

Embriogénese somática de *Daucus carota* L.: estudo do padrão de proteínas solúveis

SARA AMÂNCIO ⁽¹⁾
HÉLIO GONÇALVES ⁽²⁾

RESUMO

A embriogénese somática é um processo morfogénico que envolve a indução, por estímulos hormonais ou ambientais, de células competentes que podem assim ficar determinadas para seguir a via embriogénica. A sucessão dos estados de desenvolvimento embrionário é acompanhada por alterações fisiológicas e bioquímicas que, quando bem caracterizadas, em particular com a utilização de marcadores, podem servir como referência para a avaliação do potencial regenerativo do material vegetal.

No presente trabalho, utilizando o sistema modelo de embriogénese somática em cenoura (*Daucus carota* L.), procuraram-se possíveis marcadores da determinação embriogénica das células, por comparação dos perfis proteicos de linhas embriogénicas e não embriogénicas de células em suspensão.

Nos padrões de electroforese estudados foram detectadas diversas bandas proteicas comuns ao perfil da linha embriogénica, ao da linha não embriogénica e aos perfis de proteína de embriões em desenvolvimento. Nestes últimos observou-se variação quantitativa na coloração de algumas bandas, provavelmente associada às fases do processo embriogénico.

No perfil proteico da cultura embriogénica, cultivada em presença de 2,4-D, foi detectada uma banda correspondente a uma proteína com um peso molecular estimado de 17,5–18 kDa. Esta banda está ausente no perfil de linhas não embriogénicas e de embriões somáticos em desenvolvimento. A expressão desta proteína mostrou ser insensível à presença de ABA. Esta proteína parece estar relacionada com o estado de determinação embriogénica na linha de células estudada.

Palavras-chave: Cenoura; *Daucus carota* L.; Determinação embriogénica; Electroforese; Embriogénese somática; Marcador; Proteína.

⁽¹⁾ Professora Associada, DBEB/CBAA, Inst. Sup. de Agronomia, Univ. Técnica de Lisboa, 1349-018 Lisboa, E-mail: samportisa.utl.pt.

⁽²⁾ Engenheiro Agrónomo, Apartado 83, 2870 Montijo.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a morphogenic event involving the induction, by environmental or hormonal stimuli, of competent cells which may become determined and embark into an embryogenic developmental pathway. Transition from one state to the other is followed by changes at the cellular, biochemical and molecular levels. This changes, when fully characterized, especially by using markers, may be utilized as standards during the evaluation of the regenerative potential of plant tissue cultures.

In this work, by using the model system of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis, it was attempted to find putative markers for the embryogenic determination of plant cells, confronting embryogenic and non embryogenic cells protein profiles. The profiles of somatic embryos were also studied.

In the electrophoretic patterns obtained most of proteins were found to be shared by the two cell lines and by somatic embryos. In the somatic embryo protein profile some proteins showed quantitative variations, which is probably connected with the different embryogenic stages.

In the protein pattern of the embryogenic cell line growing in the presence of 2,4-D, it was possible to detect a 17,5-18 kDa protein that was absent in the non embryogenic cell lines and somatic embryos. ABA was ineffective in changing this protein expression. The protein seems to be related with the embryogenic determination state in the studied cell line.

Keywords: Carrot; *Daucus carota* L.; Electrophoresis; Embryogenic determination; Marker; Protein; Somatic embryogenesis.

1. Introdução

A embriogênese somática designa o processo de formação e desenvolvimento de estruturas bipolares a partir de células somáticas que seguem uma via de desenvolvimento equivalente aos embriões zigóticos. A embriogênese somática de *Daucus carota* é o sistema modelo mais bem caracterizado, para o que terá certamente contribuído a receptividade desta espécie à cultura *in vitro* e aos tratamentos aplicados (Ammirato, 1986). Os primeiros estudos de embriogênese somática permitiram identificar as condições básicas para a sua ocorrência: presença de auxina no meio de cultura como factor essencial para a indução da embriogênese; remoção ou diminuição da concentração de auxina como factor necessário para o desenvolvimento do embrião (Halperin & Wetherell, 1964; Halperin, 1966); presença de uma fonte de azoto na forma reduzida como factor fundamental para a indução da embriogênese somática (Halperin & Wetherell, 1965; Halperin, 1966) e para a maturação do embrião (Ammirato & Steward, 1971). Nomura & Komamine (1985) isolaram células isodiamétricas e pouco vacuolizadas que, quando mantidas num meio

com auxina, se dividiam regularmente originando agregados celulares designados por massas pró-embriogénicas. Transferidas para um meio desprovido de auxina, as massas pró-embriogénicas davam origem a embriões. Durante o desenvolvimento em meio sem auxina, as células mais exteriores da massa pró-embriogénica sintetizam activamente DNA, RNA e proteínas, dividindo-se para formar embriões globulares (Fujimura *et al.*, 1980; Halperin, 1995). O crescimento bipolar dos embriões globulares marca a passagem para a fase cordiforme da embriogénese; o embrião cordiforme evolui para a fase torpedo por alongamento do eixo. Na fase seguinte, e sem paragem no crescimento, ocorre a expansão celular que conduz à formação de uma plântula. Outros reguladores de crescimento podem participar na embriogénese somática em *Daucus carota*, nomeadamente o ácido abscísico (ABA). Quando adicionado em concentrações na ordem dos 10^{-6} M a uma população de pró-embriões, o ABA inibe a iniciação e crescimento de novos centros embriogénicos, prevenindo o aparecimento de embriões secundários. Também evita a malformação de cotilédones e ápices vegetativos e, em embriões completamente formados, inibe a germinação precoce e a conversão em plantas (Ammirato, 1987, 1988).

A embriogénese somática, como processo morfogénico, está associada à expressão de genes específicos (Borkird *et al.*, 1988). Estes genes e seus produtos podem ser usados como marcadores para os diferentes tipos de células e/ou fases da embriogénese somática. Sung & Okimoto (1981, 1983) comparam padrões de proteínas de embriões somáticos e de células em crescimento desorganizado de cenoura. No início do desenvolvimento dos embriões ocorria o desaparecimento de duas proteínas e o aparecimento de duas outras, parecendo estes dois conjuntos serem regulados coordenadamente. Foi igualmente registado um aumento da síntese da proteína DC8 (66 kDa) a partir da fase globular, decrescendo o seu teor depois da fase cordiforme (Borkird *et al.*, 1988). No entanto, a aplicação de ABA permitiu induzir a acumulação da proteína DC8 em embriões somáticos (Hatzopoulos *et al.*, 1990).

A aplicação de marcadores inequivocamente associados a uma determinada fase pode contribuir para uma melhor compreensão dos factores que regulam a morfogénese, para a identificação de genótipos de potencial regenerativo superior e ainda para substituir os métodos empíricos usados na detecção da aquisição de competência para o desenvolvimento. No presente trabalho comparam-se os padrões de proteínas solúveis de uma linha embriogénica e de uma linha não embriogénica de células de cenoura, identificando-se as proteínas expressas diferencialmente em cada uma das linhas como potenciais marcadores da capacidade embriogénica das culturas. Foi igualmente estudada

a evolução do padrão de proteínas ao longo das fases do desenvolvimento do embrião somático. A influência do ABA sobre a síntese de proteínas específicas da embriogênese somática justificaram o estudo do padrão de proteínas das linhas de células embriogênicas e não embriogênicas cultivadas na presença deste regulador do crescimento.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

Utilizaram-se duas linhas de células de *Daucus carota* L. iniciadas a partir de *callus* obtidos de discos de raiz: EVA, linha que manteve características embriogênicas durante todo o período experimental e NUM, linha instalada anteriormente e que perdera as características embriogênicas.

2.2. Culturas de células

i) Meios de cultura

As suspensões de células foram mantidas em meio MS^{+D} (D, 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético); ambas as linhas foram igualmente cultivadas em meio MS^{+DA} (A, ABA, (±)-ácido abcísico); o desenvolvimento dos embriões foi iniciado por transferência de células da linha embriogênica para meio MS (Tabela 1). O pH dos meios foi ajustado a 5,8. Os meios foram autoclavados a 121 °C durante 20 min. excepto a solução de ABA que foi esterilizada por ultrafiltração.

Tabela 1
Composição dos meios de cultura

Meio MS	Meio MS ^{+D}	Meio MS ^{+DA}	Meio MS ^{+A}
macro, micronutrientes e vitaminas de Murashige e Skoog (1962) 2% sacarose	macro, micronutrientes e vitaminas de Murashige e Skoog (1962) 2% sacarose 0,38 M 2,4-D	macro, micronutrientes e vitaminas de Murashige e Skoog (1962) 2% sacarose 0,38 M 2,4-D 1 μM ABA	macro, micronutrientes e vitaminas de Murashige e Skoog (1962) 2% sacarose 1 μM ABA

ii) Condições de crescimento e sub-culturas

As culturas de células foram mantidas sob agitação constante (120 rpm), a 25 ± 1 °C e na ausência de luz, tendo-se efectuado sub-culturas semanais. Outras condições estão especificadas no texto.

2.3. Recolha de amostras

Para a realização das diferentes experiências, as suspensões de células em crescimento activo foram recolhidas por filtração sob vácuo, através de papel de filtro Whatman Nº 1. O material que constituiu as diferentes amostras foi pesado e imediatamente congelado em azoto líquido, sendo depois armazenado a -70 °C, ou seco a 80 °C até peso constante.

2.4. Avaliação qualitativa e quantitativa das culturas

i) Avaliação do crescimento

O crescimento das suspensões de células embriogénicas e não embriogénicas nos meios MS^{+D} e MS^{+DA} foi medido por determinação do peso seco, segundo o método adaptado de Mills & Lee (1996). Para preparar as suspensões de células cujo crescimento foi seguido utilizaram-se frascos erlenmeyer de 250 ml, com 70 ml de meio. Cada frasco foi inoculado com 9 ml de uma suspensão de células da linha EVA ou da linha NUM, com sete dias de cultura, em quatro repetições por cada modalidade. As determinações de peso seco iniciaram-se no dia da inoculação (dia zero) em amostras de 1 ml de cultura recolhidas em condições assépticas e repetiram-se com intervalos de dois ou três dias, até à paragem do crescimento.

ii) Evolução de uma suspensão embriogénica

Com o objectivo de acompanhar a evolução de uma cultura embriogénica inoculou-se 1 ml de uma suspensão de células da linha EVA, com sete dias de cultura, em frascos erlenmeyers de 100 ml com 25 ml de meio MS ou meio MS^{+A}. Aos dias 0, 7, 14, 22, 29 e 35 foram retiradas amostras de 1 ml e observadas sob uma lupa binocular. Os embriões presentes nesse volume foram contados discriminando as fases em que se encontravam (globular, coração, torpedo, germinativa). A experiência foi conduzida em triplicado.

2.5. Separação das fases da embriogénese somática

Para obter culturas enriquecidas em cada uma das fases da embriogénese somática, suspensões de células embriogénicas cultivadas em meio MS^{+D} durante uma semana foram transferidas para meio MS ou MS^{+A} e sub-cultivadas semanalmente. Na terceira semana de sub-cultura procedeu-se ao fraccionamento das diferentes fases embrionares por adaptação do método de Joy *et al.* (1996). Para obter amostras enriquecidas em embriões nos diferentes estádios embrionares em função das suas dimensões, utilizaram-se crivos de nylon com poros de diâmetro decrescente: 1200 μm , 540 μm , 306 μm , 204 μm e 96 μm , de acordo com o esquema da Figura 1. Para quantificar a composição de cada fracção, amostras de igual volume foram colocadas numa placa de Petri colocada sobre papel milimétrico e contadas sob a lupa binocular, em 10 repetições. Os resultados foram expressos em percentagem do número de embriões em cada fase presentes por cm^2 .

2.6. Electroforese de proteínas por SDS-PAGE

i) Preparação das amostras

Amostras congeladas e reduzidas a pó num almofariz, foram homogeneizadas com tampão de extracção contendo 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% (v/v) 2-mercaptoetanol (ME), 10% (v/v) glicerol, na proporção de 4 ml tampão / g peso fresco de amostra. O extracto filtrado através de uma camada de Miracloth foi centrifugado a 7 000 xg, 20 min., a 4 °C. A proteína total foi imediatamente doseada no sobrenadante pelo método de Bradford (1976) e em seguida procedeu-se à sua concentração por centrifugação em Centricon® (Amicon, Inc.). À solução proteica foi adicionada solução tampão concentrada, na proporção 1:1, de modo a obter a concentração final de 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% (v/v) ME, 2% (m/v) dodecilsulfato de sódio (SDS), 10% (v/v) glicerol e 0,001% (m/v) azul de bromofenol. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C durante três minutos, congeladas em azoto líquido e armazenadas a -70 °C, até posterior utilização na electroforese.

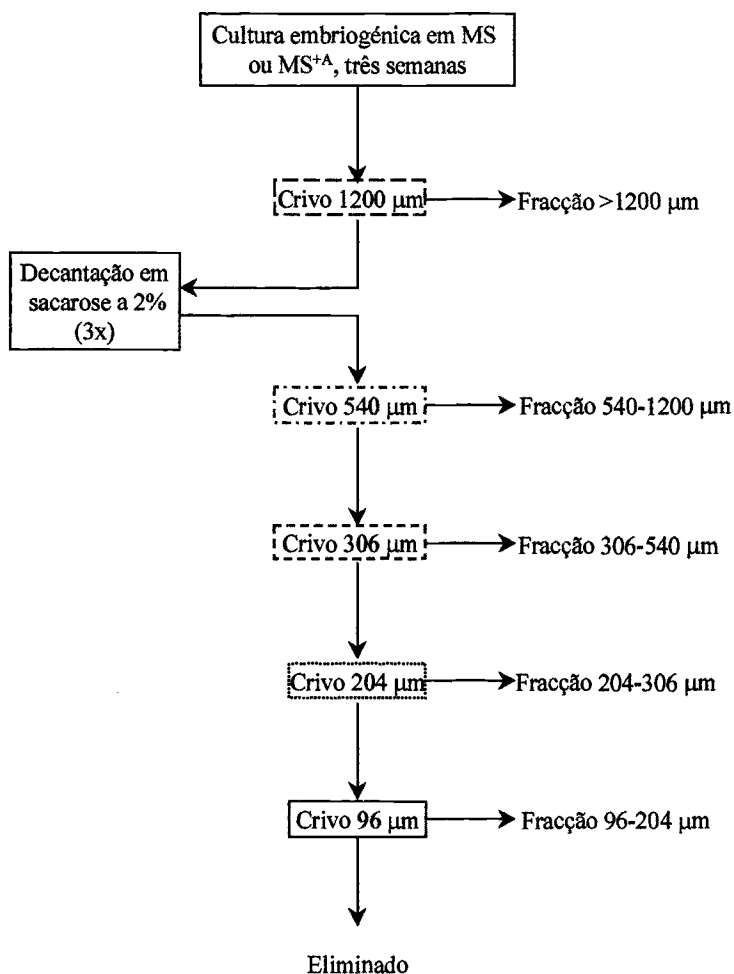
ii) Separação das proteínas e coloração

As proteínas foram separadas num sistema descontínuo de gel de poliácridamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com a técnica

descrita por Laemmli (1970). Antes de aplicadas no gel as amostras foram descongeladas e centrifugadas à temperatura ambiente a 10 000 xg, durante dois minutos. Com base no doseamento efectuado, foram aplicados cerca de 20 μ g de proteína por poço. Terminada a electroforese, as proteínas foram fixadas e coradas numa solução com 50% (v/v) metanol, 12% (v/v) ácido acético glacial e 0,1% (m/v) azul brilhante de Coomassie R-250 (CBB R-250).

Figura 1

Esquema representando a separação de fracções por crivagem de culturas embriogénicas cultivadas em meio sem auxina



iii) Cálculo da massa molecular

A massa molecular das proteínas foi determinada relativamente a proteínas marcadoras SIGMA® (MW-SDS-70L Kit) separadas em conjunto com as amostras. A curva padrão obtida por regressão polinomial mostrou um elevado grau de ajustamento ($R = 0,999$).

2.7. Tratamento estatístico dos resultados

O tratamento estatístico dos dados foi feito com base em conceitos extraídos de Dagnelie (1973). Utilizou-se o erro padrão como medida de dispersão dos dados. Na comparação de resultados, o teste de Duncan foi utilizado para averiguar a igualdade de médias.

3. Resultados

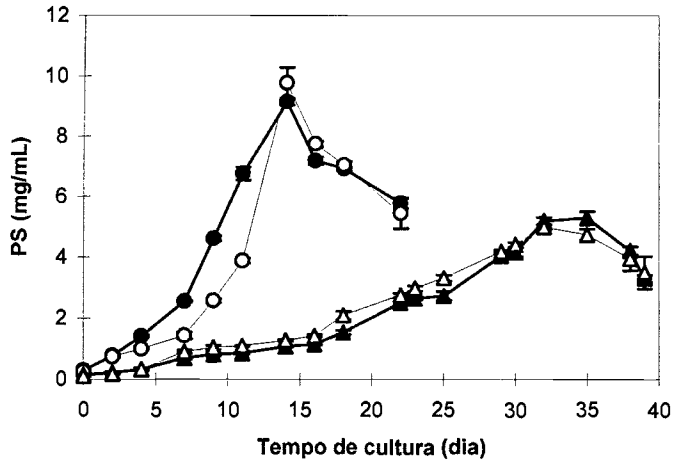
3.1. Análise de crescimento

A Figura 2 representa o crescimento das células em suspensão das linhas EVA e NUM, em meio MS^{+D} e MS^{+DA} , medido através da variação do peso seco. Em meio MS^{+D} a linha NUM apresentou um aumento rápido do crescimento, com um valor máximo aos 14 dias de cultura e decréscimo subsequente enquanto a linha EVA apresentou um período de crescimento mais prolongado, com o peso seco aumentando progressivamente até ao 32º dia de cultura, decrescendo em seguida. O valor máximo de peso seco da linha EVA, de cerca de 5 mg.ml^{-1} foi inferior ao da linha NUM que atingiu 9 mg.ml^{-1} . Quando as células foram cultivadas em meio MS^{+DA} , não se verificaram alterações significativas no padrão de crescimento de ambas as linhas.

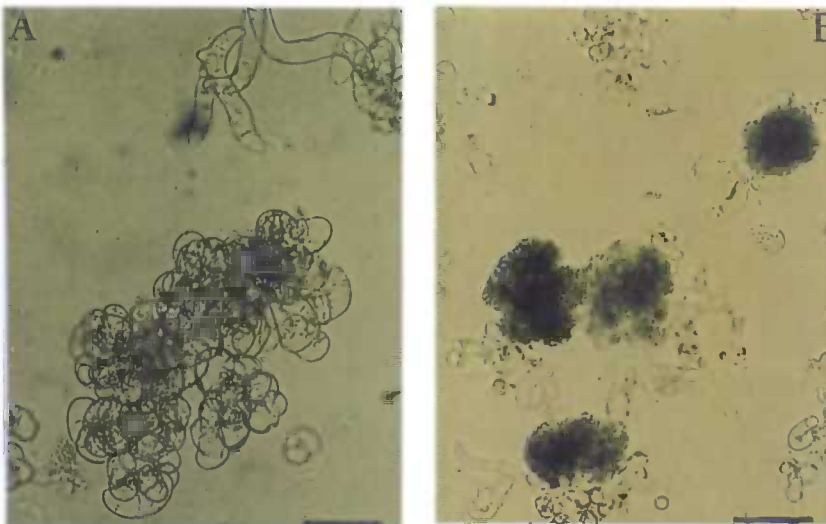
Na Figura 3 pode observar-se o aspecto ao microscópio de material *in vivo* das duas linhas de células utilizadas. As células da linha NUM apresentam-se vacuolizadas, de grandes dimensões, frequentemente em agregados. A linha EVA, apresenta-se em agregados de células pequenas e densas, as massas pró-embriogénicas.

Figura 2

Crescimento das linhas de células de *Daucus carota* em suspensão por variação do peso seco: NUM, meio MS^{+D} (●); NUM, meio MS^{+DA} (○); EVA, meio MS^{+D} (▲); EVA, meio MS^{+DA} (△). Cada ponto representa a média de três a quatro amostras \pm erro padrão da média

**Figura 3**

Observação ao microscópio de células *in vivo* da linha não embriogênica NUM (A) e da linha embriogênica EVA (B). A barra representa $100\ \mu\text{m}$



3.2. Análise qualitativa e quantitativa de uma cultura embriogénica

As modificações quantitativas e qualitativas da linha embriogénica ao longo de 35 dias de cultura foram analisadas em meio MS e MS^{+A}. Na Tabela 2 apresentam-se os resultados obtidos em meio MS: no dia zero o inóculo não apresentava qualquer forma reconhecível das fases do desenvolvimento embrionário; no 7º dia observou-se sobretudo a forma globular (95%); ao 14º dia registou-se um número elevado de embriões na fase torpedo enquanto o número de embriões globulares decresceu; com o decorrer do tempo as fases cordiforme e torpedo tornaram-se menos importantes; após o 29º dia e até ao fim da cultura os embriões em germinação passaram a constituir a fase dominante.

Tabela 2

*Evolução de uma cultura embriogénica de *Daucus carota* (linha EVA) em meio MS. Os embriões encontram-se distribuídos pelas fases características da embriogénese somática. Os valores representam a média das contagens de três amostras de 1 ml ± erro padrão. Dia, tempo de cultura após inoculação*

Dia	Globular	%	Cordiforme	%	Torpedo	%	Germinativa	%
7	213,0 ± 6,1	95,0	10,7 ± 2,3	4,8	0,3 ± 0,3	0,2	0	0
14	57,3 ± 5,4	25,4	40,7 ± 3,2	18,0	124,3 ± 2,7	55,0	3,7 ± 1,5	1,6
22	27,3 ± 4,5	12,6	24,3 ± 1,2	11,2	73,0 ± 3,5	33,6	92,7 ± 1,5	42,6
29	5,7 ± 0,9	2,7	15,7 ± 0,7	7,5	69,7 ± 3,8	33,4	117,7 ± 12,4	56,4
35	2,0 ± 0,6	1,0	12,7 ± 1,5	6,2	48,0 ± 1,5	23,3	143,0 ± 3,5	69,5

A Figura 4 apresenta a sequência das fases da embriogénese somática em meio MS.

Na Tabela 3 apresentam-se os resultados da evolução da mesma linha embriogénica em meio MS^{+A}. Ao 7º dia de cultura os embriões globulares constituíram a única fracção presente no meio; ao 14º dia, a forma globular era ainda a fase dominante, surgindo igualmente embriões cordiformes e torpedo. Com o decorrer do tempo de cultura a fracção de embriões torpedo foi enriquecendo e a acumulação de embriões nesta fase continuou até ao 35º dia, registando-se um decréscimo na fracção globular e cordiforme. A fase germinativa nunca atingiu valores significativos.

Figura 4

Seqüência das fases da embriogênese somática de *Daucus carota* (linha EVA) em meio MS.

As primeiras estruturas diferenciadas a surgir são embriões globulares (A); quando adquirem simetria bilateral a iniciação dos cotilédones dá-lhes a forma característica da fase cordiforme (B); o alongamento posterior do eixo conduz à fase torpedo (C); num processo contínuo, sem paragem de crescimento, as células do embrião iniciam a expansão e este entra na fase germinativa (D).

A barra representa 100 μm em (A), (B), (C) e 1 mm em (D)

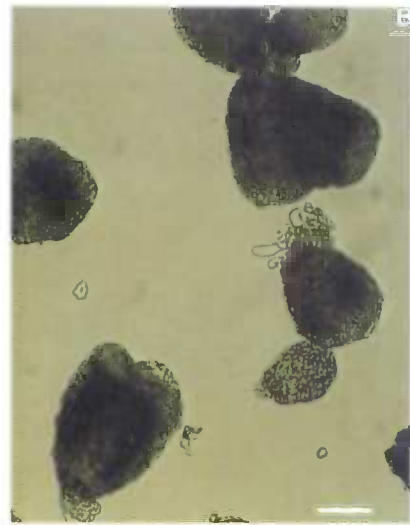


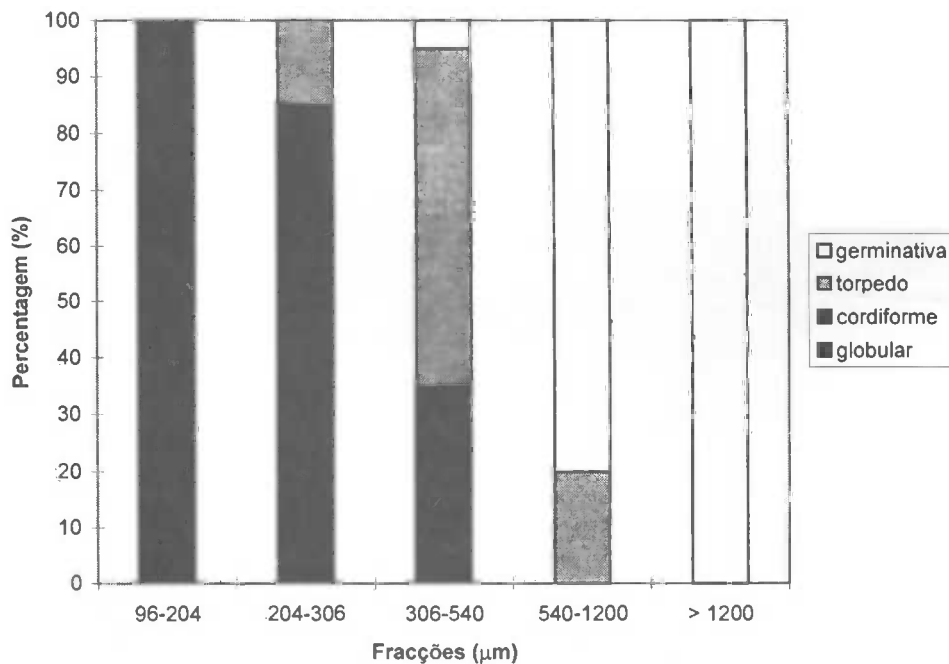
Tabela 3

*Evolução de uma cultura embriogénica de *Daucus carota* (linha EVA) em meio MS⁺A. Os embriões encontram-se distribuídos pelas fases características da embriogénese somática. Os valores representam a média das contagens de três amostras de 1 ml ± erro padrão da média. Dia, tempo de cultura após inoculação*

Dia	Globular	%	Cordiforme	%	Torpedo	%	Germinativa	%
7	159,3 ± 15,9	100	0	0	0	0	0	0
14	85,7 ± 9,5	52,3	44,0 ± 4,0	26,9	33,7 ± 3,3	20,6	0,3 ± 0,3	0,2
22	15,0 ± 1,5	7,2	40,3 ± 5,7	19,3	149,0 ± 10,1	71,4	4,3 ± 0,9	2,1
29	13,3 ± 0,9	6,4	24,0 ± 1,7	11,6	164,3 ± 8,8	79,3	5,6 ± 1,3	2,7
35	2,7 ± 0,3	1,3	17,7 ± 0,9	8,5	182,7 ± 14,7	87,5	5,7 ± 1,3	2,7

Figura 5

*Composição das fracções resultantes da crivagem de uma cultura embriogénica de *Daucus carota* (linha EVA), cultivada em MS durante três semanas. Os valores representam a percentagem relativa de estruturas na fase referida, obtida pela média aproximada de 10 contagens por fracção efectuadas ao microscópio, numa área de 1 cm²*



3.3. Enriquecimento das fracções embrionicas

Após crivagem de uma cultura embriogénica com três semanas de cultivo em meio MS, como descrito em 2.5, as fracções resultantes foram observadas à lupa e as estruturas presentes contadas e discriminadas segundo a fase em que se encontravam. Os resultados encontram-se na Figura 5.

As fracções obtidas, com excepção da fracção $>1200 \mu\text{m}$, apresentam-se pouco homogéneas, em particular as de dimensões intermédias. A fracção 96–204 μm contém 90% de embriões na fase globular e por isso entendeu-se que esta fracção seria representativa da fase globular da embriogénese para efeitos da análise electroforética. À fracção 204–306 μm atribuiu-se uma posição intermédia entre a fase globular e a cordiforme. A fase torpedo é representada por aproximação pela fracção 306–540 μm e a fase germinativa pela fracção $>1200 \mu\text{m}$. A Figura 6 apresenta a observação à lupa de fracções obtidas por crivagem. Em paralelo foram obtidas fracções da mesma linha EVA, com três semanas em meio MS^A.

3.4. Teor de proteína solúvel das fracções embrionicas

O teor de proteína solúvel total das amostras recolhidas após fraccionamento por crivagem está representado na Figura 7.

Da observação da Figura 7 verifica-se que o teor proteico médio da fracção 96–204 μm é baixo, aumentando nas fracções seguintes, até à fracção 540–1200 μm . Na fracção $>1200 \mu\text{m}$, correspondente aos embriões em germinação, há um decréscimo na proteína solúvel total. Nos embriões cultivados na presença de ABA os teores de proteína solúvel evoluem de forma equivalente e embora o teor médio de proteína destes seja inferior ao dos embriões cultivados em meio MS, os valores não diferem significativamente.

3.5. Análise dos padrões electroforéticos de proteína solúvel total

A proteína solúvel de amostras recolhidas como referido em 2.3 foi separada por electroforese como descrito em 2.6. A Figura 8A mostra os padrões de electroforese da linha não embriogénica NUM (coluna 1) e da linha embriogénica EVA (coluna 2) cultivadas em meio MS^D. As duas linhas apresentam perfis semelhantes embora se possam distinguir através algumas bandas.

Figura 6

Observação à lupa das frações obtidas por crivagem de uma cultura embriogénica de *Daucus carota* (linha EVA). Fracção 96–204 μm (A); Fracção 204–306 μm (B); Fracção 306–540 μm (C); Fracção >1200 μm (D).
A barra representa 500 μm em (A), (B), (C) e 1 mm em (D)

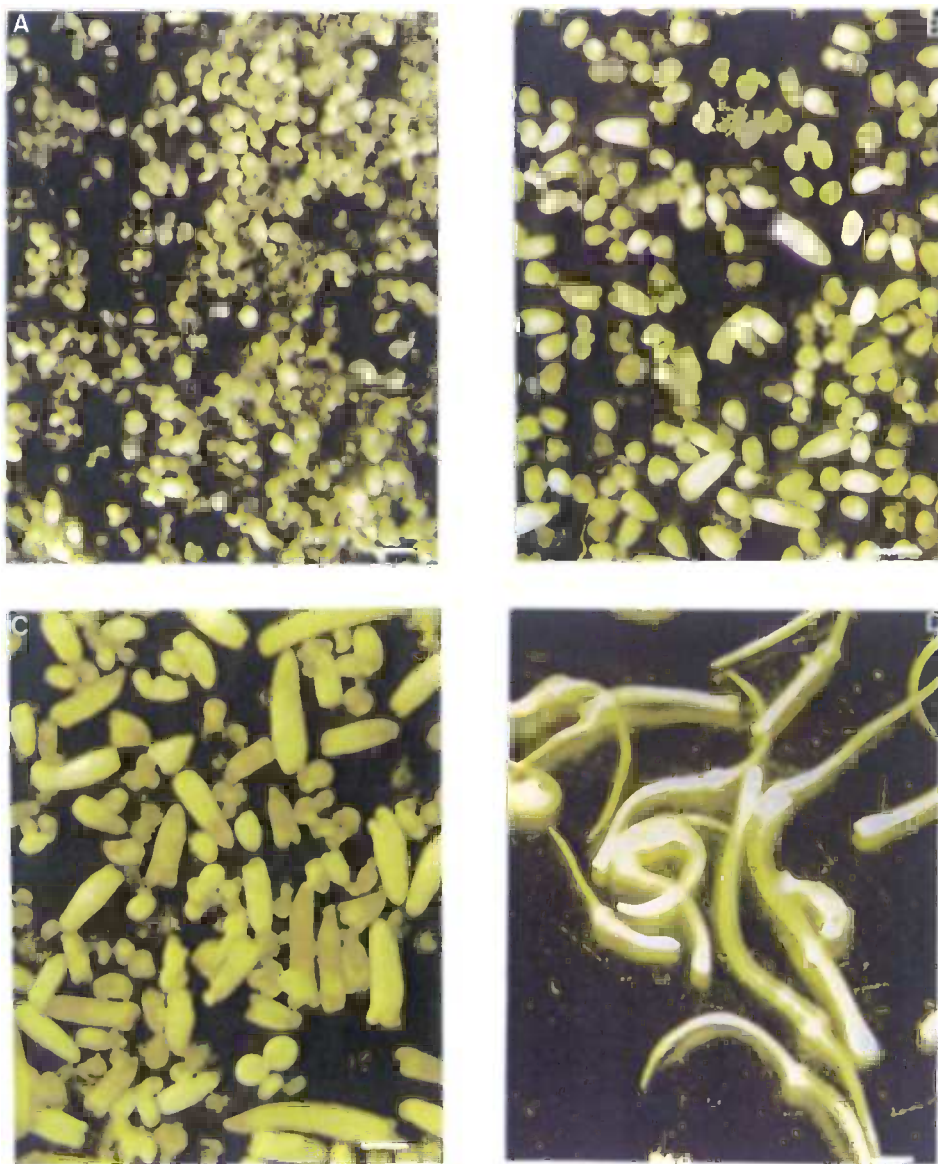
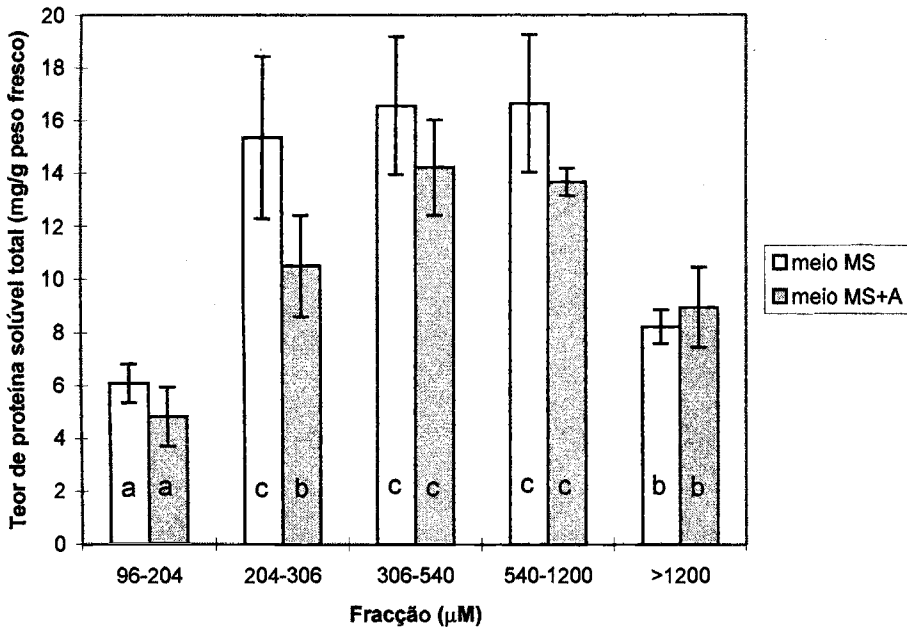


Figura 7

Doseamento da proteína solúvel total das frações obtidas por crivagem de suspensões celulares da linha EVA cultivadas em meio MS e MS^{+A}. As barras representam o erro padrão da média de duas a cinco amostras. A letras distintas correspondem teores de proteína significativamente diferentes (teste de Duncan, $\alpha = 0,05$)



A linha NUM (coluna 1) possui dois grupos de bandas, aproximadamente a 75–82 kDa e a 98–105 kDa (valores extrapolados), que surgem mais ténues na linha embriogénica EVA (coluna 2). No perfil proteico da linha NUM encontra-se igualmente uma banda, correspondente a uma proteína de massa molecular 38,5–39 kDa, sem equivalente na outra linha. Por seu lado, no perfil proteico da linha embriogénica EVA, coluna 2, detectam-se bandas de 27,5–28 kDa, 37,5–38 kDa e 59–61,5 kDa que têm uma presença muito ténue na linha NUM. No perfil proteico das células da linha embriogénica EVA identificou-se ainda uma proteína de 17,5–18 kDa, que está ausente no perfil da linha não embriogénica NUM.

O perfil proteico da linha NUM, cultivada em meio MS^{+DA} (Figura 8B, coluna 1), apresenta alterações, que consistem na diminuição de intensidade

das bandas de 38,5–39 kDa, 75–82 kDa e 98–105 kDa, relativamente ao controlo sem ABA. No perfil proteico de EVA (coluna 2), nenhuma das proteínas apontadas anteriormente como características para a linha sofre alterações. As bandas de 27,5–28 kDa, 37,5–38 kDa e 59–61,5 kDa surgem novamente mais intensas em EVA, do que em NUM, e a banda de 17,5–18 kDa aparece exclusivamente na linha EVA. O ABA no meio de cultura não influenciou a expressão das proteínas especificamente associadas à linha embriogénica.

Os padrões electroforéticos das fracções obtidas como descrito em 2.5, contendo embriões em diversas fases de desenvolvimento, foram de igual modo estudados. A cada fracção associou-se uma fase da embriogénese, as fracções de 96–204 μm , 204–306 μm , 306–540 μm e >1200 μm representando respectivamente a fase globular, a fase cordiforme, a fase torpedo e fase germinativa. A Figura 8A (colunas 3–6) mostra os resultados da electroforese dessas fracções obtidas em meio MS, enquanto Figura 8B apresenta os resultados da electroforese com fracções equivalentes obtidas em meio MS^{+A}. Na Figura 8A reconhecem-se alterações entre o perfil proteico de EVA e o dos embriões dela derivados. As bandas proteicas de massa molecular 27,5–28 kDa, 37,5–38 kDa e 59–61,5 kDa, presentes no perfil de EVA (coluna 2), e com menor intensidade no de NUM (coluna 1), perdem importância nos perfis dos embriões, diminuindo de intensidade. As proteínas de 27,5–28 kDa e 59–61,5 kDa tornam-se quase indetectáveis a partir da fase torpedo (coluna 5). O ABA no meio de cultura não alterou este padrão de expressão proteica (Figura 8B, colunas 3–6).

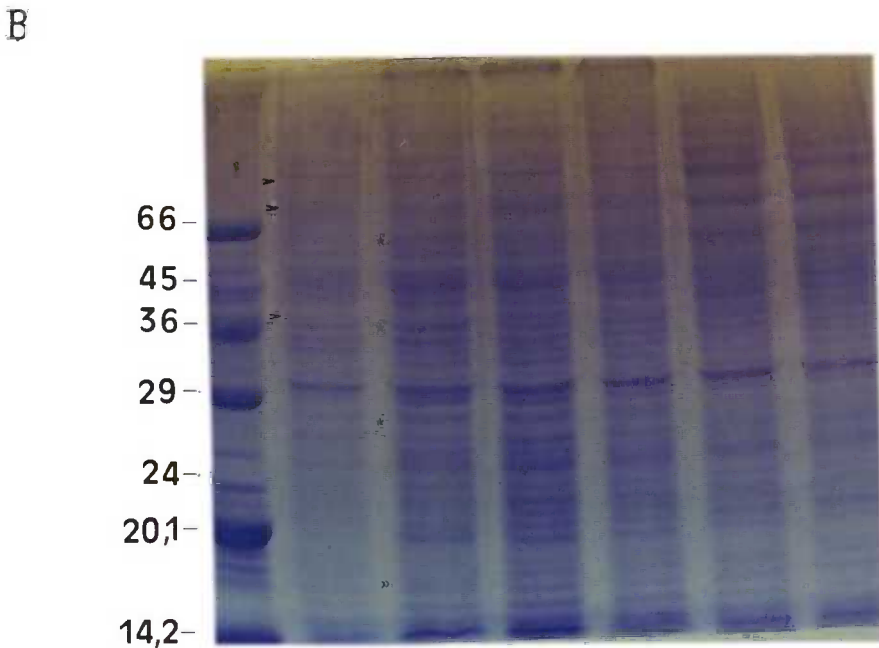
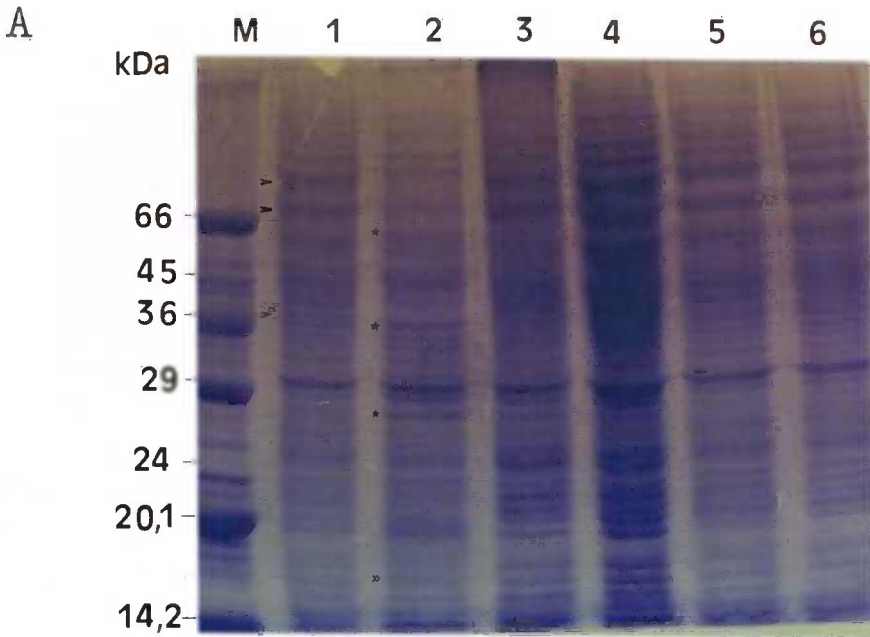
Outro grupo de proteínas apresentou um comportamento distinto: reduzidos em EVA (Figura 8A, coluna 2), mas significativos em NUM (coluna 1), os níveis de proteínas das 98–105 kDa, de 75,5–82 kDa e de 38,5–39 kDa, aumentaram na fase globular (coluna 3), mantendo-se estáveis ao longo das restantes fases. Em meio com ABA (Figura 8B), só a expressão da proteína de 38,5–39 kDa não foi afectada. A banda de 98–105 kDa apareceu apenas na fase cordiforme (coluna 4), aumentando de intensidade na fase torpedo (coluna 5) e na fase germinativa (coluna 6). A banda de 75,5–82 kDa surge na fase globular (coluna 3) e apresenta tendência para aumentar nas restantes fases, atingindo níveis semelhantes aos que se encontraram em embriões cultivados em meio MS.

A proteína de 17,5–18 kDa referida acima como estando associada à linha embriogénica na fase pré-embriónica (Figura 8A, coluna 2), está ausente do perfil proteico em qualquer das fases do desenvolvimento embrionário, independentemente da presença de ABA.

Figura 8

(A) Padrões electroforéticos de proteína solúvel total corados com CBB R-250 de linhas NUM (1) e EVA (2), cultivadas em meio MS^{+D} , e de fracções derivadas da cultura de EVA em meio MS.

Fracção 96–204 μm (3); Fracção 204–306 μm (4); Fracção 306–540 μm (5); Fracção >1200 μm (6). (B) A mesma legenda que (A) mas como meio de cultura MS^{+DA} para (1) e (2) e MS^{+A} para (3) a (6). Proteínas marcadoras de peso molecular conhecido (M): fosforilase (94 kDa), albumina de soro bovino (68 kDa), α -amilase (48 kDa), albumina de ovo (43 kDa), anidrase carbónica (30 kDa) e tripsina (24 kDa). O símbolo (>) identifica proteínas características de NUM. O símbolo (*) indica proteínas com maior expressão em EVA. O símbolo (\gg) identifica proteína presente apenas em EVA.



4. Discussão

A linha não embriogénica de células de *Daucus carota* usada no presente trabalho registou valores de peso seco cerca de duas vezes superiores aos da linha embriogénica, tendo completado o crescimento em metade do tempo (Fig. 2). Segundo Smith & Street (1974), a perda de potencial embriogénico de células em suspensão, ao longo de subculturas sucessivas, resulta do aparecimento em cultura de células com maior taxa de crescimento e sem capacidade embriogénica. Estas células tornam-se dominantes, acabando por diluir a população de células embriogénicas. Por outro lado, a linha embriogénica é capaz de produzir embriões quando transferida para meio sem auxina. Em condições normais, o número total de embriões aumenta durante o processo embriogénico, tendo Fujimura & Komamine (1979) verificado que atinge o seu valor máximo aos 14 dias de cultura, de forma idêntica ao que se observou neste trabalho. Em meio MS, os embriões de cenoura progridem pelas fases características da embriogénese: globular, cordiforme, torpedo e iniciando a expansão celular germinam. Em meio MS^{+A}, observou-se uma acumulação de embriões na fase de torpedo e o número máximo de embriões foi atingido ao 21º dia (Tab. 3), contra o 14º dia observado em meio sem ABA (Tab. 2). O ABA parece assim ter dois efeitos sobre o processo de embriogénese somática: atrasar o desenvolvimento do embrião e bloqueá-lo na fase de torpedo. Fujimura & Komamine (1975) verificaram que concentrações crescentes de ABA até 10 µM causavam um decréscimo no número de embriões nas fases cordiforme e torpedo, sem que o número de embriões globulares fosse significativamente afectado. Outros autores relataram o efeito inibidor do ABA sobre a germinação precoce (Ammirato, 1983; Nickle & Yeung, 1994).

O início da embriogénese somática é marcado por uma intensa actividade metabólica. A taxa de síntese proteica, por exemplo, aumenta significativamente duas horas após transferência para meio sem auxina (Sengupta & Raghavan, 1980). No entanto, durante as primeiras 48 horas não se regista acumulação de proteína, pelo que se supõe que o aumento da síntese é acompanhado por um incremento na taxa de degradação da proteína (Fujimura *et al.*, 1980). A passagem da fase globular para a fase cordiforme é outro ponto de aumento na síntese proteica (Kawahara *et al.*, 1992). De facto, na fracção 204–306 µm, a que corresponde a maior percentagem de embriões cordiformes, verifica-se um aumento significativo no teor de proteína, relativamente à fracção anterior (Fig. 7). Alguns autores referiram, para determinados sistemas de embriogénese somática, o efeito benéfico do ABA na acumulação de

proteínas de reserva (Finkelstein *et al.*, 1985; Merkle *et al.*, 1995). No entanto, em embriões de luzerna (*Medicago sativa*), o ABA aplicado desde o início do desenvolvimento embrionário, impõe um estado de quiescência e inibe a deposição de proteínas de reserva (Merkle *et al.*, 1995). Nos embriões zigóticos os níveis endógenos de ABA elevam-se no início da maturação do embrião cotiledonar (Skriver & Mundy, 1990). Conforme se observou, quando cultivados em meio MS^{+A} desde o início da embriogênese, os embriões de cenoura não apresentaram teores de proteína significativamente diferentes dos que eram cultivados em meio sem ABA. No que se refere à acumulação de proteínas de reserva, o momento de aplicação de ABA pode pois ser importante para a resposta dos embriões somáticos de cenoura.

Na passagem de um estado de crescimento desorganizado para a embriogênese somática seria de esperar uma mudança acentuada nos padrões de expressão de proteínas. No entanto, Sung & Okimoto (1981, 1983) ao compararem o perfil proteico de embriões somáticos com o das culturas embriogênicas em meio com 2,4-D de onde eram derivados, encontraram semelhanças significativas. Diversas razões foram enunciadas: as diferenças entre os perfis proteicos serem sobretudo quantitativas; a variação ocorrer em proteínas regulatórias que, por serem menos abundantes, são também mais difíceis de detectar (Choi *et al.*, 1987). Esta aparente similaridade poderá reflectir ainda a capacidade embriogênica das culturas em 2,4-D. As massas proembriogênicas presentes na cultura em 2,4-D estando direccionadas para o desenvolvimento embriogênico, podem possuir desde logo as proteínas associadas ao desenvolvimento embrionário (Terzi & Lo Schiavo, 1990).

Nos perfis proteicos da cultura embriogênica na presença de 2,4-D quatro bandas apresentaram níveis superiores comparativamente aos embriões. Contudo, só a proteína 17,5–18 kDa é exclusiva do perfil proteico da linha embriogênica, estando ausente no perfil proteico dos embriões e da linha não embriogênica. Sung & Okimoto (1983) identificaram a proteína C2, de 20 kDa, que apenas era expressa em culturas embriogênicas cultivadas em elevada densidade celular, na presença de 2,4-D, condições que reprimiam a síntese de proteínas específicas de embriões. Quando a cultura embriogênica era transferida para meio sem auxina, onde se iniciava a formação de embriões somáticos, a proteína desaparecia do perfil proteico. Esta proteína estava ainda ausente numa linha de células de cenoura com baixo potencial embriogênico. A proteína C2 é semelhante no modo de expressão à proteína de 17,5–18 kDa. Poderá tratar-se da mesma proteína ou de uma proteína homóloga pois Sung & Okimoto (1983) trabalharam com cenoura selvagem.

Outro indício de que se poderá tratar da mesma proteína é dado pelo facto da sua massa molecular, extrapolada através de uma regressão polinomial ($R^2 = 0,997$) ser de 17,5 kDa, ao contrário dos 20 kDa indicados pelos autores, que provavelmente utilizaram uma regressão exponencial ($R^2 = 0,972$).

A proteína 17,5–18 kDa parece estar relacionada com o embriogenicidade de uma cultura em meio com 2,4-D, onde não existem ainda vestígios de diferenciação celular. Por outro lado, está ausente no perfil proteico de embriões em desenvolvimento, o que reforça a sua associação aos estádios mais precoces da embriogénese somática. A caracterização de marcadores que estejam associados a determinadas fases do desenvolvimento embrionário possibilita a avaliação do potencial regenerativo de material vegetal, antes de se manifestarem as alterações morfológicas, reduzindo o tempo de espera entre o tratamento e os resultados. Assim a proteína 17,5–18 kDa poderá ser um potencial marcador da determinação embriogénica em cenoura. O estudo desta proteína, bem como de proteínas homólogas em espécies afins, deverá facilitar o trabalho de avaliação do potencial regenerativo de culturas, conduzindo a sistemas de propagação vegetal mais eficientes.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho realizou-se no CBAA, que recebe financiamento Pluri-anual/FCT.

Ao Prof. C. Pinto Ricardo (ITQ3) agradecem-se as facilidades que permitiram usar a técnica de electroforese, que contaram com o apoio de Ana Fortunato, a quem igualmente se agradece.

BIBLIOGRAFIA

- AMMIRATO, P.V. (1983) — *Embryogenesis*, in "Handbook of Plant Cell Cultures", Vol. 1 (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato e Y. Yamada, Eds.), MacMillan Publishing Company, Nova Iorque, pp. 82–123.
- AMMIRATO, P.V. (1986) — *Carrot*, in "Handbook of Plant Cell Cultures", Vol. 4 (D.A. Evans, W.R. Sharp e P.V. Ammirato, Eds.), MacMillan Publishing Company, Nova Iorque, pp. 457–499.
- AMMIRATO, P.V. (1987) — *Organizational events during somatic embryogenesis*, in "Plant Biology: Plant Tissue and Cell Culture", Vol. 3 (C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett e D.D. Briesbaer, Eds.), Alan R. Liss, Inc., Nova Iorque, pp. 57–81.

- AMMIRATO, P.V. (1988) — Role of ABA in the regulation of somatic embryogenesis, *Hort-science*, 23: 520.
- AMMIRATO, P.V.; STEWARD, F.C. (1971) — Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells, *Bot. Gaz.*, 132: 149–158.
- BRADFORD, M.M. (1976) — A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- BORKIRD, C.; CHOI, J.H.; JIN, Z.-H.; FRANZ, G.; HATZOPOULOS, P.; CHORNEAU, R.; BONAS, U.; PELLEGGRI, F.; SUNG, Z.R. (1988) — Developmental regulation of embryogenic genes in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6399–6403.
- CHOI, J.H.; LIU, L.-S.; BORKIRD, C.; SUNG, Z.R. (1987) — Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 1906–1910.
- DAGNELIE, P. (1973) — *Estatística, Teoria e Métodos*, Volumes 1 e 2, Edições Europa-América, Mem Martins.
- FINKELSTEIN, R.R.; TENBARGE, K.M.; SHUMWAY, J.E.; CROUCH, M.L. (1985) — Role of ABA in maturation of rapeseed embryos, *Plant Physiol.*, 78: 630–636.
- FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. (1975) — Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture, *Plant Science Letters*, 5: 359–364.
- FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. (1979) — Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture, *Plant Physiol.*, 64: 162–164.
- FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A.; MATSUMOTO, H. (1980) — Aspects of DNA, RNA and protein synthesis during somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture, *Physiol. Plant.*, 49: 255–260.
- HALPERIN, W. (1966) — Alternative morphogenetic events in cell suspensions, *Amer. J. Bot.*, 53: 443–453.
- HALPERIN, W. (1995) — *In vitro embryogenesis: some historical unresolved problems*, in “*Vitro Embryogenesis in Plants*” (T.A. Thorpe, Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1–16.
- HALPERIN, W.; WETHERELL, D. (1964) — Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*, *Am. J. Bot.*, 51: 274–283.
- HALPERIN, W.; WETHERELL, D. (1965) — Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*, *Nature*, 205: 519–520.
- HATZOPOULOS, P.; FONG, F.; SUNG, Z.R. (1990) — Abscisic acid regulation of DC8, a carrot embryonic gene, *Plant Physiol.*, 94: 690–695.
- JOY, R.W.; MCINTYRE, D.D.; VOGEL, H.J.; THORPE, T.A. (1996) — Stage-specific nitrogen metabolism in developing carrot somatic embryos, *Physiol. Plant.*, 97: 149–159.
- KAWAHARA, K.; SUNABORI, S.; FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. (1992) — A gene expressed preferentially in the globular stage of somatic embryogenesis encodes elongation-factor 1 in carrot, *Eur. J. Biochem.*, 209: 157–162.
- LAEMMLI, U.K. (1970) — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680–685.

- MERKLE, S.A.; PARROT, W.A.; FLINN, B.S. (1995) — *Morphogenic aspects of somatic embryogenesis*, in "In Vitro Embryogenesis in Plants" (T.A. Thorpe, Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 155-203.
- MILLS, D.R.; LEE, J.M. (1996) — A simple, accurate method for determining wet and dry weight concentrations of plant cell suspension cultures using microcentrifuge tubes, *Plant Cell Reports*, 15: 634-636.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15: 437-496.
- NICKLE, T.C.; YEUNG, E.C. (1994) — Further evidence of a role for abscisic acid in conversion of somatic embryos of *Daucus carota*, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 30: 96-103.
- NOMURA, K.; KOMAMINE, A. (1985) — Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture, *Plant Physiol.*, 79: 988-991.
- SENGUPTA, C.; RAGHAVAN, V. (1980) — Somatic embryogenesis in carrot cell suspension. I. Pattern of protein and nucleic acid synthesis, *J. Exp. Bot.*, 31: 247-258.
- SKRIVER, K.; MUNDY, J. (1990) — Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress, *Plant Cell*, 2: 503-512.
- SMITH, S.M.; STREET, H.E. (1974) — The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured, *Ann. Bot.*, 38: 223-241.
- SUNG, Z.R.; OKIMOTO, R. (1981) — Embryonic proteins in somatic embryos of carrot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 3683-3687.
- SUNG, Z.R.; OKIMOTO, R. (1983) — Coordinate gene expression during somatic embryogenesis in carrots, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2661-2665.
- TERZI, M.; LO SCHIAVO, F. (1990) — *Somatic embryogenesis*, in "Plant Tissue Culture" (S.S. Bhojwani, Ed.), Elsevier, Nova Iorque, pp. 54-66.