimento e a aplicação de reguladores de crescimento. A introdução e proliferação de plantas ou suas partes *in vitro* podem alterar o metabolismo oxidativo e predispor tecidos aos efeitos danosos das ROS (Obert *et al.*, 2005).

Há controvérsias na literatura sobre os possíveis papéis que o peróxido de hidrogênio exerceria sobre a morfogênese em diferentes espécies (Cui *et al.*, 1999; Gupta & Datta, 2003; Tian *et al.*, 2003). Gupta & Datta (2003) observaram que a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao meio de cultura inibiu fortemente a organogênese caulinar de *Gladiolus hybridus*. Esses autores sugeriram que o seqüestro de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultante do aumento da atividade das enzimas SOD e CAT, induziu a morfogênese caulinar da espécie estudada.

Ao contrário, a diferenciação de células embriogênicas de *Lycium barbarum* foi afetada positivamente por altos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular, sugerindo que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno atuaria como mensageiro celular capaz de induzir a expressão gênica e síntese protéica (Cui *et al.*, 1999). Tian *et al.* (2003) investigaram a liberação de radicais peróxidos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a atividade de enzimas antioxidantes durante a organogênese de calos de morango. Os resultados dessa pesquisa sugeriram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziu o processo

morfogenético, atuando como um sinalizador no processo de formação de primórdios de gemas.

Relativamente pouco se sabe sobre o modo de ação da rede regulatória de ROS, seus papéis de proteção e regulação da sinalização que controlam o crescimento, desenvolvimento e respostas ao estresse em plantas e como elas interagem com outras moléculas sinalizadoras, incluindo fitormônios (Pasternak *et al.*, 2005). Uma proposta é que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tenha papel de mensageiro secundário na transdução de certos sinais, via sua influência sobre a expressão de alguns genes (Neill *et al.*, 2002). No entanto, sabe-se que nesses processos, o importante é que o conteúdo endógeno de ROS precisa ser regulado, através de um *feedback* entre a produção e a percepção de ROS (Mittler *et al.*, 2004).

Em abacaxizeiro, a organogênese em bases foliares não foi inibida, apesar de ter havido um aumento de três vezes na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no 1º dia de cultivo (Fig. 10). Uma modificação dos teores endógenos dessa ROS durante os primeiros dias de cultivo poderia estar relacionada com uma sinalização para induzir a formação de eixos caulinares a partir dos tecidos foliares. Infelizmente, neste trabalho, não foi possível comprovar definitivamente esse efeito. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que esse aumento significativo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorrido no 1º dia de cultivo *in vitro* tenha causado uma condição estressante para os explantes logo no início do período de cultivo. No entanto, esse estresse oxidativo foi sendo superado, diminuindo e alcançando valores próximos aos encontrados nos explantes no tempo zero já no 4º dia de cultivo tanto para SIM quanto SIMGIn (Fig. 10).

#### **5.4 Determinações de Glutaciona e Ascorbato Endógenos**

Nas plantas, os antioxidantes conferem proteção contra ROS geradas metabolicamente. Sabe-se atualmente que o ascorbato e a glutaciona, além de serem

moléculas antioxidantes multifuncionais, agem também na fotossíntese, sinalização redox, defesa contra patógenos, desintoxicação de metais e xenobióticos e regulação do crescimento (Smirnoff, 2000). Para Foyer & Noctor (2005), não há dúvida de que a sinalização oxidativa seja central aos mecanismos pelos quais as células vegetais percebem o ambiente e fazem ajustes apropriados à expressão gênica, metabolismo e fisiologia.

A ativação da síntese e acúmulo de GSH são características gerais da oxidação aumentada do citossol (Foyer & Noctor, 2005). Alguns estudos com animais têm demonstrado uma influência positiva da glutamina sobre a reversão dos efeitos do estresse oxidativo e que esse aminoácido seria um precursor vital do glutamato para a síntese de glutathiona (Babu *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 1999). Em plantas, no entanto, a síntese de glutathiona parece ser controlada primariamente pela atividade da  $\gamma$ -ECS e disponibilidade de cisteína (Noctor *et al.*, 2002; Anderson, 1998).

Segundo Noctor *et al.* (1998; 2002), a proporção entre as formas reduzidas e oxidadas (GSH/GSSG) parece ser mais importante no controle da expressão gênica e atividade protéica que a quantidade absoluta de GSH, sendo que a sua proporção na forma reduzida reflete as taxas relativas de redução e oxidação, sendo sempre maiores que 0,9 sob condições não estressantes (Noctor *et al.*, 1998, 2002). Neste trabalho optou-se por avaliar o estado redox a partir da proporção entre as formas reduzidas e totais (red/total) de ambos os antioxidantes, glutathiona e ascorbato.

Os resultados mostraram que, tanto para ascorbato quanto para glutathiona, houve um aumento das formas oxidadas a partir de certo momento do cultivo sem, no entanto, variar fortemente a quantidade das formas reduzidas. De maneira geral, o estado redox de ascorbato e glutathiona apresentou valores altos ( $\geq 90\%$  - tabelas 2 e 3), indicando que as formas reduzidas desses antioxidantes estiveram presentes em quantidades elevadas em relação às formas totais presentes nos explantes foliares.

Durante a desintoxicação de ROS em cloroplastos, grandes quantidades de ascorbato e glutathione são oxidadas, alterando o balanço redox para um estado mais oxidado (Apel & Hirt, 2004). Geralmente, acredita-se que a manutenção de uma alta proporção de glutathione e ascorbato reduzidos seja essencial para o seqüestro apropriado de ROS nas células (Mittler, 2002). Pelo menos em folhas, o estado redox da glutathione é constante, mas o estresse oxidativo extremo leva à oxidação do *pool*, sendo que a oxidação, em alguns casos, é acompanhada por aumentos na glutathione total (Noctor *et al.*, 2002). O aumento da glutathione total *per se* não melhora as respostas ao estresse (Noctor *et al.*, 1998).

Uma das propostas desse trabalho foi tentar relacionar a influência do suprimento do meio de cultura com glutamina aos teores endógenos de glutathione e ascorbato e com o estado redox desses antioxidantes ao longo do período de indução da organogênese de gemas caulinares adventícias surgidas nas bases foliares de abacaxizeiro cultivado *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram que no 1º dia de cultivo houve um incremento significativo de ROS ( $H_2O_2$ ), refletindo no estado redox do tecido foliar quando se detectou um aumento significativo das formas oxidadas (DHA e GSSG) para os explantes cultivados em SIM. De modo contrário e surpreendente, os tecidos referentes ao tratamento com glutamina (SIMGln) apresentaram estado redox com 100% das formas reduzidas para esse primeiro dia de cultivo. Isso sugere que, de alguma forma, a presença da glutamina interferiu na manutenção de um estado redox considerado típico de condição não estressante. Pode-se imaginar, então, que esse aumento na concentração de  $H_2O_2$  no 1º dia possa ter sido um elemento na cadeia de sinalização da organogênese e que não afetaria diretamente o estado redox desses explantes. Já aqueles cultivados em SIM foram submetidos a um estresse oxidativo e esse fato, de alguma maneira, prejudicou a sinalização da formação de eixos caulinares. Daí decorreriam, portanto, as diferenças significativas nas taxas de formação de eixos caulinares obtidas neste trabalho (Fig. 9).

Yu *et al.* (1999) observaram em tecido hepático de ratos que a glutamina seria um precursor vital do glutamato para a síntese de glutathione. No caso do abacaxizeiro, houve pouca ou nenhuma diferença entre os tratamentos SIM e SIMGln quanto à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao longo do período de indução da organogênese adventícia. No entanto, seria possível sugerir que a glutamina fornecida ao meio de cultura também poderia estar sendo usada para a síntese de GSH endogenamente, já que o estado redox da glutathione se manteve 100% GSH por mais tempo (até o 2º dia).

Alterações ao longo do tempo nos indicadores de defesa antioxidante da planta mostram que os tecidos ou órgãos que se desenvolverão sem anomalias, recuperam o metabolismo normal após as reações de estresse; aqueles que não recuperam se tornarão anormais (Gaspar *et al.*, 2002). Uma maior regulação do estresse causado pelo cultivo *in vitro* das bases foliares de abacaxizeiro pode ter ocorrido em resposta à alta produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no 1º dia de cultivo.

## **5.5 Enzimas antioxidantes**

A capacidade das plantas de seqüestrar radicais livres freqüentemente aumenta com sua aclimatação, geralmente associada a atividades elevadas de enzimas antioxidantes (Dat *et al.*, 2000). Sob estresses abióticos, as enzimas seqüestradoras de ROS são induzidas a diminuir a concentração de quantidades tóxicas de ROS intracelulares (Apel & Hirt, 2004).

De acordo com Apel & Hirt (2004), há pelo menos três possibilidades de como as ROS atuam como sinais biológicos em plantas: a) como mensageiras secundárias, modulando a atividade de moléculas-alvo envolvidas na sinalização ou transcrição; b) como moléculas citotóxicas, alterando a expressão gênica; c) desencadeando respostas de estresse em plantas e modulando, assim, a expressão gênica de maneira indireta.



Diferenças na atividade das enzimas antioxidantes durante a organogênese e embriogênese somática em várias espécies vegetais cultivadas *in vitro* já foram relatadas (Cui *et al.*, 1999; Gupta & Datta, 2003; Tang & Newton, 2005; Konieczny *et al.*, 2008). Sugere-se que as atividades de enzimas antioxidantes estariam envolvidas na indução da formação de eixos caulinares adventícios, através do seqüestro de ROS formadas durante o processo (Tang & Newton, 2005; Gupta & Datta, 2003). Acredita-se que a resistência da planta aos efeitos do estresse seja determinada pelo nível de atividade das enzimas antioxidantes e a capacidade de aumentar rapidamente suas atividades (Polesskaya *et al.*, 2004).

Nas bases foliares de abacaxizeiro, a atividade da enzima SOD não apresentou variações significativas no período de cultivo, com exceção do 5º dia, quando houve um incremento da atividade dessa enzima nos explantes cultivados em SIMGln. Entre os tratamentos não houve diferenças significativas na maior parte dos tempos. Isso, talvez, pudesse ser explicado pelos resultados também semelhantes de organogênese (Fig. 13).

Diferentemente da SOD, a atividade da CAT aumentou gradativamente a partir do 1º dia para o tratamento SIMGln e a partir do 2º dia para SIM, sugerindo que essa enzima possa ter participado da regulação do conteúdo endógeno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos explantes, já que os teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminuíram significativamente a partir do 1º dia de cultivo (Fig. 10) em ambos os tratamentos.

De acordo com Gupta & Data (2003), o sistema de proteção oxidativa durante a organogênese de eixos caulinares difere daquele da embriogênese somática, sendo que esse último evento prefere um ambiente mais estressante. Konieczny, *et al.* (2008), sugerem que deva haver diferenças nos conteúdos endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e na atividade de algumas enzimas antioxidantes (SODs, CAT) entre os explantes de girassol que apresentaram proliferação embriogênica ou organogênica. Entretanto, esses autores

discutem que é necessário discriminar se as diferenças observadas são diretamente relacionadas com a ocorrência de diferentes programas morfogenéticos ou se são somente resultado da exposição dos explantes a diferentes condições osmóticas dos meios de cultura.

Segundo Mittler (2002), a diferença de afinidade da APX e da CAT pelo  $H_2O_2$  sugere que elas pertençam a duas diferentes classes de enzimas seqüestradoras de ROS: APX deve ser responsável pela modulação fina de ROS para a sinalização, enquanto CAT deve ser responsável pela remoção do excesso de ROS durante o estresse. É possível que, por essa razão, o conteúdo endógeno de ASC nas bases foliares de abacaxizeiro não tenha apresentado grandes alterações, não sendo esse antioxidante o responsável pelo seqüestro do  $H_2O_2$  produzido no início do período de cultivo dos explantes, mas sim a CAT, mais relacionada com a condição de estresse.

Alguns trabalhos discutem a importância da fonte nitrogenada em modular respostas das plantas ao estresse oxidativo. A aplicação de altas concentrações de nitrogênio em raízes de milho induziu um grande aumento na atividade da enzima GR, responsável pela redução de GSSG a GSH, e da enzima CAT (Medici *et al.*, 2004). A atividade de SOD, POX, APX, GR e CAT foi muito maior em folhas e raízes de plantas de trigo cultivadas com  $NH_4^+$  do que com  $NO_3^-$ , indicando que a natureza do suprimento de nitrogênio afetou a atividade de enzimas envolvidas no seqüestro de ROS (Polesskaya *et al.*, 2004). Já em ervilha e espinafre, foi demonstrado que a nutrição amoniacal exclusiva não causou estresse oxidativo nos tecidos radiculares ou na parte aérea de ambas as espécies (Domínguez-Valdivia *et al.*, 2008).

Tewari *et al.* (2007) associaram a geração de ROS com respostas antioxidantes em plantas de amora (*Morus alba* L. var. Kanva-2) deficientes em nitrogênio, fósforo ou potássio. Esses autores discutem que diferenças nos padrões das isoformas de SOD, alterações nas atividades de CAT, POX e APX e nos índices do

estado redox (ASC/ASC+DHA e GSH/GSH+GSSG) indicariam que a deficiência de N, P ou K modulou as respostas antioxidantes em diferentes proporções.

No presente trabalho, as bases foliares cultivadas em meio SIM ou SIMGln apresentaram padrões de comportamento muito semelhantes em relação às atividades das enzimas CAT e SOD. Isso, no entanto, seria justificado pela ausência de resposta diferencial quanto ao comportamento organogenético que, no caso desse experimental, atingiu taxas de formação de eixos caulinares muito parecidas entre SIM e SIMGln (Fig. 13).

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho foram verificados alguns aspectos da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro, relacionando-os a um possível estresse oxidativo, que ocorreria nos explantes em virtude do cultivo *in vitro*, e a ações da glutamina em diminuir esse estresse.

Com os resultados aqui apresentados, foi possível chegar às seguintes conclusões a respeito do evento morfogênético estudado:

1) a glutatona pareceu ser capaz de substituir a glutamina no seu efeito sobre a organogênese das bases foliares de abacaxizeiro, mas não de intensificar essa resposta. Além disso, esse antioxidante não substituiu o efeito positivo da glutamina em relação ao ganho de massas fresca e seca dos eixos caulinares de abacaxizeiro formados. No entanto, atuou favoravelmente na formação de um maior número de gemas adventícias por explante.

2) a cultura *in vitro* das bases foliares pareceu causar uma condição estressante para os explantes logo no início do período de cultivo, fato esse indicado pela alta concentração de  $H_2O_2$  detectada nas primeiras 24 horas em relação aos demais tempos. No entanto, esse possível estresse oxidativo pode ser controlado ao longo do período de cultivo. A glutamina pareceu favorecer a manutenção de um estado redox reduzido tanto de ASC quanto de GSH no período em que houve esse possível estresse oxidativo sugerindo, talvez, que o aumento na concentração de  $H_2O_2$  no 1º dia tenha participado da sinalização da organogênese nos explantes SIMGln.

3) os resultados das atividades das enzimas antioxidantes sugerem que a CAT pode ter sido responsável pela regulação do conteúdo endógeno de  $H_2O_2$ , já que a SOD não apresentou alterações expressivas ao longo do período de indução da organogênese tanto em SIM quanto em SIMGln.

Em resumo, o cultivo *in vitro* das bases foliares de abacaxizeiro pareceu

ter gerado um estresse oxidativo nesses tecidos. Entretanto, esses explantes pareceram responder rapidamente a esse estresse, retornando a uma homeostase e conferindo condição para que as células seguissem a um programa de rediferenciação e determinação à organogênese caulinar. Por outro lado, essa situação de estresse pode ter sido justamente o sinal de que os explantes precisam para que a organogênese se inicie. A glutamina teria, então, um papel de manter o estado redox dos tecidos foliares reduzido no momento da maior concentração de  $H_2O_2$  endógeno.

Como perspectivas, para que se possa ter uma visão mais completa de como o estresse oxidativo interfere no processo da organogênese em abacaxizeiro, seriam necessários estudos que procurassem analisar o comportamento de outras enzimas envolvidas no metabolismo antioxidante, como o da GR, o da APX e de outras peroxidases. Também seria interessante investigar como a suplementação do meio de cultura com peróxido de hidrogênio, antes e depois do isolamento dos explantes, interferiria na taxa de organogênese adventícia. Outra abordagem seria a investigação das relações dos componentes do estresse oxidativo com os teores de hormônios vegetais envolvidos em tal processo organogenético.

## RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento benéfico da utilização do aminoácido glutamina em meios de cultura, favorecendo a organogênese dos tecidos vegetais cultivados. Sabe-se que as fontes de nitrogênio podem influenciar na produção endógena de fitormônios, entretanto o papel exato da glutamina ainda não está bem estabelecido. Em *Ananas comosus* (L.) Merr., a adição de glutamina ao meio de cultura exerceu efeito promotor sobre a taxa de organogênese e o vigor do crescimento das gemas caulinares a partir de bases foliares. Além da glutamina, discute-se se o estresse resultante da explantação também poderia estar envolvido com a indução do processo organogenético, acarretando na produção de espécies reativas de oxigênio e na alteração do estado redox endógeno. Esse estresse para ser benéfico, entretanto, deveria estar restrito a certo limite.

O presente trabalho visou compreender o efeito favorável da glutamina na organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*. O envolvimento da glutamina com uma possível diminuição do estresse oxidativo durante o período de indução da organogênese também foi abordado. Para tanto, buscou-se correlacionar a influência do suprimento de glutamina no meio de cultura com os teores endógenos de peróxido de hidrogênio, glutatona e ascorbato. O estado redox da glutatona e do ascorbato durante o período de indução da organogênese adventícia também foi analisado. Além disso, foram analisadas as atividades de duas enzimas antioxidantes nesses explantes foliares, a superóxido dismutase e a catalase. Tentativamente, a glutatona foi adicionada ao meio de cultura, contendo ou não glutamina, visando conhecer o efeito desse antioxidante no processo organogenético.

Os resultados mostraram que a glutatona substituiu, mas não intensificou, o efeito benéfico da glutamina sobre a taxa de organogênese das bases foliares de

abacaxizeiro. Esse antioxidante não substituiu o efeito positivo do aminoácido no ganho de massas fresca e seca dos eixos caulinares formados, no entanto atuou favoravelmente na formação de um maior número de gemas adventícias por explante inoculado. Ao que parece, o cultivo *in vitro* das bases foliares gerou um estresse oxidativo nesses tecidos logo no início do período de cultivo, a julgar pela alta concentração de  $H_2O_2$  detectada nas primeiras 24 horas. Entretanto, essa possível condição estressante foi controlada ao longo do período de cultivo, retornando a uma homeostase do tecido e conferindo condição para que as células se reprogramassem para seguir a uma rota de organogênese caulinar. A glutamina pareceu favorecer a manutenção de um estado redox reduzido tanto de ASC quanto de GSH durante o período em que houve o possível estresse oxidativo. Os resultados das atividades das enzimas antioxidantes sugeriram que a CAT pode ter sido responsável pela regulação do conteúdo endógeno de  $H_2O_2$ , já que a SOD não apresentou alterações expressivas ao longo do período de indução da organogênese tanto em SIM quanto em SIMGln. Em conjunto, os resultados sugerem que o estresse oxidativo causado pelo cultivo *in vitro* pode ter gerado uma sinalização importante para que a organogênese se inicie, sendo que a glutamina exerceria um papel de manter o estado redox dos tecidos foliares reduzido no momento da maior concentração de  $H_2O_2$  endógeno.

## ABSTRACT

A positive influence of glutamine on organogenesis of *in vitro* cultured plant tissues has been demonstrated by several studies. It is well known that the endogenous synthesis of phytohormones can be influenced by nitrogen sources, although it is not completely established in which way glutamine acts in this process. The addition of this amino acid to the culture medium has enhanced the organogenesis rate and resulted in a better vigor of the shoots that were originated from the leaf bases of *Ananas comosus* (L.) Merr. cultured in *in vitro* conditions. It is also suggested that the tissue excision may result in a stressful condition by increasing the production of reactive oxygen species and changing the endogenous redox state, which might be involved in the induction of organogenic process. However, this stress should be beneficial only if restricted.

The aim of this work was to comprehend the positive influence of glutamine on the *in vitro* adventitious organogenesis of pineapple leaf bases. It was also attempted to determine whether the glutamine would be involved on a possible oxidative stress decrease during the organogenesis induction. In order to answer these questions, we tried to correlate the presence of glutamine in the culture medium and the endogenous hydrogen peroxide, glutathione, ascorbate levels. The redox state of these antioxidants is also analyzed during the induction of adventitious shoot organogenesis. Moreover, two antioxidants enzymes activities are quantified in the leaf explants: catalase and superoxide dismutase. The glutathione influence on the process was also investigated, considering the glutamine presence or not. It was done in order to establish the effect of this antioxidant in the organogenic process.

The results showed that glutathione could replace, but not enhance, the positive effect of glutamine on the organogenesis rate of pineapple leaf bases. This antioxidant did not substitute the positive effect presented by the glutamine on the



acquisition of fresh and dry masses by the new shoots. On the other hand, glutathione enhanced the number of adventitious buds per explant. Apparently, the excision of the leaf bases and its subsequent cultivation in the induction culture medium resulted in the tissue oxidative stress early in the first 24 hours of incubation. This could be inferred by the high  $H_2O_2$  concentrations detected during this period. However, this possible stressful condition was controlled during the culture period, leading to the return of the homeostasis of the tissue and allowing the cells to become determined to shoot organogenesis. During the probable period of oxidative stress, glutamine seemed to maintain the reduced redox state on both ASC and GSH. The results of the antioxidant enzymes activities suggested that CAT may have been responsible for the regulation of the endogenous  $H_2O_2$  levels, while SOD did not showed significant changes during the induction of organogenesis of leaf bases cultivated either in SIM or SIMGIn. Taken together, the results obtained in this work suggest that the oxidative stress caused by the excision of the leaf tissues and its *in vitro* cultivation may be an important signal to the induction of the leaf organogenesis. Furthermore, the glutamine may have a role in the maintenance of the reduced redox state when higher levels of endogenous  $H_2O_2$  are present in the tissues.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. (1984). Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-130.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N. & HEATH, L.S. (2002). Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341.
- ANDERSON, M.E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 111-112, p. 1-14.
- APEL, K. & HIRT, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review in Plant Biology**, v. 53, p. 373-399.
- BABU, R. *et al.* (2001). Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 36, p. 282-286.
- BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, V. 44, p. 276-287.
- BOWLER, C.; Van MONTAGU, M. & INZÉ, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 83-116.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254.
- BRAY, E.A.; BAIEY-SERRES, J. & WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B.; Gruissem, W. & Jones, R. (eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000, p. 1158-1203.
- CARNEIRO, L.A. (1997). Controle da morfogênese *in vitro* de três espécies de bromélias do sudeste brasileiro. Tese (Doutorado). 87p. ESALQ-USP. Piracicaba.
- CHRISTIANSON, M.L. & WARNICK, D.A. (1985). Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. **Developmental Biology**, v. 112, p. 494-497.
- COBBETT, C.S. *et al.* (1998). The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. **The Plant Journal**, v. 16, p. 73-78.
- CORUZZI, G. & LAST, R. Amino acids. In: Buchanan, B.; Gruissem, W. & Jones, R. (eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000, p. 358-410.
- CUI, K. *et al.* (1999). Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Science**, v.146, p.9-16.
- DAT, J. *et al.* (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 57, p. 779-795.

DIETZ, K-J. & SCHEIBE, R. (2004). Redox regulation: an introduction. **Physiologia Plantarum**, v.120, p.1-3.

DLUZNIEWSKA, P. *et al.* (2006). Exogenous supply of glutamine and active cytokinin to the roots reduces NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake rates in poplar. **Plant Cell Environment**, v. 29, p. 1284-1297.

DOMÍNGUEZ-VALDIVIA, M.D. *et al.* (2008). Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and -sensitive plants. **Physiologia Plantarum**, v. 132, p. 359-369.

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

FOYER, C.H. & NOCTOR, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, p. 1056-1071.

FRANKLIN, C.I. & DIXON, R.A. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: Dixon, R.A. & Gonzales, R.A. (eds.) **Plant Cell Culture – A practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1994, p. 1-25.

GAMBORG, O.L. (1970). The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, v. 45, p. 372-375.

GASPAR, T. *et al.* (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 263-285.

GREEN, P.B. (1980). Organogenesis – a biophysical view. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 51-82.

GUPTA, S.D. & DATTA, S. (2003). Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 179-183.

HAMASAKI, R.M. (2003). Indução da organogênese adventícia em tecido foliar de *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae) cultivado *in vitro*: importância da glutamina e de fitormônios. Dissertação (Mestrado). 96 p., IB-USP, São Paulo.

HAMASAKI, R.M.; PURGATTO, E. & MERCIER, H. (2005). Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 273-281.

HICKS, G.S. (1994). Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. **In Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant**, v. 30, p. 10-15.

HOREMANS, N. *et al.* (2000). Ascorbate function and associated transport systems in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 531-540.

HUNG, S-H.; YU, C-W & LIN, C.H. (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.46, p. 1-10.

INZÉ, D. & Van MONTAGU, M. (1995). Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158.

JOY IV, R.W.; BENDER, L. & THORPE, T.A. (1994). Nitrogen metabolism in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata* during de novo organogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 681-688.

KAIRONG, C. *et al.* (1999). Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Science**, v.146, p.9-16.

KAMADA, H. & HARADA, H. (1979). Influence of several growth regulators and amino acids on *in vitro* organogenesis of *Torenia fournieri* Lind. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, p. 27-36.

\_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_. (1984). Changes in endogenous amino acid composition during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. **Plant and Cell Physiology**, v. 25, p. 27-38.

KANMEGNE, G. & OMOKOLO, N.D. (2003). Changes in phenol content and peroxidase activity during *in vitro* organogenesis in *Xanthosoma sagittifolium* L. **Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 53-57.

KERSTETTER, R.A. & HAKE, S. (1997). Shoot meristem formation in vegetative development. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1001-1010.

KITAKAWA, A.Y. (2004). Quantificação de aminoácidos livres endógenos durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro. Dissertação (Mestrado). 90 p., IB-USP, São Paulo.

KNUDSON, I. (1946). A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217.

KONIECZNY, R. *et al.* (2008). Oxidative events during *in vitro* regeneration of sunflower. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 71-79.

LARCHER, W. **Physiological Plant Ecology**. Springer Verlag, New York, 1980.

LEA, P.J. Nitrogen metabolism. In: Lea, P.J. & Leegood, R.C. (eds.) **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. John Wiley & Sons Ltd., 1993, p. 155-180.

MAHALINGAM, R. & FEDOROFF, N. (2003). Stress response, cell death and signaling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.56-68.

MAY, M.J. *et al.* (1998). Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.649-667.

McCORD, J.M., FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055.

MEDICI, L.O. *et al.* (2004). The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, v. 31, p. 1-9.

MERCIER, H. & KERBAUY, G.B. Micropropagation of Ornamental Bromeliads (Bromeliaceae). In: Bajaj, Y.P.S. (ed.), **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. High Tech and Micropropagation VI. Heidelberg: Springer – Verlag, 1997, v. 40, p. 43-57

\_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. (1998). Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 225-228.

MERCIER, H. *et al.* (1997). Effects of NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and ureia nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. **Plant, Cell and Environment.**, v. 20, p. 387-392.

MERCIER, H. *et al.* (2003). Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 107-112.

MITTLER, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7 p. 405-410.

MILAZZO, M.C. *et al.* (1998). Regulation of benzyladenine-induced *in vitro* shoot organogenesis and endogenous proline in melon (*Cucumis melo* L.) by exogenous proline, ornithine, and proline analogues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2402-2406.

MITTLER, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M. & Van BREUSEGEM, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 490-498.

MIZUNO, M.; KAMEI, M. & TSUCHIDA, H. (1998). Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. **IUBMB Life**, v. 44, p. 717-726.

MUNNÉ-BOSCH, S. *et al.* (2004). Airborne ethylene may alter antioxidant protection and reduce tolerance of holm oak to heat and drought stress. **Plant Physiology**, v.136, p.2937-2947.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497.

NEILL, S.; DESIKAN, R. & HANCOCK, J. (2002). Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 388-395.

NEILL, S.J. *et al.* (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1237-1247.

NIKIFOROVA, V.J. *et al.* (2006). Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. **Amino Acids**, v. 30, p. 173-183.

NILSEN, E. & ORCUTT, D.M. **The Physiology of Plants Under Stress – Abiotic factors**. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1996.

NOCTOR, G. *et al.* (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.623-647.

NOCTOR, G. & FOYER, C.H. (1998). Simultaneous measurement of foliar glutathione,  $\gamma$ -glutamylcysteyne, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. **Analytical Biochemistry**, v. 264, p.98-110.

NOCTOR, G. *et al.* (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1283-1304.

OBERT, B. *et al.* (2005). Moderation on morphogenetic and oxidative stress responses in flax in vitro cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 537-547.

OGITA, S. *et al.* (2001). The effects of glutamine on the maintenance of embryogenic cultures of *Cryptomeria japonica*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant**, v. 37, p. 268-273.

PASTERNAK, T.P. *et al.* (2002). 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.

PASTERNAK, T.P. *et al.* (2005). Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ and cellular level. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.1991-2001.

POLESSKAYA, O.G.; KASHIRINA, E.I. & ALEKHINA, N.D. (2004) Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, p. 615-620.

POTTERS, G. (2002). The role of ascorbate in the regulation of cell cycle and cellular redox status in a *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2 cell culture. Tese (Doutorado). 164 p., Departement Biologie, Faculteit Wetenschappen, Universiteit Antwerpen (Antuérpia, Bélgica).

POTTERS,G. *et al.* (2000). Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in tobacco cell suspension. **Plant Physiology**, v.124, p. 17-20.

POTTERS, G. *et al.* (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.537-548.

POTTERS, G. *et al.* (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 98-105.

RAO, K.V. *et al.* (2005). Induction of multiple shoots from leaf segments, in vitro-flowering and fruiting of a dwarf tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 959-962.

SEN, J; KALIA, S. & GUHA-MUKERJEE, S. (2002). Level of endogenous free amino acids during various stages of culture of *Vigna mungo* (L.) Hepper – somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. **Current Science**, v. 82, p. 429-433.

SHETTY, K.; ASANO, Y. & OOSAWA, K. (1992). Stimulation of in vitro shoot organogenesis in *Glycine max* (Merrill.) by allantoin and amides). **Plant Science**, v. 81, p. 245-251.

SMIRNOFF, N. (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals of Botany**, v.78, p.661-669.

SMIRNOFF, N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 229-235.

SOUZA, B.M. *et al.* (2003). Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 733–739.

SRIPAORAYA, S. *et al.* (2003). Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant**, v. 39, p. 450-454.

SUGIYAMA, M. (1999). Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 61–64.

TANG, W. & GUO, Z. (2001). In vitro propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. **Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 25-31.

TANG, W. & NEWTON, R.J. (2005) Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobes* L.) zygotic embryos. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 760-769.

TANIMOTO, S. & HARADA, H. (1989). Involvement of the accumulation of glutamine in the initiation of adventitious buds in stem segments of *Torenia*. **Plant and Cell Physiology**, v. 30, p. 541-547.

TEWARI, R.K.; KUMAR, P. & SHARMA, P.N. (2007). Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 313-322.

TIAN, M.; GU, Q. & ZHU, M. (2003). The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. **Plant Science**, v.165, p.701-707.

TSAI, C-J. & SAUNDERS, J.W. (1999). Evaluation of sole nitrogen sources for shoot and leaf disc cultures of sugarbeet. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p. 47-56.

VALDÉS, A.E. *et al.* (2001). Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 377-384.

Van GESTELEN *et al.* (1998). The cantharidin-induced oxidative burst in tobacco BY-2 cell suspension cultures. **Protoplasma**, v. 205, p. 83-92.

VASUDEVAN, A. *et al.* (2004). Glutamine: a suitable nitrogen source for enhanced shoot multiplication in *Cucumis sativus* L. **Biologia Plantarum**, v. 48, p. 125-128.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D. & VAN BREUSEGEM, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p.1227-1236.

WEIGEL, D. & DEAN, C. (2002). Development, evolution and adaptation. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p. 11-13.

WILLEKENS, H. *et al.* (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. **The EMBO Journal**, v.16, p. 4806–4816.

YU Jian-Chun, JIANG Zhu-Ming & LI De-Min (1999). Glutamine: a precursor of glutathione and its effects on liver. **World Journal of Gastroenterology**, v.5, p.143-146.