

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO DIEGO KAZIUK

EFEITO DO ESTRESSE POR ALTA TEMPERATURA EM CÉLULAS  
EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia* RESPONSIVAS (SE1) E NÃO  
RESPONSIVAS (SE6) À INDUÇÃO DE MATURAÇÃO

CURITIBA

2017

FERNANDO DIEGO KAZIUK

EFEITO DO ESTRESSE POR ALTA TEMPERATURA EM CÉLULAS  
EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia* RESPONSIVAS (SE1) E NÃO  
RESPONSIVAS (SE6) À INDUÇÃO DE MATURAÇÃO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Bioquímica.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Silvia Maria S. C. Cadena.

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Fabiane Fortes.

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Kaziuk, Fernando Diego

Efeito do estresse por alta temperatura em células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) à indução de maturação. / Fernando Diego Kaziuk. – Curitiba, 2017.

66 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Silvia Maria Suter Correia Cadena

Coorientadora: Fabiane Fortes

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. *Araucariaceae*. 2. Estresse oxidativo. 3. Plantas – Efeito da temperatura. I. Título. II. Cadena, Silvia Maria Suter Correia. III. Fortes, Fabiane. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

CDD (20. ed.) 585.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)  
Código CAPES: 40001016003P2

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **FERNANDO DIEGO KAZIUK**, intitulada: "**Efeito do estresse por alta temperatura em células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) à indução de maturação**", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação.

CURITIBA, 25 de Abril de 2017.

  
SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
MÁRIA ELIANE MERLIN ROCHA  
Avaliador Interno (UFPR)

  
ROGÉRIO ANTÔNIO KRUPEK  
Avaliador Externo (UNESPAR)

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais Zeno e Isaura Kaziuk, minha irmã e cunhado Jessica e Alcione, e meu irmão Elizandro.

Vocês fazem muita falta!

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela vida, força e coragem durante todo esse tempo.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial a Prof. Dra. Fabiane Fortes uma das responsáveis pela realização deste trabalho.

À professora Profa. Dra. Sílvia Maria Suter Correia Cadena. Pela paciência, pelo incentivo, pelas orientações que tornaram possível a conclusão desse trabalho, e principalmente pelo carinho e amizade que levarei pela vida inteira.

À professora Profa. Dra. Eny lochevet Segal Floh (IBUSP). Pela gentileza em ceder às células embriogênicas de *A. angustifolia*, que foram utilizadas nesse trabalho.

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, que foram importantes no desenvolvimento desse trabalho, em especial a Profa. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha, pelas valiosas correções e conversas.

Aos amigos e colegas de laboratório oxidações 1 e demais laboratórios, em especial a Aninha pelo incentivo e pelo apoio constante nos experimentos.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Bioquímica e a CAPES.

Deus dá a todos uma estrela.  
Uns fazem da estrela um sol.  
Outros nem conseguem vê-la.  
(HELENA KOLODY, 1986)

## RESUMO

A *Araucaria angustifolia* é uma conífera da família Araucariaceae que foi intensamente explorada nas décadas de 50 a 70. Devido a isto, esta espécie é atualmente classificada como criticamente em perigo de extinção e consta na lista vermelha de espécies ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN). Este cenário desfavorável, motiva investigações que possibilitem estabelecer estratégias que contribuam para a preservação desta espécie. Nesse sentido, a micropropagação por embriogênese somática constitui um bom modelo experimental, já que permite avaliar as respostas celulares a variações nas condições de cultivo e, ainda, caracterizar e diferenciar estas células em relação a um parâmetro pré-estabelecido. Sabe-se que alterações climáticas, como o aumento de temperatura, podem comprometer o desenvolvimento vegetal. Considerando que a Araucária é uma espécie em risco de extinção e que seu desenvolvimento pode ser afetado pela elevação da temperatura, prevista para as próximas décadas, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta de células embriogênicas de *A. angustifolia*, responsivas (SE1) e não responsivas (SE6) à maturação, ao estresse pelo calor ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por 24, 48 e 72 h, com enfoque particular no estresse oxidativo. Avaliou-se a viabilidade, morfologia e respiração celular, os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a lipoperoxidação e a atividade das seguintes enzimas antioxidantes: Peroxidases (Prxs), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutationa redutase (GR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e monodehidroascorbato redutase (MDHAR). O estresse pelo calor ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ), nos tempos avaliados (24, 48 e 72h), aparentemente, não alterou a morfologia das linhagens SE1 e SE6. Porém, houve redução na viabilidade celular, em todos os tempos de estresse para linhagem SE1, e para SE6 a partir de 48h. Também foram encontrados altos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no tempo de 24h para as linhagens SE1 e SE6, sendo maior para a linhagem SE6. No entanto, nos tempos de 48 e 72h houve diminuição nos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na linhagem SE1, enquanto que nas células SE6 os níveis retornaram aos do controle ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). A diminuição dos níveis de peróxido na linhagem SE1 possivelmente está associada ao aumento da respiração no estado basal em 24h e a elevada atividade das enzimas antioxidantes (Prxs, SOD, APX, GR, DHAR e MDHAR). Já para linhagem SE6, houve uma inibição da respiração celular, compatível com os maiores níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de lipoperoxidação em 72h de exposição ao calor, embora as enzimas antioxidantes Prxs, SOD, CAT, APX, GR, DHAR e MDHAR tenham sido ativadas também nestas células. Uma diferença interessante entre as linhagens, em relação ao sistema de defesa enzimático, foi a maior ativação das enzimas do ciclo glutationa/ascorbato na linhagem SE1, enquanto que na linhagem SE6 as enzimas CAT e SOD foram as mais ativas. Esses resultados sugerem que o estresse por alta temperatura foi capaz de promover o estresse oxidativo nas linhagens SE1 e SE6 de *Araucaria angustifolia*, que responderam de forma diferenciada a esta condição, particularmente em relação ao sistema enzimático antioxidante. Tais diferenças podem estar relacionadas à responsividade destas células à maturação. Estudos futuros devem ser realizados para explorar e comprovar esta hipótese.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*, linhagens SE1 e SE6, estresse oxidativo, estresse pelo aumento de temperatura.

## ABSTRACT

*Araucaria angustifolia* is a conifer from Araucariaceae family that was intensively explored in the 50's and 70's. As consequence, this species is currently classified as critically endangered and listed in the Red List of Threatened Species of the International Union for Conservation of Nature (IUCN). This critical scenario motivates investigations to establishing strategies that may contribute to the preservation of this species. In this sense, somatic embryogenesis is an interesting experimental tool, since it enables to evaluate the cellular responses to variations in the culture conditions, and also to characterize and differentiate these cells in relation to pre-established parameters. It is known that climate changes, such as the Global warming can impair plant development. Considering that *Araucaria* is a species at risk of extinction and that its development may be influenced by the Global warming, the aim of this study was to evaluate the effects of heat stress ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for 24, 48 and 72 h on *A. angustifolia* cells line, responsive (SE1) and nonresponsive (SE6) to maturation, with particular focus on oxidative stress. Cell viability, morphology and respiration,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and lipid peroxidation levels and enzymatic activity of Peroxidases (Prxs), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), dehydroascorbate reductase (DHAR) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR) were evaluated. The results showed that the heat stress ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) by 24, 48 and 72h, apparently did not change the morphology of both cell lines. However, there was a reduction in the viability of SE1 in all stress conditions and for SE6 from 48h. High levels of  $\text{H}_2\text{O}_2$  after 24h of exposition were found for SE1 and SE6 lines, being higher for SE6 line. Interestingly, at 48 and 72h,  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels decreased in SE1 line, while in SE6 the values returned to the control levels ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). The decrease in peroxide levels in SE1 line may be associated with the increase in basal respiration at 24h as well as with the high activity of antioxidant enzymes (Prxs, SOD, APX, GR, DHAR and MDHAR). In SE6 line, there was an inhibition of cellular respiration, in agreement with the high levels of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and lipid peroxidation at 72h of heat exposure. However, the antioxidant enzymes Prxs, SOD, CAT, APX, GR, DHAR and MDHAR were more activated in comparison to the control. Regarding the enzymatic defense, an interesting difference was found between the cell lines. There was a significant increase in the activity of enzymes from glutathione/ascorbate cycle for SE1 line, while in SE6 CAT and SOD were the most active. These results suggest that stress by high temperature was able to promote oxidative stress in SE1 and SE6 cell lines. However, the responses to this condition were different, particularly in relation to the antioxidant enzyme systems. In addition, it is possible that such differences may be related to their responsiveness to maturation. Further studies must be performed to evaluate this hypothesis.

Keywords: *Araucaria angustifolia*, SE1 and SE6 lines, oxidative stress, heat stress.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO GLUTATIONA/ASCORBATO.....	28
FIGURA 2 - ASPECTOS MACROSCÓPICOS DE CULTURAS SE1 E SE6 de <i>A. angustifolia</i> .....	35
FIGURA 3 - MORFOLOGIA DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> ...	37
FIGURA 4 - EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR NA VIABILIDADE DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> - MÉTODO DO MTT .....	38
FIGURA 5 - EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR NA VIABILIDADE DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS SE1 DE <i>A. angustifolia</i> - MÉTODO FDA/PI.....	40
FIGURA 6 – EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR NA VIABILIDADE DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS SE6 DE <i>A. angustifolia</i> - MÉTODO FDA/PI .....	41
FIGURA 7 - NÍVEIS DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS ESTRESSADAS A 30°C .....	43
FIGURA 8 - ATIVIDADE DAS PRXS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS ESTRESSADAS A 30°C .....	45
FIGURA 9 - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS ESTRESSADAS A 30°C .....	47

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR NA VIABILIDADE DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> - MÉTODO FDA/PI .....	42
TABELA 2 - EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> SE1 E SE6 .....	50
TABELA 3 - RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS ESTRESSADAS A 30°C.....	53
TABELA 4 - RESPIRAÇÃO VIA CITOCROMO C E AOX DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS ESTRESSADAS A 30°C.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

2,4-D	- Ácido 2,4-diclorofenóxiacético
ABA	- Ácido abscísico
ACC	- Ácido aminociclopropano carboxílico
AOX	- Oxidase Alternativa
APX	- Ascorbato peroxidase
ASA	- Ácido ascórbico
BAP	- 6-benzilaminopurina
BSA	- Albumina de soro bovino
CAT	- Catalase
DHA	- Dehidroascorbato
DHAR	- Dehidroascorbato redutase
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EDTA	- Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	- Ácido etileno glico-bis(b-amino éter) N, N, N', N'-tetracético
ES	- Embriogênese somática
FCCP	- Carbonil cianida <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
FDA	- Diacetato de fluoresceína
GPX	- Glutaciona Peroxidase
GR	- Glutaciona redutase
GSH	- Glutaciona reduzida
GSSG	- Glutaciona oxidada
GST	- Glutaciona S-transferase
HEPES	- [N-(2 hidroxietil) piperazina N'-(2 ácido etanosulfônico)]
MCP	- Morte celular programada
MDHA	- Monodehidroascorbato
MDHAR	- Monodehidroascorbato redutase
MTT	- Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NASA	- National Aeronautics and Space Administration
PAs	- Poliaminas
PBS	- Solução salina tamponada
PEM	- Massa pró-embriônica

PI	- Iodeto de Propídio
Prxs	- Peroxidases
PUMP	- Proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas
PVPP	- Polivinilpolipirrolidona
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
SDS	- Dodecilsulfato de sódio
SE	- Embriões somáticos
SE1	- Células embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i> responsivas à maturação
SE6	- Células embriogênicas de <i>Araucaria angustifolia</i> não responsivas à maturação
SHAM	- Ácido salicilhidroxâmico
SOD	- Superóxido dismutase
TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TBARs	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	- Ácido tricloroacético
TOC	- Tocoferóis

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	18
1.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL .....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 <i>Araucaria angustifolia</i> .....	20
2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	21
2.3 LINHAGENS RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) À INDUÇÃO DE MATURAÇÃO .....	23
2.4 ESTRESSE POR VARIAÇÃO DE TEMPERATURA.....	24
2.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) – ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	26
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 REAGENTES .....	29
3.2 CULTIVO DAS LINHAGENS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	29
3.3 CONDIÇÕES DE ESTRESSE .....	29
3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	29
3.5 VIABILIDADE CELULAR.....	30
3.6 NÍVEIS DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	31
3.7 LIPOPEROXIDAÇÃO.....	31
3.8 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	32
3.9 RESPIRAÇÃO CELULAR.....	34
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 MORFOLOGIA CELULAR .....	35
4.2 VIABILIDADE.....	38
4.3 NÍVEIS DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	42
4.4 ATIVIDADE DAS PEROXIDASES .....	44
4.5 LIPOPEROXIDAÇÃO.....	46
4.6 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	48
4.7 RESPIRAÇÃO CELULAR.....	52
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, também conhecida como araucária ou pinheiro do Paraná, é uma conífera da família Araucariaceae (REITZ E KLEIN, 1966), de ocorrência natural na Floresta Ombrófila Mista no bioma Mata Atlântica do Brasil (MANTOVANI, 2004). Esta espécie possui uma madeira de alta qualidade, sendo a única conífera nativa de importância econômica no Brasil (ASTARITA e GUERRA *et al.*, 2002). Por este motivo foi muito explorada nas décadas de 50 a 70 (MATTOS, 1994) e, em virtude disso, atualmente restam apenas 1-4% de sua área original. Assim, o pinheiro do Paraná encontra-se atualmente classificado como uma espécie em perigo de extinção pela União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN) (THOMAS, 2013).

Como estratégia para evitar a extinção desta espécie, é de crucial importância o entendimento dos fatores bióticos e abióticos envolvidos no seu desenvolvimento, para elaborar meios de propagação mais rápidos e eficazes. Neste contexto, a embriogênese somática é uma técnica de micropropagação amplamente utilizada na biotecnologia florestal. Esta técnica envolve o desenvolvimento de embriões somáticos, o que muitas vezes prossegue através de estágios morfológicos que se assemelham à embriogênese zigótica (DONG e DUNSTAN, 1999; GUERRA *et al.*, 1999). O sucesso da micropropagação *in vitro* depende do entendimento e do comportamento das células em cultura, levando-se em consideração as trocas gasosas, a utilização de carbono, as interações celulares com o meio e a extrusão de compostos inibidores ou estimulantes (ASTARITA e GUERRA, 2000). Jo e colaboradores (2014), utilizando a embriogênese somática, estabeleceram e caracterizaram, quanto a responsividade à maturação, duas linhagens de *A. angustifolia*, utilizadas neste estudo. A linhagem SE1, que é responsiva à maturação e, a linhagem SE6, células bloqueadas à maturação.

Alguns fatores externos podem afetar o desenvolvimento da *A. angustifolia*, entre estes a temperatura. Segundo informações divulgadas pelo site Climate International, que explora dados divulgados pela National Aeronautics and Space Administration (NASA), a temperatura do planeta está aumentando e poderá ultrapassar 45 °C no mês de julho de 2100 (NASA, 2014). Temperaturas elevadas representam uma situação de estresse para as plantas, resultando no aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ),

peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $^{\circ}OH$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (NAVROT *et al.*, 2007). Por sua vez, as ROS podem causar danos oxidativos em diferentes biomoléculas, como proteínas e lipídeos, podendo levar a morte celular (GILL e TUTEJA, 2010).

Para evitar os danos causados por ROS, as plantas possuem defesas antioxidantes representadas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR), Glutathione peroxidase (GPX), dehidroascorbato redutase (DHAR) e monodehidroascorbato reductase (MDHAR) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; FOYER e NOCTOR, 2011). Além das enzimas, os níveis de ROS também são modulados pela glutathione (GSH), ácido ascórbico (ASA), tocoferóis (TOC) e os compostos fenólicos (AHMAD *et al.*, 2008; JALEEL *et al.*, 2009).

## 1.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

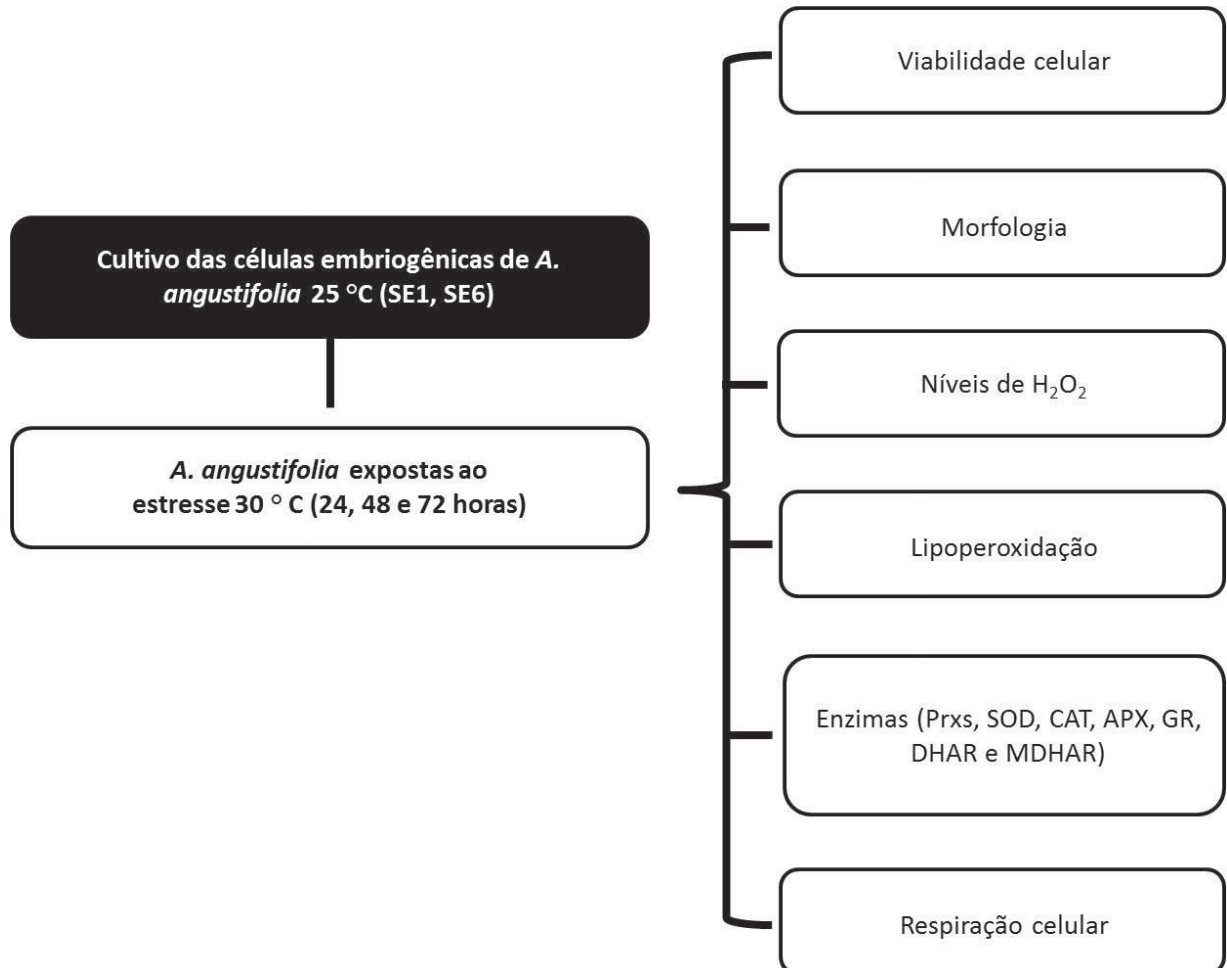
Sabe-se que o aquecimento global pode afetar o desenvolvimento de diferentes espécies vegetais, incluindo a *A. angustifolia* que se encontra em risco de extinção. Como descrito, as culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia* constituem um bom modelo para o estudo da fisiologia desta espécie, permitindo a avaliação de parâmetros bioquímicos em diferentes condições de cultivo. Por sua vez, este conhecimento é essencial para o estabelecimento de técnicas de micropropagação que sejam efetivas para a conservação da espécie.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a resposta das células embriogênicas de *A. angustifolia* com diferentes potenciais de maturação (células SE1 e SE6) submetidas ao estresse pelo calor (30 °C), com enfoque particular no estresse oxidativo.

Como objetivos específicos, em células embriogênicas de *A. angustifolia* (SE1 e SE6) expostas ao estresse pelo calor (30 °C por 24, 48 e 72 horas) foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) Viabilidade e morfologia celulares;
- b) Níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- c) Atividade das Peroxidases;
- d) Lipoperoxidação;
- e) Atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX, GR, DHAR e MDHAR);
- f) Respiração celular.

## 1.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



FONTE: o autor (2017).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, também conhecida como araucária ou pinheiro do Paraná, é uma conífera da família Araucariaceae (REITZ e KLEIN, 1966), de ocorrência natural na Floresta de Araucária ou também chamada, Floresta Ombrófila Mista no bioma Mata Atlântica do Brasil (MANTOVANI *et al.*, 2004).

Segundo Mattos (1994), a *Araucaria angustifolia* é a espécie que possui maior área de distribuição no mundo. No Brasil, as florestas naturais de araucária ocupavam originalmente 185.000km<sup>2</sup>, distribuídas principalmente no Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e em pequenas áreas de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (CARVALHO *et al.*, 1994).

Em relação ao desenvolvimento, a *A. angustifolia* é extremamente exigente, sendo fatores como a altitude e o clima determinantes para a ocorrência ou não da espécie. A araucária ocorre em altitudes entre 600 a 800 metros, (SHIMIZU e OLIVEIRA, 1981; SCHEEREN WEBER *et al.*, 2000), sendo encontrada em pequenas áreas da Argentina (Misiones) e Paraguai, em altitudes que chegam a 2300 metros (THOMAS, 2013). Ocorrem em clima temperado úmido com temperaturas médias anuais entre 13 e 18°C e com mínimas inferiores a 0°C em algumas regiões (SHIMIZU e OLIVEIRA, 1981; BEHLING, 1997; SCHEEREN WEBER *et al.*, 2000).

O reflorestamento desta espécie é limitado por condições específicas requeridas para seu cultivo, como a temperatura e as características de solo, que deve ter profundidade e capacidade de retenção de água adequados. Variáveis desta natureza interferem no crescimento e desenvolvimento da planta (CASSOL, 1982; SCHEEREM *et al.*, 2000).

A Araucária necessita também de uma grande demanda de nutrientes para o seu desenvolvimento, como de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e boro (BLUM, 1977; CASSOL, 1982; SCHEEREM *et al.*, 2000). Estes fatores associados com o longo período reprodutivo entre a polinização e a formação das sementes, que perdura por cerca de quatro anos (THOMAS, 2013), dificultam seu reflorestamento em grande escala (ASTARITA e GUERRA, 2000).

O pinheiro do Paraná produz anualmente cerca de 40 pinhas, chegando a atingir até 200 pinhas por planta (CARVALHO, 1994). As árvores jovens só se tornam competentes para a reprodução com no mínimo 12 anos de idade (THOMAS, 2013). Trata-se de uma espécie de grande porte que produz uma semente rica em carboidratos, fonte de alimento para o homem e outros animais (MANTOVANI *et al.*, 2004). Além disso, possui uma madeira de alta qualidade, sendo a única conífera nativa de importância econômica no Brasil (REITZ e KLEIN, 1966; GUERRA *et al.*, 2002). Este foi o principal motivo de sua exploração, intensificada após 1934, atingindo o ápice entre as décadas de 50 e 70 (MATTOS, 1994). Em um período de 20 anos cerca de 5 milhões de hectares de florestas de *A. angustifolia* foram cortados (BEHLING, 1997) e, em decorrência disso, atualmente, restam apenas 1-4% da sua área original (MANTOVANI *et al.*, 2004).

É muito importante para manutenção desta espécie que os fatores bióticos e abióticos envolvidos em sua expansão sejam investigados e conhecidos (DUARTE *et al.*, 2006; FONTOURA *et al.*, 2006). Para evitar sua extinção, o reflorestamento é fundamental, o que exige meios eficientes e rápidos para sua propagação (STEFENON *et al.*, 2009; KLIMASZEWSKA *et al.*, 2011). Neste sentido, a embriogênese somática tem se mostrado bastante promissora. Esta técnica é uma importante ferramenta para o estudo da fisiologia desta planta e também possibilita o desenvolvimento de métodos de propagação mais eficientes (GUERRA *et al.*, 1999).

## 2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Embriogênese somática (ES), também denominada embriogênese assexuada, é definida como uma demonstração da totipotência das células vegetais. Este processo de embriogênese é análogo ao da embriogênese zigótica, no entanto, as células somáticas são as precursoras do embrião sem que ocorra a fusão de gametas (GUERRA *et al.*, 1999).

Dentre as diferentes abordagens experimentais utilizadas para investigar aspectos fisiológicos e bioquímicos da *A. angustifolia*, a técnica de micropropagação por embriogênese somática tem se destacado. Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* são obtidas através de embriões zigóticos, que são retirados de cones femininos (pinhões) imaturos e inoculados no meio básico de crescimento celular (VON ARNOLD e ERIKSSON, 1981).

Nesta técnica, a partir do cultivo *in vitro*, um conjunto de células somáticas dá início a formação de embriões somáticos, que se desenvolvem originando um agregado de células ou massas pró-embrionárias (PEMs) (PALOVAARA e HAKMAN, 2008). Estágios morfológicos que se assemelham aos da embriogênese zigótica também podem ser alcançados através de variações no meio de cultivo (DONG e DUNSTAN, 1999; GUERRA *et al.*, 1999). A principal diferença entre a embriogênese zigótica e a somática é que embriões somáticos crescem livres de dependências físicas, fisiológicas e genéticas, o que não ocorre durante o desenvolvimento de um embrião zigótico (ZIMMERMAN, 1993).

O sucesso da micropropagação *in vitro* depende do entendimento e do comportamento das células em cultura, levando-se em consideração as trocas gasosas, utilização de carbono, interações celulares com o meio e a extrusão de compostos inibidores ou estimulantes, entre outros (ASTARITA e GUERRA, 2000).

Para *A. angustifolia*, os fatores e as condições que interferem nos estágios iniciais da embriogênese somática são conhecidos (ASTARITA e GUERRA, 1998; ASTARITA e GUERRA, 2000; SANTOS *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2002; STEINER, *et al.*, 2005; SANTOS, *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2010). Dentre aqueles que podem alterar a indução e a manutenção das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, destacam-se as poliaminas (PAs), considerando sua importância na sinalização celular, modificando o crescimento e a morfologia destas células a partir da modulação dos níveis endógenos de PAs e da atividade das bombas de prótons (DUTRA *et al.*, 2010). A proliferação e diferenciação das células embriogênicas de *A. angustifolia in vitro* são influenciadas também pela presença do ácido abscísico (ABA), agentes osmóticos, carvão ativado e fontes de carbono (ASTARITA E GUERRA, 2000; SANTOS *et al.*, 2002; STEINER *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2006; STEINER *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008). O ABA, em conjunto com alguns carboidratos como a sacarose e maltose, é essencial para a maturação somática dos embriões em coníferas (VON ARNOLD *et al.*, 2002; STEINER *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2006; ASTARITA E GUERRA, 2000).

Outros estudos apontam que a presença de fitorreguladores, como o ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D), cinetina e benzilaminopurina (BAP) e, até mesmo o genótipo da planta mãe, podem alterar o desenvolvimento e a indução das culturas de coníferas (TAUTORUS *et al.*, 1991; SANTOS *et al.*, 2002; STEINER *et al.*, 2005). No entanto, não são conhecidos todos os fatores que afetam a ES, principalmente

nos estágios mais avançados de desenvolvimento desse processo (DO NASCIMENTO VIEIRA *et al.*, 2012; JO *et al.*, 2014).

Jo e colaboradores (2014) realizaram um importante estudo em que cultivaram células embriogênicas provenientes de diferentes plantas mãe, em meios contendo agentes de indução e maturação, para determinar a capacidade dessas culturas de desenvolverem embriões somáticos (SE). Como resultado, as células embriogênicas de *A. angustifolia* que apresentaram o desenvolvimento cotiledonar, foram classificadas como linhagens sensíveis às condições de maturação (SE1), enquanto que as que não apresentaram este desenvolvimento foram classificadas como linhagens celulares com desenvolvimento bloqueado (SE6). As linhagens SE1 SE6 tornaram-se, então, importantes modelos de estudo para o entendimento da resposta das células embriogênicas de *A. angustifolia* a condições de estresse.

### 2.3 LINHAGENS RESPONSIVAS (SE1) E NÃO RESPONSIVAS (SE6) À INDUÇÃO DE MATURAÇÃO

Segundo Jo e colaboradores (2014) o desenvolvimento de embriões somáticos na linhagem SE1 está associado a presença da enzima S-adenosil-metionina sintase. Esta enzima, relacionada com a elevada biossíntese de etileno, catalisa a conversão da metionina a S-adenosil-metionina (SAM), que se converte a ácido aminociclopropano carboxílico (ACC) pela ação da ACC sintetase, que finalmente é oxidado a etileno pela ACC oxidase (WANG *et al.*, 2002). Metiltransferases utilizam SAM como fonte de metil, sendo que elevados níveis de metilação do DNA durante a embriogênese estão associados à modelagem da cromatina e seletividade para o crescimento de embriões somáticos (STASOLLA *et al.*, 2004). Além disso, a linhagem SE1 apresentou níveis mais elevados de ROS, o que poderia desencadear a morte celular programada (MCP), que segundo Bozhkov e colaboradores (2005) pode ser um evento importante para diferenciação de PEMs a SE.

Para a linhagem SE6, Jo e colaboradores (2014) destacaram a presença da subunidade F da NADH desidrogenase, o que poderia contribuir para os níveis inferiores de ROS nestas células em comparação a SE1. Com base nestes

resultados, os autores sugeriram que o estado redox celular é importante para o desenvolvimento dos embriões somáticos.

Os resultados de Santos e colaboradores (2016) estão de acordo aos descritos por Jo e colaboradores (2014). Os autores demonstraram maior expressão de proteínas relacionadas à condição de estresse oxidativo na linhagem SE1. Entre estas, as enzimas L-ascorbato peroxidase (APX) e a deidroascorbato redutase (DHAR), duas enzimas integrantes do ciclo glutationa-ascorbato. Para a linhagem SE6 foi encontrada uma maior abundância de duas proteases aspárticas (APs) e proteínas relacionadas à dessecação de plantas, ambas relacionadas com o desenvolvimento de sementes. A ocorrência dessas proteínas pode estar relacionada com o desenvolvimento mais tardio de embriões somáticos (SANTOS *et al.*, 2016).

Apesar das linhagens terem diferentes potenciais embriogênicos, ambas possuem os mesmos tipos celulares, as células embrionárias e suspensoras. As células embrionárias são pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso e estão relacionadas com a competência para o desenvolvimento celular. As células suspensoras, são alongadas e vacuoladas (STEINER *et al.*, 2005; ASTARITA e GUERRA, 2000; VALENTE *et al.*, 2012).

#### 2.4 ESTRESSE POR VARIAÇÃO DE TEMPERATURA

Como mencionado, variações de temperatura podem constituir um fator de estresse em vegetais. Temperaturas mais elevadas podem impactar inclusive a produtividade de algumas plantas. Neste sentido, Hatfield e Prueger (2015) observaram que temperaturas mais altas podem afetar significativamente o rendimento de grãos na cultura do milho, reduzindo em até 80-90% em relação a produção em temperaturas consideradas ideais (25 °C). Estes efeitos são evidenciados pelo aumento da senescência, o que resulta na redução da capacidade das culturas em preencher os grãos. Para as espécies *Fagus sylvatica* e *Rhododendron catawbiense* estressadas pelo calor, demonstrou-se o esgotamento do conteúdo de água das folhas submetidas ao estresse (BUITRAGO *et al.*, 2016).

Em algumas espécies, a termotolerância pode ser induzida. Em plântulas de soja cultivadas (28°C) realizou-se um pré-tratamento de duas horas subsequentes a 40°C e a 45°C, e outro apenas por duas horas a 45°C. Observou-se que somente as

plantas submetidas a dois pré-tratamentos (40°C e 45°C) mantiveram seu desenvolvimento, indicando que a termotolerância foi induzida (BUCHANAN *et al.*, 2015). Ainda neste contexto, para o espinafre (*Spinacia oleracea*), têm sido identificadas variedades tolerantes ao frio, mas sensíveis ao calor. A variedade de espinafre "ilha" é adequada para os períodos de verão. Análises de transcriptoma e expressão gênica foram realizadas em diferentes variedades de folhas de espinafre "ilha" cultivados a 24 °C (controle) e expostas a 35 °C durante 30 min e 5 h. Uma grande quantidade de genes foram diferencialmente modulados pelo calor e identificados (YAN *et al.*, 2016).

Os fatores de transcrição de choque térmico A2s (HsfA2s) são importantes reguladores da resposta de plantas a temperaturas elevadas. Neste sentido, Wang e colaboradores (2016) isolaram um gene HsfA2 (CtHsfA2b) de uma espécie de grama de estação quente, (*Cynodon transvaalensis*), para determinar as funções fisiológicas e regulação da transcrição de HsfA2 na tolerância ao calor. Análises de expressão gênica revelaram que CtHsfA2b poderia desempenhar um papel positivo na proteção contra o calor devido ao aumento na taxa de transcrição de proteínas relacionadas a defesa antioxidante e chaperonas, melhorando a tolerância dessas plantas a altas temperaturas. Os autores sugeriram que a expressão desse gene poderia induzir a tolerância a altas temperaturas em espécies normalmente sensíveis ao calor.

Em relação à *Araucaria angustifolia*, Zarpelão (2014) e Kaziuk (2014) demonstraram que o estresse a 30 e 37°C por até 19 horas não afetaram a viabilidade e a morfologia das células embrionárias em cultura. Porém, Zarpelão (2014) demonstrou a ativação da enzima catalase após 12h de estresse a 30°C nestas células.

Em estudo desenvolvido por Clenilso e colaboradores (2007) com pinhões de *Araucaria angustifolia* em diferentes temperaturas de armazenamento (2, 10, 20, 30, 40 e 50°C) observou-se que a taxa respiratória aumentou consideravelmente com o aumento da temperatura, na faixa de temperatura de 2 a 37,1°C. Por outro lado, houve redução significativa da respiração com o aumento da temperatura de 37,1 para 50°C. Os autores também observaram que a germinação dos pinhões na temperatura de 20°C (~55% dos pinhões germinados aos 26 dias de armazenamento), foi reduzida em temperaturas menores (~1% e 21% de

germinação nas temperaturas de 2 e 10°C, respectivamente) ou maiores (9% e <1% de germinação nas temperaturas de 30°C e 40-50°C, respectivamente).

Não somente temperaturas elevadas interferem no desenvolvimento e fisiologia vegetal. Em baixas temperaturas algumas plantas podem sofrer grandes danos, principalmente nas membranas celulares, devido ao congelamento (YADAV, 2010).

Em trabalho de revisão sobre a tolerância de plantas ao congelamento Thomashow (1999) descreve que a aclimação ao frio induz a expressão de certos genes de proteínas que estabilizam as membranas contra danos induzidos pela formação de cristais de gelo. Sun e colaboradores (2016) verificaram o efeito da baixa temperatura (4 °C) em videiras (*V. amurensis* e *V. vinífera*) e observaram que houve um aumento na liberação de etileno. Os autores sugeriram que este hormônio tem um papel positivo na resposta ao estresse pelo frio na videira, devido ao aumento na expressão do gene *VaERF057*, envolvido na regulação da expressão de proteínas anticongelamento.

Em estudo para avaliar o efeito da temperatura em culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, Valente e colaboradores (2012) demonstraram que o estresse pelo frio (4°C durante 24 h ou 48 h) promoveu um estímulo na atividade da proteína desacopladora de plantas (PUMP), aumentando sua atividade em cerca de 45% e expressão em 40% em 24h e 150% em 48 h, Furlanetto (2014) demonstrou o aumento de 35% nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de 14 e 30% na lipoperoxidação de membranas de células embriogênicas de *A. angustifolia* estressadas pelo frio a 4 °C por 24 e 48h, respectivamente. Além disso, a autora demonstrou a redução da atividade da enzima catalase (CAT) e aumento na atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR) e inibição das NAD(P)H desidrogenases alternativas. Esses dois estudos demonstraram que o estresse pelo frio foi capaz de levar essas culturas a uma condição de estresse oxidativo.

## 2.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) – ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

O papel de ROS na sinalização celular vem sendo amplamente estudado. Segundo Bailey-Serres e Mittler (2006), ROS podem atuar no controle de processos como crescimento, desenvolvimento, resposta a estímulos ambientais bióticos e

abióticos, além de interferirem na expressão de diversos genes. Nas células, ROS podem regular uma infinidade de vias metabólicas (DALTON *et al.*, 1999; PITZSCHKE *et al.*, 2006).

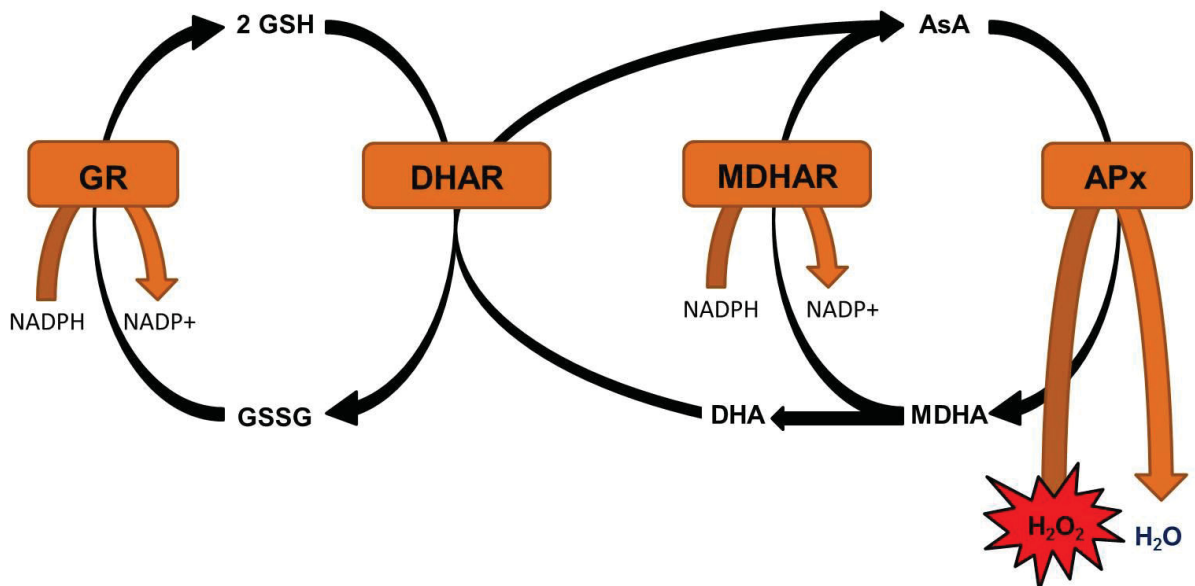
Em plantas, condições de estresse podem ocasionar o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (Navrot *et al.*, 2007). As mitocôndrias são alvos vulneráveis a danos induzidos por ROS, já que estão constantemente gerando estas espécies devido à incessante atividade da cadeia respiratória mitocondrial (BOVERIS e CHANCE, 1973; TURRENS, 1997). Além disso, as ROS podem causar danos oxidativos em outras biomoléculas, como por exemplo, aos lipídeos de membrana tendo como resultado a lipoperoxidação, o que pode desencadear a morte celular programada (MCP) (GILL e TUTEJA, 2010).

Como estresse se entende todo e qualquer fator que promova uma situação desvantajosa para a planta, sendo considerado um dos principais fatores limitantes para a produtividade e crescimento agrícola. Como as plantas estão expostas as condições ambientais, estão em contato constante com diferentes agentes estressantes que alteram o seu metabolismo, crescimento e produtividade (DAT *et al.*, 2000; KEEGSTRA e THOMASHOW, 2002; VRANOVÁ *et al.*, 2002; HOEBERICHTS e WOLTERING, 2003; NOGUEIRA, 2004). Estresses abióticos (salinidade, extremos de temperatura, radiação ultravioleta e osmolaridade) e estresses bióticos (patógenos) induzem a diferentes padrões de respostas nas plantas, uma vez que as células precisam se adaptar as novas condições (NOGUEIRA, 2004; REDDY *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005; PASTORE *et al.*, 2007).

Independentemente, se o estresse é biótico ou abiótico, as plantas possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para a proteção contra os efeitos deletérios das ROS. O mecanismo enzimático é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e outras quatro enzimas importantes que constituem o ciclo da Glutationa/Ascorbato (FIGURA 1): a Ascorbato peroxidase (APX), glutationa redutase (GR), Glutationa peroxidase (GPX), Glutationa S-transferase (GST), peroxidases (Prxs), dehidroascorbato redutase (DHAR) e monodehidroascorbato reductase (MDHAR) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; FOYER e NOCTOR, 2011).

O sistema não enzimático inclui a glutatona (GSH), ácido ascórbico (ASA), tocoferóis (TOC) e os compostos fenólicos (AHMAD *et al.*, 2008; JALEEL *et al.*, 2009). Vale ressaltar ainda que em mitocôndrias vegetais, estão presentes enzimas adicionais na cadeia respiratória em comparação as mitocôndrias animais, sendo: a Oxidase Alternativa (AOX), a proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP) e as NADP(H) desidrogenases alternativas. Estas enzimas, em especial, a AOX e PUMP contribuem para a redução dos níveis de ROS (VERCESI *et al.*, 1995). A AOX catalisa a oxidação do ubiquinol e a concomitante redução do O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, sem o bombeamento de prótons e, conseqüentemente, sem a síntese de ATP. Por sua vez, a PUMP favorece a reentrada de prótons na matriz mitocondrial, promovendo o colapso do gradiente eletroquímico de prótons e o aumento da velocidade do transporte de elétrons. Valente e colaboradores (2012) além de caracterizar a presença de AOX e PUMP em mitocôndrias de *A. angustifolia* sugeriram que a PUMP poderia contribuir para superar condições de estresse oxidativo devido a sua capacidade de controlar os níveis de ROS.

FIGURA 1 – CICLO GLUTATIONA/ASCORBATO



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Principais enzimas que compõem o ciclo glutatona/ascorbato: glutatona redutase (GR), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato reductase (MDHAR) e Ascorbato peroxidase (APx). GSH – glutatona reduzida, GSSG – glutatona oxidada, ASA - ácido ascórbico; DHA - Dehidroascorbato, MDHA – Monodehidro ascorbato.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

HEPES, EGTA, EDTA, ácido glutâmico, ácido málico, NADH, FCCP, BSA livre de ácidos graxos, epinefrina, cisteína, ácido L-ascórbico, glutatona reduzida, ascorbato oxidase, NADPH, glutatona oxidada, Triton X-100, MTT, Kit Amplex Red, tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, glicina, L-glutamina, mio-inositol e Gelrite® foram adquiridos da Sigma Aldrich® (EUA). Sacarose, molibdato de sódio, sulfato de manganês, sulfato de ferro, DMSO e outros reagentes utilizados, com alto grau de pureza, foram adquiridos da Merck® do Brasil. Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura obtida em purificador Millipore MilliQ®.

#### 3.2 CULTIVO DAS LINHAGENS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*

As linhagens celulares SE1 e SE6 foram doadas pela professora Dra. Eny lochevet Segal Floh (IBUSP), cultivadas em incubadora a  $25 \pm 1$  °C no escuro, com repiques a cada 21 dias, conforme descrito por Jo *et al.* (2014). O meio de cultura utilizado foi o MSG básico (BECWAR *et al.*, 1989), suplementado com sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>), L-glutamina (1,46 g.L<sup>-1</sup>), mio-inositol (0,1 g.L<sup>-1</sup>) Macronutrientes (50 ml.L<sup>-1</sup>), Micronutrientes (10 ml.L<sup>-1</sup>), Ferro (5 ml.L<sup>-1</sup>) e vitaminas (10 ml.L<sup>-1</sup>) solidificados em Gelrite® (Sigma Aldrich).

#### 3.3 CONDIÇÕES DE ESTRESSE

As Células embriogênicas de *A. angustifolia* (SE1 e SE6) foram expostas ao estresse pelo calor de  $30 \pm 1$ °C em incubadora (TECNAL TE-420), por um período de 24, 48 e 72 horas na ausência de luz. As linhagens do grupo controle foram mantidas em incubadora a temperatura de  $25 \pm 1$ °C, também no escuro.

#### 3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A avaliação da morfologia celular foi realizada após coloração com carmim acético 1% (p/v) e azul de Evans 0,5% (p/v) (GUPTA e DURZAN, 1987; VALENTE *et*

*al.*, 2012), durante 3 minutos. Em seguida, o corante em excesso foi retirado, a massa celular foi centrifugada (2000 x g) por 5 min a 4 °C e lavada três vezes em tampão PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,2, NaCl 136,9 mM, KCl 2,7 mM). Após a lavagem as células foram analisadas usando microscópio Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss). As células embrionárias são reativas ao carmim acético, corando-se em vermelho; já as células suspensoras são permeáveis ao azul de Evans, corando-se em azul (STEINER *et al.*, 2005; ASTARITA e GUERRA, 2000).

### 3.5 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das células de *A. angustifolia* foi determinada inicialmente através do ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio. Este composto é reduzido, por desidrogenases de células viáveis, a formazan que pode ser quantificado a 570 nm (MOSMANN, 1983). Para o ensaio, 330 mg de células (peso fresco) foram incubadas por 8 h no escuro a 25 °C com tampão PBS e MTT 1,25 mM. Em seguida, para a extração dos cristais de formazan, o meio de reação foi desprezado e adicionado 1,5 mL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 1% (p/v) em metanol a 50% (v/v), seguindo-se incubação por 30 min a 60 °C para solubilização dos cristais. Após a incubação, o material foi centrifugado (9000 x g) por 5 min a temperatura ambiente e a absorbância do sobrenadante foi determinada em leitor de microplacas (BioTek EPOCH), em comprimento de onda de 570 nm (CASTRO-CONCHA *et al.*, 2006). Os resultados foram expressos como percentagem em relação ao controle (100%).

Como segundo método para avaliar a viabilidade utilizou-se a coloração com Diacetato de fluoresceína (FDA) e Iodeto de Propídio (PI). O FDA é um composto apolar capaz de penetrar nas células vegetais e, quando internalizado, é hidrolisado por esterases, emitindo fluorescência de cor verde (JONES e SENFT, 1985; HUANG *et al.*, 1986; VALENTE *et al.*, 2012). Por sua vez o PI tem a capacidade de se intercalar no DNA apenas de células inviáveis, mortas ou em processo de morte, emitindo fluorescência de cor vermelha. Para a análise de viabilidade por coloração com PI/FDA as células (500 mg - peso fresco) foram incubadas com PI (5 µg/ml) e FDA (2,5 µg/ml) por 15 min a 25 °C em incubadora, na ausência de luz. Em seguida as suspensões celulares foram centrifugadas (2000 x g) por 5 min a 4 °C, lavadas

três vezes em tampão PBS e analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando filtros verde e violeta em microscópio Axiovert CFL 40 (Carl Zeiss).

Para os controles de morte celular, tanto para o MTT como para o FDA/PI, as células passaram por três ciclos de congelamento e fervura, seguindo-se a metodologia descrita para cada ensaio.

### 3.6 NÍVEIS DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada utilizando-se o kit Amplex Red Peróxido de hidrogênio/peroxidase (*Molecular Probes*<sup>®</sup>), de acordo com instruções do fabricante. As células (400 mg de peso fresco) foram lisadas em nitrogênio líquido, adicionando-se em seguida 1 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5), seguindo-se centrifugação por 10000 x g, por 10 min a 4 °C (Wu *et al.*, 2012). Foram retirados 50 µl do sobrenadante que foram incubados com igual volume de tampão de reação contendo 100 µM Amplex<sup>®</sup> Red e 0,2 U/mL de peroxidase, durante 30 min a 25 °C, na ausência de luz. A fluorescência foi determinada a partir da oxidação do reagente Amplex Red por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos comprimentos de onda de 571 nm de excitação e 585 nm de emissão. Ainda a concentração do peróxido (nmol/mg de célula (peso fresco) foi determinada com base em curva padrão do peróxido nas concentrações de 0,05 µM a 0,6 µM. Os resultados estão expressos como percentagem em relação ao controle (100%).

### 3.7 LIPOPEROXIDAÇÃO

A peroxidação lipídica foi estimada através da determinação dos níveis de malondialdeído (MDA), produto da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (HODGES *et al.*, 1999; HEATH e PACKER, 1968). As células de *A. angustifolia* (1 g - peso fresco) foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas. Em seguida foram homogeneizadas em 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,5% e centrifugadas (19000 x g) por 20 min. Para 0,5 mL do sobrenadante foram adicionados 2,5 mL de TCA a 20% contendo de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) a 0,5%. Em seguida as amostras foram fervidas em banho-maria por 30 min. Após esse tempo, as amostras foram transferidas para banho de gelo e, após o resfriamento, foram centrifugadas a (10000 x g por 10 min). A absorbância foi determinada a 535

nm e 600nm. Os valores de absorvância a 600nm correspondem a compostos inespecíficos e, por este motivo, foram subtraídos dos valores de 535nm referentes a absorvância do aduto TBA/MDA. As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram quantificadas considerando o valor do coeficiente de extinção molar do aduto TBA/MDA ( $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (HALLIWELL *et al.*, 2000).

### 3.8 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para a determinação da atividade da peroxidase utilizou-se o kit Amplex Red Peróxido de hidrogênio/peroxidase (*Molecular Probes*®), de acordo com instruções do fabricante. As células foram lisadas (400 mg - peso fresco) em nitrogênio líquido em 1 mL de tampão fosfato de sódio 20mM (pH 6,5), seguindo-se centrifugação (10000 x g) por 10 min a 4 °C. Foram retirados 50 µl do sobrenadante que foi incubado com 50 µl de tampão contendo Amplex® Red 100 µM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2mM, durante 30 min a 25 °C, na ausência de luz. A fluorescência, decorrente da oxidação do reagente Amplex Red por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi determinada utilizando comprimentos de onda de 560 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os resultados estão expressos como percentagem em relação ao controle (100%).

Para determinar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) 2,5 g de células (peso fresco) foram lisadas em nitrogênio líquido em 5 mL de meio de extração constituído de fosfato de sódio 100 mM (pH 7,8), EDTA 1 mM, polivinilpirrolidona 2% (PVPP) e Triton X-100 0,1%. Esta suspensão foi centrifugada (22000 x g) por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado e foi centrifugado novamente (22000 x g) por 10 min a 4°C. O novo sobrenadante foi coletado e dialisado por 4 h em tampão de extração (sem PVPP), com troca do tampão de extração a cada 1 h. Em seguida, a atividade da enzima foi monitorada a 30 °C em 1 mL de meio de reação constituído de tampão bicarbonato 50 mM (pH 9,8), EDTA 0,1 mM e epinefrina 0,3 mM. A oxidação da epinefrina a adrenocromo foi monitorada a 480 nm, durante 5 min. A atividade da SOD foi expressa em unidades, em que uma unidade de SOD corresponde a 50% de inibição da oxidação da epinefrina (VERMA e DUBEY, 2003; VALENTE *et al.*, 2012).

Para a realização dos ensaios das demais enzimas, as células (0,5 g peso fresco) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão específico para cada enzima avaliada (SHOHAEL *et al.*, 2006), em nitrogênio líquido, utilizando gral e pistilo. Em

seguida, a solução obtida foi filtrada em quatro camadas de gaze e centrifugada a 22000 x g por 20 min a 4 °C. Quando necessário, o sobrenadante foi submetido a nova centrifugação, nas mesmas condições até a obtenção de uma solução límpida (SHOHAEL *et al.*, 2006). Esta solução foi utilizada como a fonte de enzima. A concentração de proteína no sobrenadante foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para avaliação da atividade das enzimas dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR) e ascorbato peroxidase (APx) as linhagens celulares foram homogenizadas em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) acrescido de ascorbato 5 mM, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 1 mM e glicerol (10%) (SHOHAEL *et al.*, 2006). Os ensaios foram realizados em cubetas de quartzo, a 25 °C em volume final de 1 mL. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro.

Para determinação da atividade da APx utilizou-se tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), ácido L-ascórbico (ASA) 0,25 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,5 mM. A redução da absorbância a 290 nm foi monitorada por 5 min e a atividade da enzima foi determinada pelo utilizando o coeficiente de extinção molar do ASA (2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (SHOHAEL *et al.*, 2006; MURSHED *et al.*, 2008).

A atividade da DHAR foi monitorada através da redução do dehidroascorbato a 290 nm por 5 minutos (DOULIS *et al.*, 1997), utilizando 1 mL de meio de reação constituído de tampão HEPES 50 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 2,5 mM e DHA a 0,2 mM (SHOHAEL *et al.*, 2006). A atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do DHA (14 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (MURSHED *et al.*, 2008).

Para a determinação da atividade da enzima MDHAR, monitorou-se por 5 min a diminuição da absorbância 340 nm devido oxidação do NADH, em meio de reação contendo tampão HEPES 50 mM (pH 7,6), ASA 2,5 mM, NADH 0,25 mM e ascorbato oxidase 20 U/mL (SHOHAEL *et al.*, 2006; MIYAKE e ASADA, 1992; MURSHED *et al.*, 2008). A atividade foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do NADH (6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (MURSHED *et al.*, 2008).

Para determinação da atividade das enzimas catalase (CAT) e glutatona redutase (GR) as células foram homogeneizadas em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) contendo EDTA 1mM (SHOHAEL *et al.*, 2006) em nitrogênio líquido.

A atividade da CAT foi determinada de acordo com Aebi (1984), pela decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  monitorada a 240 nm, em meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7), EDTA 100 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM. O volume final foi de 3mL e a temperatura 20 °C. O coeficiente de extinção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) foi usado para calcular a atividade de CAT (MURSHED *et al.*, 2008).

A atividade da GR foi determinada em meio de reação contendo tampão HEPES 50 mM (pH 8,0), EDTA 0,5 mM, NADPH 0,25 mM e glutathiona oxidada (GSSG) 0,5 mM. A absorbância foi monitorada a 340 nm e a atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção do NADPH ( $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (MURSHED *et al.*, 2008).

### 3.9 RESPIRAÇÃO CELULAR

Para o ensaio de respiração, as células (150 mg - peso fresco) de células foram homogeneizadas (10 vezes) em homogenizador van Potter em 1 mL de meio de reação contendo sacarose 0,25 M, EGTA 0,25 mM, BSA a 0,2% e HEPES 10 mM (pH 7,2) (MARIANO *et al.*, 2008; VALENTE *et al.*, 2012). A respiração celular foi determinada em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k- Oroboros®), em câmaras de 2 mL, temperatura de 28 °C e agitação constante. Nos ensaios foram utilizados 1 mL da suspensão celular correspondente a 150 mg (peso fresco) de células em volume final de 2 mL. Como substratos oxidáveis foram utilizados Glutamato 10mM e Malato de sódio 10mM. Foram adicionados: o desacoplador FCCP ( $0,5 \mu\text{M}$ ) e os inibidores ácido salicilhidroxâmico (SHAM) 4 mM e a antimicina A (AA)  $0,5 \mu\text{M}$ . Os resultados foram expressos como fluxo de oxigênio em pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células).

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  desvio padrão da média (média  $\pm$  dp) e foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados com significância de  $p \leq 0,05$ .

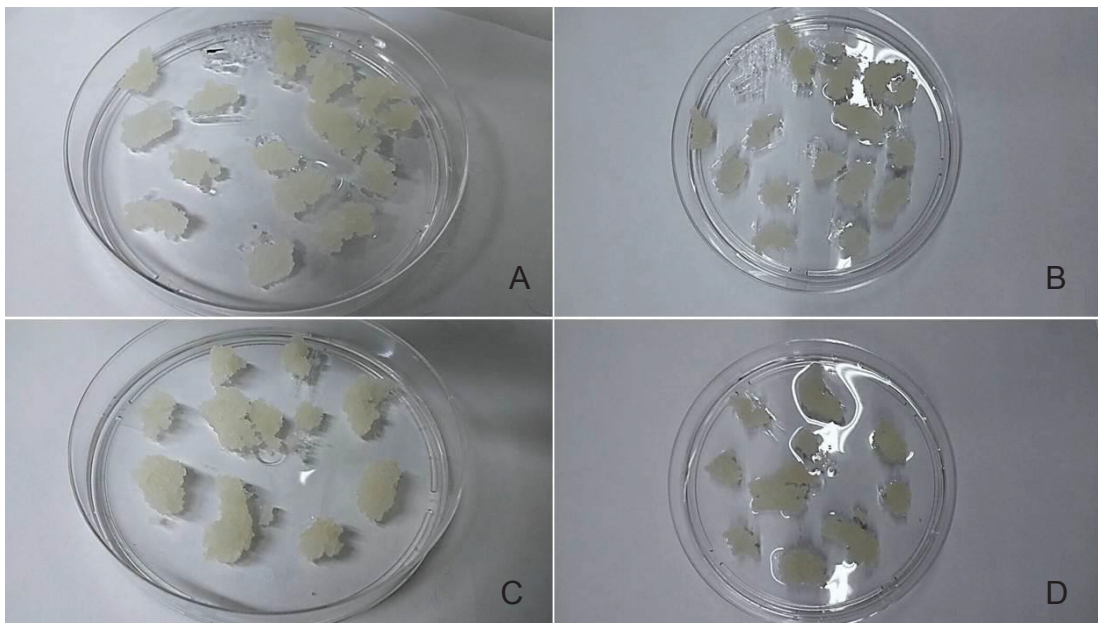
## 4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

### 4.1 MORFOLOGIA CELULAR

Na Figura 2 estão mostradas as culturas SE1 e SE6, destacando suas características macroscópicas. Os agregados celulares ou massa pró-embriônica (PEM) tem aspecto branco-translúcido, o qual está associado com a competência proliferativa destas células (GUERRA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002 e 2008). Por outro lado, quando este aspecto é substituído por uma coloração escura de tom marrom, o cultivo é interrompido, pois esta característica está associada à redução da capacidade proliferativa destas células (GUERRA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002 e 2008).

A avaliação microscópica da morfologia celular foi realizada após coloração com carmim acético 1% (p/v) e azul de Evans 0,5% (p/v) (GUPTA e DURZAN, 1987; VALENTE *et al.*, 2012). As células embrionárias são reativas ao carmim acético apresentando coloração vermelha, já as células suspensoras são permeáveis ao azul de Evans (SILVEIRA *et al.*, 2006). Sendo as células embrionárias associadas com a competência para o desenvolvimento celular (STEINER *et al.*, 2005).

FIGURA 2 - ASPECTOS MACROSCÓPICOS DE CULTURAS SE1 E SE6 de *A. angustifolia*

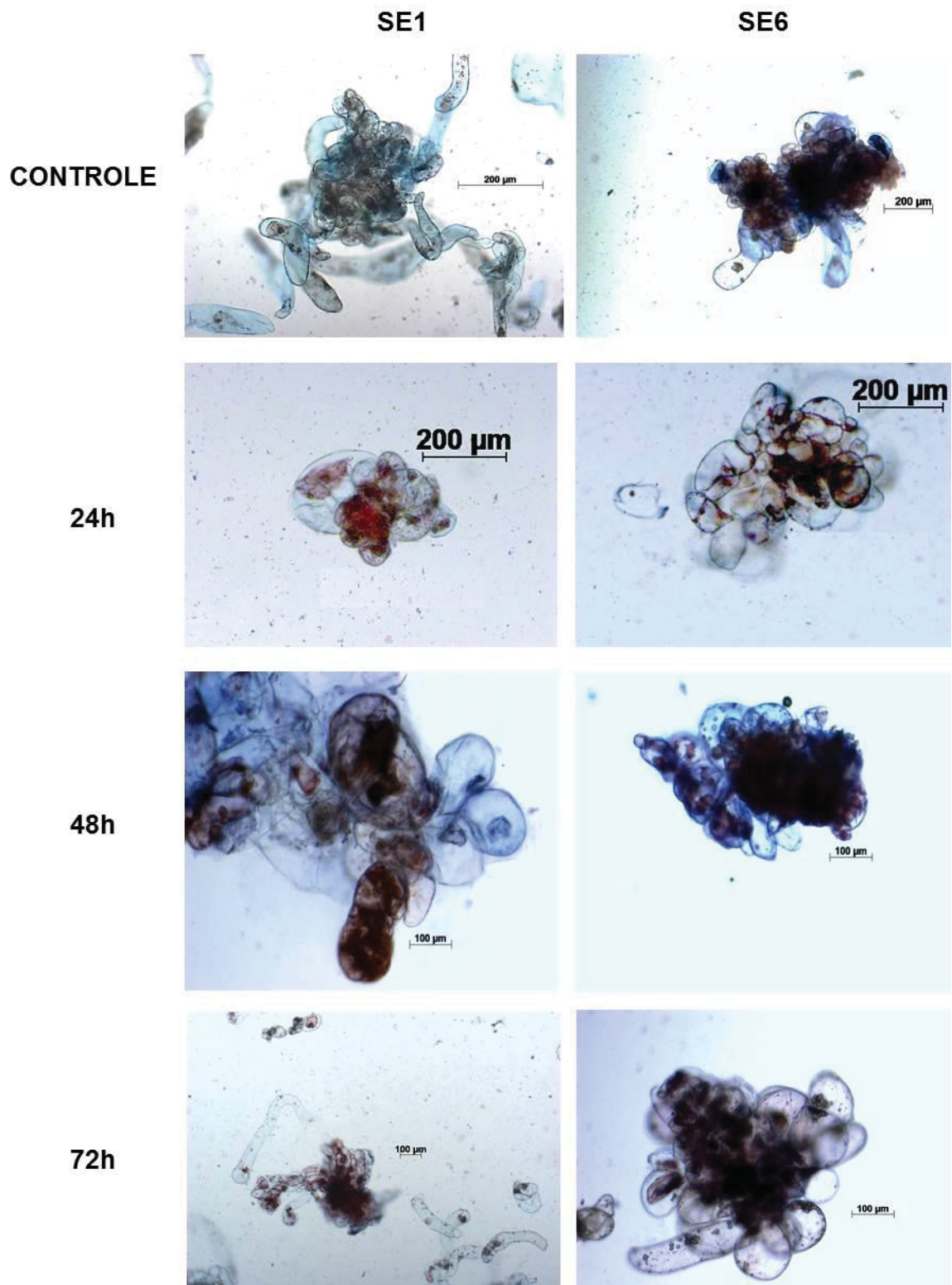


FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Vista macroscópica das linhagens SE1 e SE6 com 15 dias de cultura. A, B: Vista macroscópica da linhagem SE1; C, D: Visão macroscópica da linhagem SE6.

Os resultados dos ensaios de morfologia mostram que o estresse pelo calor ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ), em todos os tempos avaliados, aparentemente, não alterou a morfologia das linhagens SE1 e SE6, uma vez que tanto as células embrionárias como as suspensoras apresentaram características morfológicas semelhantes as do grupo controle, cultivadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (FIGURA 3).

São poucos os trabalhos que avaliam o estresse por temperatura em culturas de *A. angustifolia*. Valente e colaboradores (2012) demonstraram que não houve alteração na morfologia de células de *A. angustifolia*, não caracterizadas quanto à diferenciação, após a exposição das culturas ao frio de  $4^\circ\text{C}$  por 24 ou 48h. No entanto, houve um aumento da atividade e expressão da proteína desacopladora de plantas (PUMP) após o estresse. Furlanetto (2014) também observou a ausência de alterações na morfologia destas células, nas mesmas condições. No entanto, houve um aumento da lipoperoxidação e alteração da atividade de enzimas antioxidantes: redução da atividade da enzima catalase e aumento da atividade da ascorbato peroxidase (APx) e dehidroascorbato redutase (DHAR). Somando-se a estes resultados, a autora também demonstrou que o estresse induzido pelo frio reduziu a atividade das NAD(P)H desidrogenases alternativas externas, presentes na cadeia respiratória. Em conjunto, os resultados destes estudos sugerem que a ausência de alterações morfológicas não exclui outros efeitos do estresse.

FIGURA 3 - MORFOLOGIA DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*

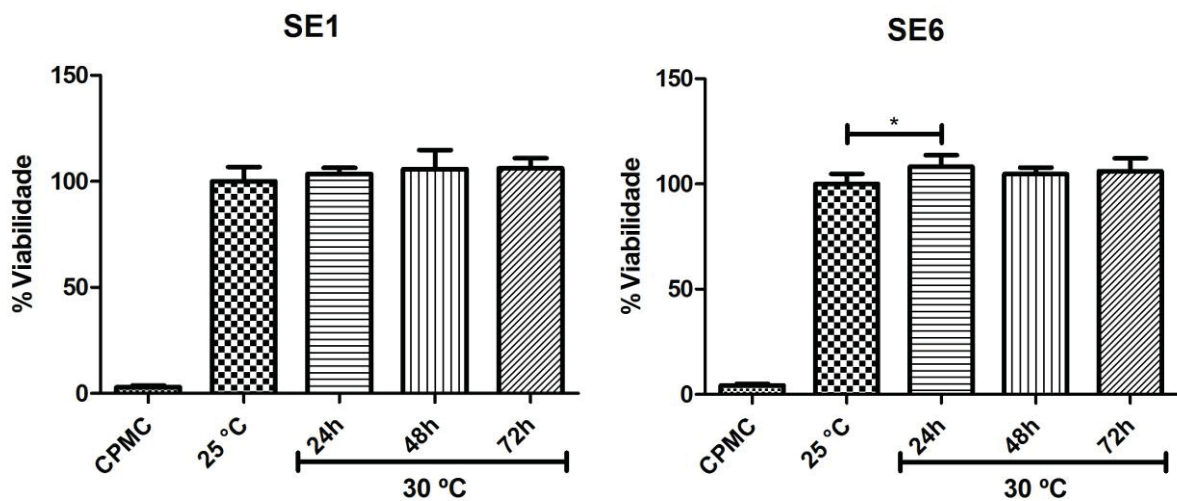
FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Visualização microscópica das linhagens SE1 e SE6 de células de *A. angustifolia* (15 dias de cultura) coradas com azul de Evans e Carmim acético. Dois tipos de células são identificados; células embrionárias, que são menores, agrupadas em agregados de células e coradas em vermelho, e células suspensoras, que são alongadas, vacuoladas e coradas em azul. Controle = células cultivadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Condições de estresse  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24, 48 e 72h.

## 4.2 VIABILIDADE

Para avaliar os efeitos do aumento temperatura sobre a viabilidade das células embriogênicas de *A. angustifolia* utilizou-se o método MTT descrito por Castro-Concha e colaboradores (2005). Neste ensaio, células submetidas a ciclos de congelamento-fervura foram usadas como controle positivo da morte celular. Os resultados (FIGURA 4) mostram que a viabilidade celular não foi afetada pelo estresse pelo calor ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por 24, 48 ou 72h, em comparação ao grupo de controle ( $25^\circ\text{C}$ ). Resultados semelhantes, mas após a exposição das culturas ao frio, foram encontrados por Valente e colaboradores (2012) e Furlanetto (2014). Os autores demonstraram que a manutenção das culturas a  $4^\circ\text{C}$  durante 24 ou 48h não promoveu alterações na viabilidade de células embriogênicas de *A. angustifolia*, não caracterizadas quanto à diferenciação.

FIGURA 4 - EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR NA VIABILIDADE DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia* - MÉTODO DO MTT



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT como descrito no item 3.5 da seção de Materiais e métodos. CPMC: controle positivo de morte celular (células submetidas a três ciclos de congelamento e fervura); Controle: células cultivadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . A condição e tempos de estresse  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  estão especificados no gráfico. Os resultados, expressos como % do controle, representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes em duplicata. \* Valores estatisticamente diferentes do Controle  $p < 0,05$ .

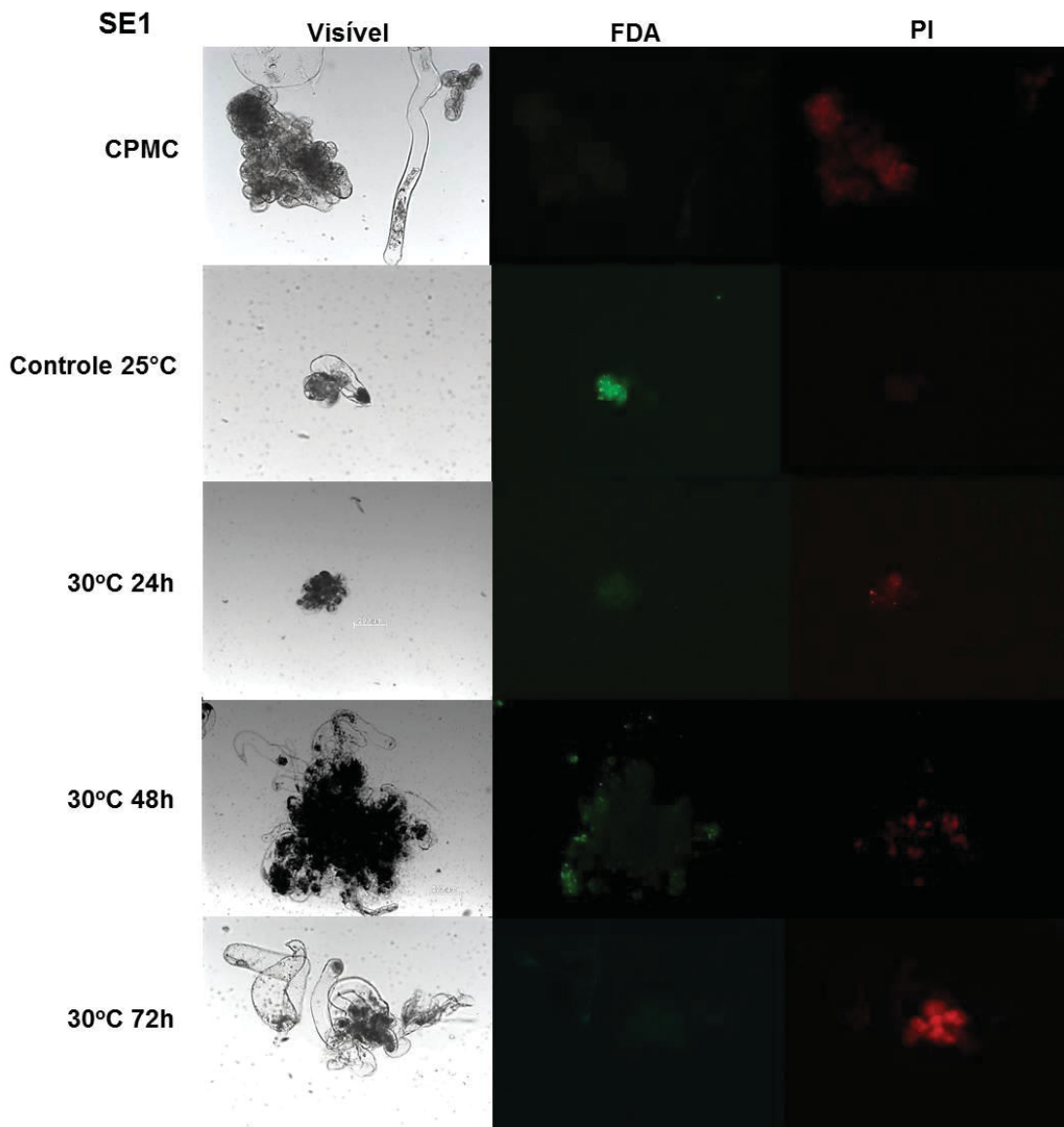
Porém, na Figura 4 observa-se que no tempo de 24h, a viabilidade das células SE6 (bloqueadas à maturação) do grupo controle ( $25^\circ\text{C}$ ) foi aparentemente

maior (~8%) em relação ao mesmo grupo das células SE1 (responsivas à maturação). Para interpretar este resultado é importante considerar o princípio do método utilizado, que se baseia na redução do MTT a formazam por desidrogenases de células metabolicamente ativas (CASTRO-CONCHA *et al.*, 2006, CASTRO-CONCHA *et al.*, 2012). Assim, este aparente aumento da viabilidade das células SE6 em comparação a SE1 pode refletir apenas um aumento da atividade das desidrogenases destas células, e não necessariamente sua viabilidade. Para esclarecer estes resultados optou-se por realizar um segundo ensaio de viabilidade utilizando iodeto de propídeo (PI) e diacetato de fluoresceína (FDA). O PI, em células inviáveis ou em processo de morte, pode ser internalizado e se intercalar no DNA, emitindo fluorescência de cor vermelha. Já o FDA por ser apolar, é internalizado em células viáveis e ao sofrer hidrólise pela ação de esterases, emite fluorescência de cor verde (JONES e SENFT, 1985; HUANG *et al.*, 1986). As imagens de microscopia estão representadas nas figuras 5 e 6. Neste estudo, para fins de clareza, optou-se por demonstrar estes resultados como a razão da fluorescência de FDA/PI, considerando que quanto maior o valor desta razão maior é o número de células viáveis (BOYD *et al.*, 2008).

Os resultados da tabela 1 e das figuras 5 e 6 mostram alterações significativas na viabilidade das linhagens de *A. angustifolia* estressadas pelo calor ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Para SE1 observa-se uma redução da viabilidade (~50%), já partir de 24h de estresse, que se manteve em 48 e 72h. Para a linhagem não responsiva à maturação (SE6), os efeitos do estresse foram menos pronunciados e observados somente após 48 e 72h de exposição, com uma redução da viabilidade de ~45%. Estes resultados estão em desacordo com os de viabilidade pelo método do MTT, que não evidenciaram reduções da viabilidade nas culturas submetidas ao estresse (Figura 4). No entanto, deve-se considerar que, como já mencionado, os métodos têm princípios diferentes. Enquanto que o método do MTT se baseia na atividade de desidrogenases celulares, o ensaio utilizando FDA e PI baseia-se na integridade das membranas celulares. Assim, a ausência de efeitos sobre a viabilidade pelo método do MTT pode ser decorrência de uma ativação de vias metabólicas em resposta ao estresse. É importante ressaltar que métodos baseados na quantificação da fluoresceína (proveniente da hidrólise do FDA), para determinar a viabilidade de células vegetais são bem aceitos na literatura, incluindo em *A. angustifolia* (VALENTE *et al.*, 2012, ZAHRA *et al.*, 2014; MAURER *et al.*, 2010; HUANG *et al.*,

1986; BERGLUND *et al.*, 1987). Particularmente em relação ao estresse, Zahra et al (2014) demonstraram que o estresse salino (300 mM/21 dias) em plântulas de diferentes genótipos (Yerong e Gairdner) de *Hordeum vulgare* causou a perda de função e morte celular, que foram comprovadas pela redução do sinal de fluorescência.

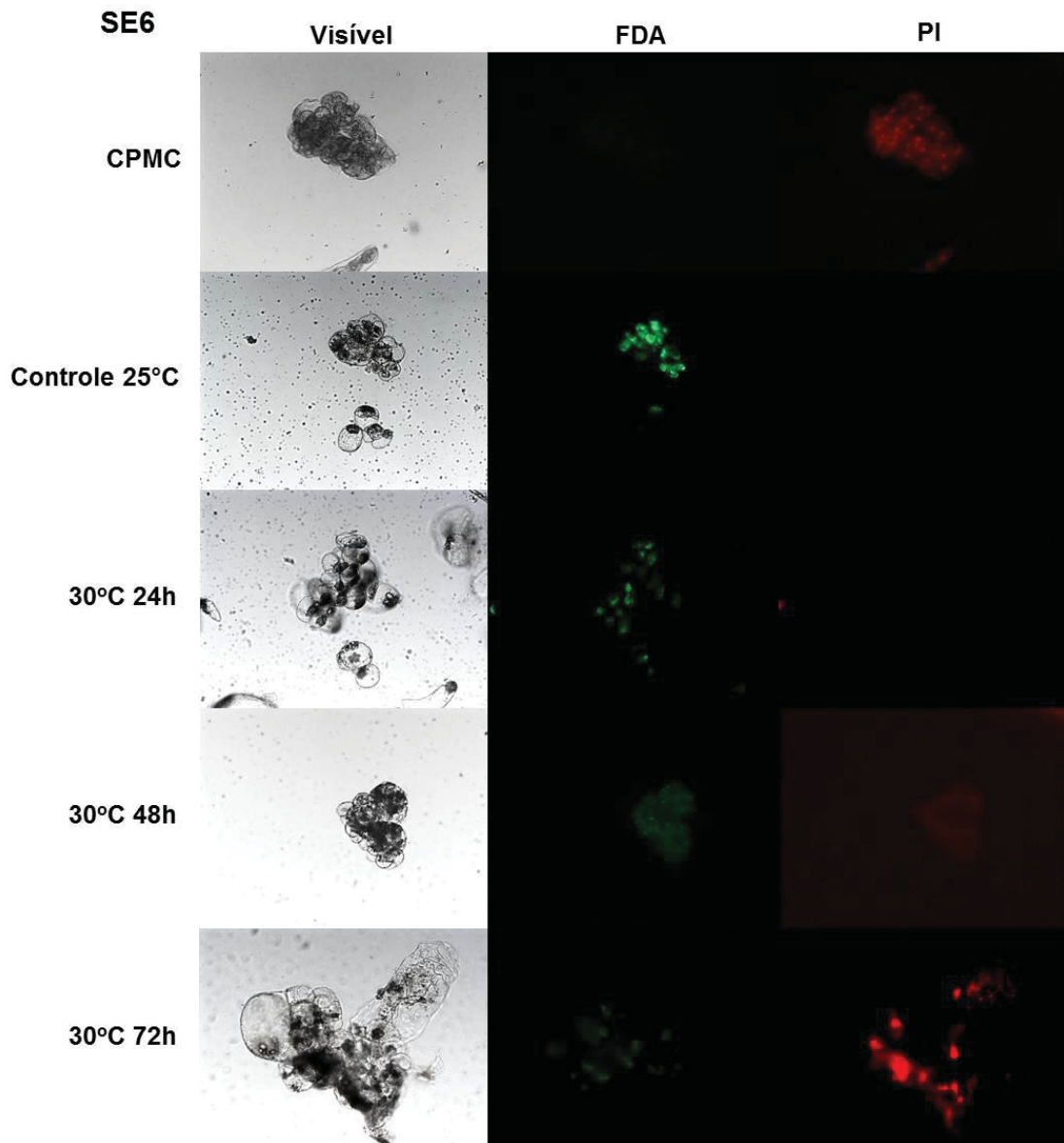
FIGURA 5 - EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR NA VIABILIDADE DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS SE1 DE *A. angustifolia* - MÉTODO FDA/PI



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: A viabilidade das células de SE1 por coloração com PI/FDA foi determinada como descrito no item 3.5 da seção de Materiais e métodos. Painel da esquerda: microscopia de contraste de fase; painel central e da direita – microscopia de fluorescência (PI – cor vermelha e FDA – cor verde). CPMC: controle positivo de morte celular (células submetidas a três ciclos de congelamento e fervura); Controle: células cultivadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A condição e tempos de estresse  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  estão especificados na imagem. As imagens foram capturadas em microscópio Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss).

FIGURA 6 – EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR NA VIABILIDADE DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS SE6 DE *A. angustifolia* - MÉTODO FDA/PI



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: A viabilidade das células de SE6 por coloração com PI/FDA foi determinada como descrito no item 3.5 da seção de Materiais e métodos. Painel da esquerda: microscopia de contraste de fase; painel central e da direita – microscopia de fluorescência (PI – cor vermelha e FDA – cor verde). CPMC: controle positivo de morte celular (células submetidas a três ciclos de congelamento e fervura); Controle: células cultivadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A condição e tempos de estresse  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  estão especificados na imagem. As imagens foram capturadas em microscópio Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss).

TABELA 1 – EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR NA VIABILIDADE DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia* - MÉTODO FDA/PI

	CPMC		Controle		24 h Estress		48 h Estress		72 h Estress	
	SE1	SE6	SE1	SE6	SE1	SE6	SE1	SE6	SE1	SE6
<b>RAZÃO FDA/PI (%)</b>	6±1	17±4	100±24	100±19	50±14***	95±21	47±13***	55±9***	34±13***	69±18**

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: A viabilidade celular foi determinada utilizando FDA e PI como descrito no item 3.5 da seção de Materiais e métodos. CPMC: controle positivo de morte celular (células submetidas a três ciclos de congelamento e fervura); Controle: células cultivadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A condição e tempos de estresse  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  estão especificados na tabela. Os resultados, expressos como % do controle, representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes em duplicata. Para SE1 100% corresponde a fluorescências de 6,791 UA, e para SE6 100% corresponde a fluorescências de 2,909 UA. Valores estatisticamente diferentes do Controle \*\*\* $p < 0,0001$ . \*\* $p < 0,0001$ .

Uma vez que o estresse pelo calor ( $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) afetou a viabilidade das linhagens SE1 e SE6 (TABELA 1) (FIGURAS 5 e 6), ensaios foram realizados para determinar se a perda da viabilidade estaria relacionada ao aumento de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma vez que é conhecida a relação entre o aumento dos níveis de ROS e a indução de morte celular (TAYLOR *et al.*, 2005). Os resultados destes ensaios são apresentados a seguir.

#### 4.3 NÍVEIS DE $\text{H}_2\text{O}_2$

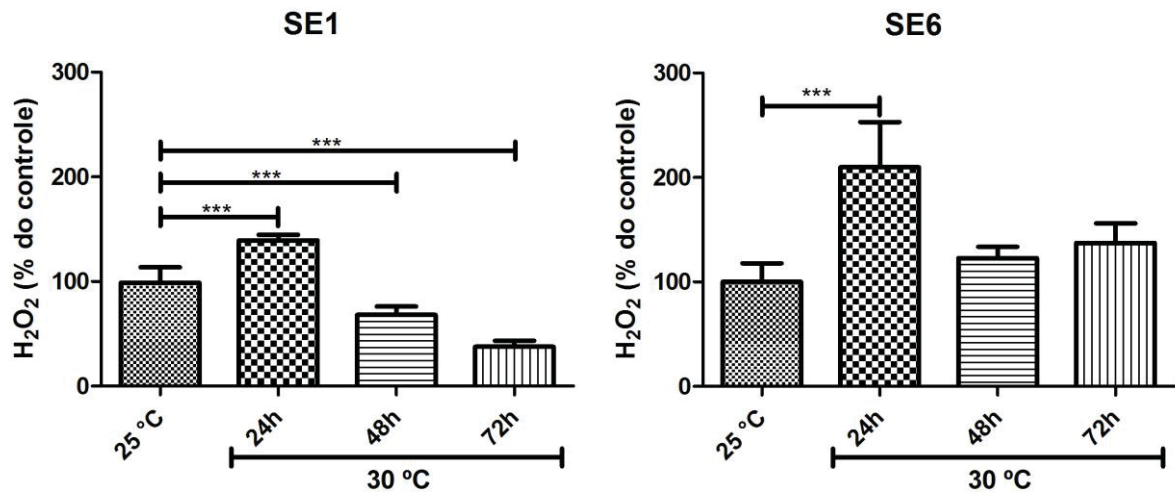
Para valiar os níveis de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) utilizou-se o reagente Amplex<sup>®</sup> Red, que na presença da peroxidase (HRP) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  se oxida a resofurina, que uma vez excitada a 571 nm emite fluorescência em 585 nm.

Em culturas embriogênicas de *A. angustifolia* das linhagens SE1 e SE6, submetidas ao estresse pelo calor ( $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por 24h, observou-se um aumento significativo nas quantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de ~41% para a linhagem SE1, e ~110% para a linhagem SE6 (FIGURA 7).

Como mencionado, condições de estresse podem resultar em aumento de ROS em plantas (NAVROT *et al.*, 2007). Do mesmo modo, o aumento da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  está diretamente relacionado com a morte celular programada (MCP) (APEL e HIRT, 2004; DESIKAN *et al.*, 1998; LEVINE *et al.*, 1994; SOLOMON *et al.*, 1999), uma vez que em presença de metais de transição, como ferro ou cobre,

pode levar a formação do radical hidroxila ( $^{\circ}\text{OH}$ ) através da Reação de Fenton. O  $^{\circ}\text{OH}$  é muito reativo e extremamente danoso às células, podendo desencadear processos de lipoperoxidação e MCP (MØLLER *et al.*, 2007; KARUPPANAPANDIAN *et al.*, 2011; SANCHEZ-CASAS e KLESSEG, 1994; VAN BREUSEGEM *et al.*, 2001).

FIGURA 7 - NÍVEIS DE  $\text{H}_2\text{O}_2$  DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS ESTRESSADAS A  $30^{\circ}\text{C}$



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram determinados pelo método descrito no item 3.6 da seção de Materiais e métodos. Controle: células cultivadas a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A condição e tempos de estresse  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  estão especificados no gráfico. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes em duplicata. Os resultados, expressos como  $\text{H}_2\text{O}_2$  % do controle, representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes em duplicata. Para SE1 100% corresponde a 11,9 nM  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{mg}$  de células (peso fresco), e para SE6 100% corresponde a 56,9 nM  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{mg}$  de células (peso fresco). \*\*\* Valores estatisticamente diferentes do Controle  $p < 0,0001$ .

Para populações de azevém perene (*Lolium perenne* L.) expostas ao estresse pelo calor ( $40/36^{\circ}\text{C}$  – dia/noite) por 14 dias, Soliman e colaboradores (2011), também demonstraram níveis elevados de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os autores sugeriram que o estresse oxidativo decorrente do aumento de temperatura é um dos fatores determinantes, que causa elevação nos níveis de ROS, que é o principal causador de danos nas populações de azevém perene.

Em *Araucaria angustifolia* Furlanetto (2014) demonstrou o aumento dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em células embriogênicas de *A. angustifolia*, não caracterizadas quanto à diferenciação, estressadas pelo frio ( $4^{\circ}\text{C}$  por 24h e 48h). Valente e colaboradores (2012) também demonstraram que o estresse pelo frio ( $4^{\circ}\text{C}$  durante

24 h e 48 h) promoveu aumento dos níveis de ROS em mitocôndrias isoladas destas mesmas culturas.

Para o sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), Djanaguiraman e colaboradores (2010) investigaram se o selênio poderia minimizar os efeitos do estresse oxidativo pelo calor (40/30 °C – dia/noite). Como resultados, os autores demonstraram que as plantas tratadas com o selênio tiveram as defesas antioxidantes aumentadas e também uma redução dos níveis de radicais superóxido e da lipoperoxidação. Ao contrário, plantas não tratadas apresentaram um aumento de 124% nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e significativos danos as membranas celulares.

No presente estudo, nos tempos prolongados de exposição ao calor, de 48 e 72h, para a linhagem SE6 não houve diferença significativa nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, havendo apenas uma discreta tendência de aumento. Já para a linhagem SE1, observa-se na Figura 7 uma diminuição significativa nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de ~32 e ~63% em relação ao controle, para 48 e 72 h, respectivamente. Esta redução pode estar associada à ativação dos sistemas antioxidantes destas células (ABIKO *et al.*, 2005; ALMESELMANI *et al.*, 2006; NAGESH BABU e DEVRAJ, 2008) nestes tempos de exposição. Neste contexto, trabalhos relatam que o aumento dos níveis de ROS favorece a tradução e expressão de genes relacionados ao choque térmico (KÖNIGSHOFER *et al.*, 2008). Níveis elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estão associados à expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo em tomate e *Arabidopsis* (VOLKOV *et al.* 2006; MILLER e MITTLER, 2006).

A diferença nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre as linhagens SE1 e SE6 pode estar relacionada com modificações na atividade das peroxidases, assim, a atividade destas enzimas foi avaliada frente às condições de estresse, sendo os resultados apresentados a seguir.

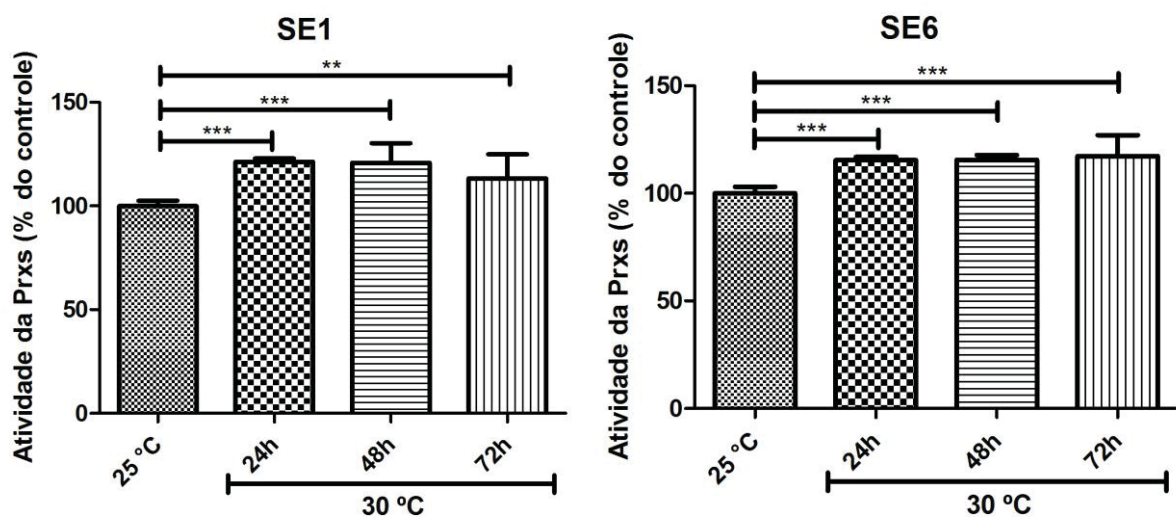
#### 4.4 ATIVIDADE DAS PEROXIDASES

As peroxidases podem ser encontradas em fungos, bactérias, plantas e animais. As peroxidases de plantas (Classe III) estão localizadas na parede celular e nos vacúolos. Estas enzimas são classificadas de acordo com suas estruturas e propriedades catalíticas, sendo que nas plantas são denominadas da Classe III. As peroxidases catalisam reações de oxirredução, nas quais o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é o aceptor de elétrons. Estas enzimas participam de uma diversidade de reações e processos

fisiológicos e em função disto, existem várias isoenzimas (PASSARDI *et al.*, 2005; HIRAGA *et al.*, 2001; INUPAKUTITA *et al.*, 2016; PASSARDI *et al.*, 2005; HIRAGA *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2014).

Para as linhagens SE1 e SE6 estressadas a 30 °C por 24, 48 e 72 h (FIGURA 8), houve um aumento significativo da atividade destas enzimas em ~20%. Não houve diferença significativa entre os tempos de estresse para as duas linhagens. O aumento da atividade das Prxs poderia ser uma resposta celular ao aumento dos níveis de peróxido em 24h nas duas linhagens. No entanto, como este aumento foi da mesma magnitude nas duas linhagens, não parece, isoladamente, ser responsável pela redução dos níveis de peróxido nas células SE1.

FIGURA 8 - ATIVIDADE DAS PRXS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS ESTRESSADAS A 30°C



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: A atividade das Prxs foi determinada pelo método descrito no item 3.8 da seção de materiais e métodos. Controle: células cultivadas a 25 ± 1°C. A condição e tempos de estresse 30 ± 1°C estão especificados no gráfico. Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes em triplicata. Os resultados estão expressos como atividade das Prxs (% do controle). Para SE1 100% corresponde a 3,7 ± 0,09 U/ml de células (peso fresco), e para SE6 100% corresponde a 4,7 ± 0,1 U/ml mg de células (peso fresco). Valores estatisticamente diferentes do Controle \*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$ .

Almargo e colaboradores (2009) descreveram que as Prxs da Classe III têm papel importante em respostas metabólicas em plantas submetidas a situações de estresse, e ainda podem ser consideradas como biomarcadores da resposta ao estresse (SAATHOFF *et al.*, 2013). Neste contexto, HURA e colaboradores (2013) observaram que há um aumento na atividade das Prxs de *Brassica napus* quando

inoculadas com esporos do fungo *Leptosphaeria maculans*. Liu e colaboradores (2010) descreveram o aumento na abundância de Prxs de Classe III para o arroz e o trigo quando atacados por larvas de mosca (*Mayetiola destructor*).

Considerando as alterações na viabilidade celular (TABELA 1) nos níveis de peróxido de hidrogênio (FIGURA 7) e a atividade das Prsx (FIGURA 8) em células de *A. angustifolia* submetidas ao estresse pelo calor, na etapa seguinte deste estudo foi investigada a ocorrência de lipoperoxidação nestas células, conhecidamente associada à condição de estresse oxidativo e morte celular (GILL e TUTEJA, 2010).

#### 4.5 LIPOPEROXIDAÇÃO

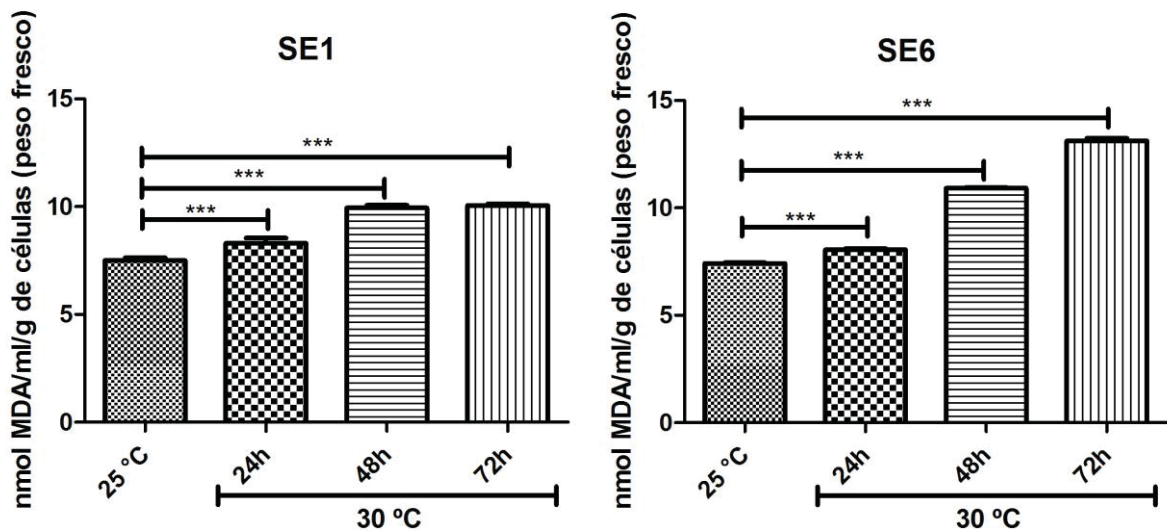
O estresse oxidativo pela mudança de temperatura pode ocasionar desnaturação de proteínas e a peroxidação de lipídeos, promovendo alterações nas membranas celulares (RODRÍGUEZ *et al.*, 2005).

Neste estudo os níveis de malondialdeído (MDA) foram utilizados como indicativo de lipoperoxidação (HODGES *et al.*, 1999; HEATH e PACKER, 1968). Observa-se na Figura 9 que houve um aumento dos níveis de MDA nas duas linhagens analisadas. Para as células SE1 este aumento foi de ~10% para 24h e ~34% para 48 e 72h. Já na linhagem SE6 o aumento nos níveis de MDA foi proporcional ao tempo de exposição ao calor, sendo de ~9, 48 e 77% para 24, 48 e 72 h, respectivamente. Estes resultados são interessantes quando comparados aos de peróxido de hidrogênio (FIGURA 7). Observa-se que embora os níveis de peróxido estejam mais elevados em 24 h, a lipoperoxidação foi menos intensa neste mesmo tempo de exposição ao calor para as duas linhagens, o que pode significar que nem todo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esteja gerando o radical hidroxila. Por outro lado, a lipoperoxidação foi menos intensa na linhagem SE1 onde os níveis de peróxido foram reduzidos em 48 e 72h. Estes resultados refletem a complexidade da resposta destas células ao estresse oxidativo resultante da exposição ao calor.

Em células embriogênicas de *A. angustifolia*, não caracterizadas quanto à diferenciação e estressadas pelo frio (4 °C por 24h e 48h) demonstrou-se um aumento de 15% e 30% na lipoperoxidação (FURLANETTO, 2014), sugerindo que alterações na temperatura podem de fato desencadear o estresse oxidativo nesta espécie.

Em sementes de *Araucaria bidwillii* submetidas ao estresse por dessecação de 28 e 21% da umidade, Francini *et al.* (2006), descreveram um aumento significativo nos níveis de MDA no embião e no endosperma da semente (FRANCINI *et al.*, 2006).

FIGURA 9 - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS ESTRESSADAS A 30°C



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Os níveis de malonaldeído (MDA) foram usados para determinar a peroxidação lipídica como descrito no item 3.7 da seção de materiais e métodos. Controle: células cultivadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . A condição e tempos de estresse  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  estão especificados no gráfico. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes em triplicata. Os resultados, expressos como nmol MDA /ml/g de células (peso fresco). Valores estatisticamente diferentes do Controle  $***p < 0,0001$ .

A peroxidação lipídica também foi associada à variação de temperatura em outras espécies como: coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Savicka e Škute, 2010), azevém (*Lolium perenne* L.) (SOLIMAN *et al.*, 2011), algodão (DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2009), cevada (*Hordeum vulgare* L.) (SAVCHENKO *et al.*, 2002) e em diferentes genótipos (Jaguar 3 e TF 66) de *Festuca arundinacea* Schreb. (WANG *et al.*, 2009).

Uma vez que estresse pelo calor parece desencadear uma resposta complexa nas linhagens de *A. angustifolia*, foram também avaliadas neste estudo as atividades das principais enzimas antioxidantes frente a esta condição, sendo os resultados apresentados a seguir.

#### 4.6 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

O estresse por temperatura pode levar a planta ao estresse oxidativo afetar seu crescimento e desenvolvimento ou até mesmo causar a morte celular, devido principalmente ao aumento dos níveis de ROS (HASANUZZAMAN *et al.*, 2012. HASANUZZAMAN *et al.*, 2013a). Os resultados deste estudo evidenciaram um aumento significativo nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (FIGURA 7), na atividade das Prxs (FIGURA 8) e na lipoperoxidação (FIGURA 9) para as duas linhagens estudadas em resposta ao estresse pelo calor. Possivelmente estes efeitos foram capazes de reduzir a viabilidade (TABELA 1) (FIGURAS 5 e 6), mas não causaram modificações na morfologia (FIGURA 3) destas células, sugerindo que o mecanismo de defesa antioxidante está atuando de forma eficiente. Estudos demonstram que variações na temperatura em plantas são capazes de ativar este sistema de defesa (RANI *et al.*, 2013; NAGESH BABU e DEVARAJ, 2008; FURLANETTO 2014; BITA e GERATS, 2013), sendo os principais: a glutathiona (GSH), o ácido ascórbico (ASC), os tocoferóis (TOC) e os compostos fenólicos (AHMAD, *et al.*, 2008; JALEEL *et al.*, 2009), além das enzimas superóxido dismutase (SOD) catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX), glutathiona redutase (GR), Glutathiona peroxidase (GPX), dehidroascorbato redutase (DHAR) e monodehidroascorbato reductase (MDHAR) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; GILL E TUTEJA 2010; FOYER E NOCTOR, 2011).

As superóxidos dismutases SODs (EC 1.15.1.1) constituem a primeira linha de defesa contra ROS e sua principal função é catalisar a dismutação do radical superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RUBIO *et al.*, 2004; APEL e HIRT, 2004). Estas enzimas possuem isoformas classificadas de acordo com o íon metálico em seu sítio ativo e sua localização celular. São estas isoformas: as cobre e zinco superóxidos dismutases (Cu/ZnSOD) que se localizam no citosol e cloroplastos, manganês superóxidos dismutases (MnSOD) que se localizam nos peroxissomos e na matriz mitocondrial e a ferro superóxidos dismutases (FeSOD) que se localizam principalmente nos cloroplastos (GILL e TUTEJA, 2010; HASANUZZAMAN *et al.*, 2012).

Neste estudo, foi determinada a atividade da SOD total no homogenato celular, sendo os resultados apresentados na Tabela 2. As células da linhagem SE1 estressadas a 30°C apresentaram um aumento significativo na atividade da SOD de

26% para 24 e 72h. Já para a linhagem SE6 também houve um aumento da atividade desta enzima de ~40% (24h) e ~59% (72h). Interessantemente, a atividade da SOD não sofreu alterações em 48h de exposição ao calor, sugerindo se tratar de um sistema antioxidante finamente regulado e dependente do tempo de exposição.

Song e colaboradores (2006) ao submeter calos de dois ecótipos de *Phragmites communis* Trin. ao estresse pelo calor (45°C, 2 horas) demonstraram o aumento na atividade da SOD em 73% e 6% para os ecótipos analisados. O aumento de 24% na atividade da SOD também foi demonstrado em plantas de Grão-de-bico *Cicer arietinum*, estressadas (45/40 °C 12/12h) (KAUSHAL *et al.*, 2011), e em embriões de semente de *Araucaria bidwillii* dessecada (37%) (FRANCINI *et al.*, 2006).

A atividade da catalase também foi avaliada neste estudo. Esta enzima catalisa a reação de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, desta forma, é importante na prevenção de danos oxidativos, uma vez que o peróxido de hidrogênio pode participar da reação de Fenton, gerando o radical hidroxila que é mais reativo e, portanto, ainda mais danoso às células (SANCHEZ-CASAS e KLESSEG 1994; VAN BREUSEGEM *et al.*, 2001; KARUPPANAPANDIAN *et al.*, 2011). Estas enzimas estão localizadas principalmente nos peroxissomos, cloroplastos e mitocôndrias (HASANUZZAMAN *et al.*, 2012).

Em culturas SE1 e SE6 de *A. angustifolia* estressadas pelo calor 30 °C (TABELA 2), não houve diferença significativa na atividade da CAT nos tempos de 24, 48 e 72 horas para a linhagem SE1. Para a linhagem SE6 não houve diferença significativa nos tempos de 24 e 48 horas, no entanto no tempo de 72 h observou-se um aumento na atividade da CAT em ~35%, quando comparado com o grupo controle (25 °C). Esta ativação apenas no tempo de 72 h sugere que outras enzimas e/ou antioxidantes podem atuar nesta linhagem em resposta ao estresse oxidativo nos tempos de 24 e 48h. Entre estas, estão as que participam do ciclo denominado ciclo da Glutathiona/Ascorbato (Figura 1): ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11) localizada no cloroplasto, citosol, mitocôndria e peroxisomo; glutathiona redutase (GR) (EC 1.6.4.2), deidroascorbato redutase (DHAR) (EC 1.8.5.1) e monodeidroascorbato redutase (MDHAR) (EC 1.6.5.4) localizadas nos cloroplastos, mitocôndrias e citosol (MØLLER, 2001; GILL E TUTEJA 2010; HASANUZZAMAN *et al.*, 2012).

TABELA 2 - EFEITO DO ESTRESSE PELO CALOR NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia* SE1 E SE6

Enzimas	Controle		24 h stress		48 h stress		72 h stress	
	SE1	SE6	SE1	SE6	SE1	SE6	SE1	SE6
<b>SOD</b>	100±7	100±3	125±5***	140±9***	101±6	112±10	128±6***	159±5***
<b>CAT</b>	100±15	100±4	106±16	117±13	95±17	87±20	88±8	135±25*
<b>APX</b>	100±9	100±17	133±12***	117±7*	132±11***	103±6	130±3***	117±1*
<b>GR</b>	100±4	100±6	134±6***	125±4**	140±7**	191±7***	159±20***	225±20***
<b>DHAR</b>	100±4	100±6	128±2***	137±11***	138±6***	127±8***	137±4***	152±3***
<b>MDHAR</b>	100±4	100±2	142±2***	123±12***	146±6***	122±9***	209±7***	131±5***

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito no item 3.8 da seção de materiais e métodos. Controle: células cultivadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . A condição de estresse foi a temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  nos tempos especificados na tabela. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes em duplicata. Para SE1 (100%) SOD corresponde a  $48,7 \text{ U/min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco), e para SE6 (100%) corresponde a  $25,3 \text{ U/min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco). Para CAT, SE1 (100%) corresponde a  $19,5 \mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumidos por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco), e para SE6 (100%) corresponde a  $24,7 \mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumidos por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco). Para APx, SE1 (100%) corresponde a  $2,7 \text{ mmol}$  de ascorbato oxidado por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco), e para SE6 (100%) corresponde a  $3,1 \text{ mmol}$  de ascorbato oxidado por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco). Para GR, SE1 (100%) corresponde a  $214,9 \mu\text{mol}$  de NADPH oxidado por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de peso fresco de célula, e para SE6 (100%) corresponde a  $155,9 \mu\text{mol}$  de NADPH oxidado por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco). Para DHAR, SE1 (100%) corresponde a  $146,7 \mu\text{mol}$  de dehidroascorbato reduzido por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco), e para SE6 (100%) corresponde a  $183,9 \mu\text{mol}$  de dehidroascorbato reduzido por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco). Para MDHAR, SE1 (100%) corresponde a  $719,2 \mu\text{mol}$  de NADH oxidado por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco), e para SE6 (100%) corresponde a  $787 \mu\text{mol}$  de NADH oxidado por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de células (peso fresco). Valores estatisticamente diferentes do Controle \*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$ .

O estresse pelo calor promoveu aumentos da atividade de todas as enzimas do ciclo Glutaciona/Ascorbato para ambas as linhagens SE1 e SE6 de *A. angustifolia* (TABELA 2), com exceção da enzima APX no tempo de 48 h para linhagem SE6. Na linhagem SE1 observou-se aumentos de  $\sim 32\%$  (24, 48 e 72h), para APX, de  $\sim 34\%$  (24 e 48h) e  $\sim 59\%$  (72h) para GR, DHAR de  $\sim 28\%$  (24h),  $\sim 39\%$  (48 e 72h), e de  $\sim 42\%$  (24 e 48h) e  $\sim 109\%$  (72h) para MDHR. Para a linhagem SE6 houve aumento das enzimas APX  $\sim 17\%$  (24 e 72h), GR  $\sim 25\%$  (24h),  $\sim 91\%$  (48h) e  $\sim 125\%$  (72h), DHAR  $\sim 37\%$  (24 e 48h) e  $\sim 52$  (72h), para MDHAR  $\sim 32\%$  (24, 48 e 72h).

Observa-se na Tabela 2 que no tempo de 72 h de estresse há um grande aumento na atividade das enzimas GR, DHAR e MDHAR para as duas linhagens estudadas. Isso pode ser justificado pelo fato de que essas três enzimas trabalham de forma coordenada para fornecer ascorbato (AsA) que atua como doador de elétrons para a APX. Nessa reação são necessárias duas moléculas de AsA para

que haja a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediada pela APX. Além disso, o AsA também pode atuar como antioxidante reduzindo alguns tipos de ROS (HASANUZZAMAN *et al.*, 2012) protegendo a planta do estresse oxidativo.

Quando comparadas as linhagens SE1 e SE6, observa-se uma maior atividade das enzimas do ciclo Glutaciona/Ascorbato para a linhagem SE1 em APX, GR e MDHAR em 24h, APX e MDHAR em 48 h e APX e MDHAR em 72 h, o que está de acordo com os resultados descritos por dos Santos e colaboradores (2015) que encontraram maior abundância de proteínas relacionadas a defesa antioxidante para a linhagem SE1, entre estas, as enzimas APX e DHAR integrantes do ciclo Glutaciona/Ascorbato. Por outro lado, as enzimas CAT e SOD foram mais ativas nos tempos de 24 e 72 h na linhagem SE6, sugerindo que nesta linhagem o ciclo Ascorbato/Glutaciona não está tão ativo quanto em SE1 para a defesa contra o estresse oxidativo decorrente da exposição ao calor.

O aumento da atividade das enzimas do Ciclo Glutaciona/Ascorbato em resposta ao estresse por variação de temperatura, não é uma exclusividade das células embriogênicas de *A. angustifolia*. Rani e colaboradores (2011) observaram maior atividade das enzimas CAT, APX e GR em plântulas de mostarda (*Brassica juncea* L.) tolerantes ao calor, após o estresse por cinco dias (45 °C). Kumar e colaboradores (2012) avaliaram os efeitos da temperatura (40/35°C - dia/noite) sobre o sistema antioxidante de milho e relataram a maior atividade das enzimas APX e GR. O aumento da atividade dessas enzimas também foi descrito para o trigo, após tratamento térmico (38°C, 24 e 48h) (HASANUZZAMAN *et al.*, 2013b). Wang e Li (2006) observaram que tanto o calor quanto o frio alteraram o sistema de defesa antioxidante em plantas de uva.

As atividades das enzimas antioxidantes tendem a intensificar-se de acordo com a elevação da temperatura (HASANUZZAMAN *et al.*, 2013c), porém, tanto o calor quanto o frio podem ocasionar isso (WANG e LI, 2006). No tomate, por exemplo, observou-se que a maior atividade das enzimas antioxidantes confere resistência ao frio (ZHAO *et al.*, 2009). Sabe-se também que ROS podem controlar a expressão de vários genes, e que esse controle pode oferecer a planta resistência ao estresse abiótico (GILL e TUTEJA, 2010).

#### 4.7 RESPIRAÇÃO CELULAR

Ensaio de respiração para mitocôndrias isoladas de culturas embriogênicas de *A. angustifolia* estão bem estabelecidos e são descritos na literatura (MARIANO *et al.*, 2008, VALENTE *et al.*, 2012). Porém, neste estudo, optou-se por realizar os ensaios de respiração com as células de *A. angustifolia*, uma vez que para os demais parâmetros analisados (viabilidade, morfologia, níveis de peróxido, lipoperoxidação e a atividade das enzimas antioxidantes) utilizou-se este modelo experimental. A respiração celular foi monitorada sem a adição de substratos oxidáveis (estado basal), na presença de glutamato e malato de sódio (substratos para o complexo I da cadeia respiratória); após a adição do desacoplador FCCP, que corresponde à respiração quando o transporte de elétrons ocorre em velocidade máxima; em presença de SHAM, inibidor da oxidase alternativa e, por fim, na presença de Antimicina A (inibidor do complexo III).

Nos resultados apresentados na Tabela 3 observa-se que, no estado basal, somente a respiração das células SE1 estressadas (30 °C – 24h) sofreram alteração, com um estímulo de ~57%. Após a adição de Glutamato e Malato, para a linhagem SE6, observou-se uma inibição da respiração de ~20, 38 e ~35% em 24, 48 e 72h, respectivamente. Em resposta a presença do desacoplador FCCP, a inibição da respiração observada para linhagem SE6 nos tempos de 24 e 48h desapareceu, permanecendo apenas a inibição em 72h (~30%). A adição de SHAM, um inibidor da Oxidase Alternativa de Plantas (AOX), possibilitou que se estimasse o efeito do estresse pelo calor somente sobre o transporte de elétrons dependente do complexo IV da cadeia respiratória. Neste caso, observou-se uma inibição significativa apenas em 48 h de estresse na linhagem SE1 em (32%). Após a adição de Antimicina A, um inibidor do complexo III da cadeia respiratória, para a linhagem SE6 observou-se uma redução da respiração de ~66 e 27% nos tempos de 48 e 72 h. É importante ressaltar que após a adição de Antimicina o consumo de oxigênio se deve a reações independentes da cadeia respiratória, como por exemplo devido a atividade de oxigenases citoplasmáticas. Assim, é possível que nesta linhagem o estresse pelo calor também afete a atividade destas enzimas.

TABELA 3 - RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS ESTRESSADAS A 30°C.

Respiração celular	Controle		24 h stress		48 h stress		72 h stress	
	SE1	SE6	SE1	SE6	SE1	SE6	SE1	SE6
<b>Basal</b>	24±7	17±3	38±2*	14±3	19±2	19±4	28±3	22±3
<b>Glutamato + Malato</b>	33±7	40±7	35±5	32±4*	31±3	25±2*	30±8	26±2*
<b>FCCP</b>	47±8	60±17	55±13	51±5	35±5	48±8	55±11	42±9*
<b>SHAM</b>	31±5	24±3	25±3	31±3	21±2*	29±6	31±6	22±2
<b>Antimicina A</b>	9±3	6±0,8	8±1	5±0,6	7±1	2±0,3*	7±1	4±0,6*

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Respiração das células *A. angustifolia* determinadas a partir do monitoramento do fluxo de oxigênio em oxígrafo de alta resolução. Como descritos no item 3.9 da seção de materiais e métodos. Controle: células cultivadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . A condição e tempos de estresse  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  estão especificados no gráfico. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes em duplicata. Para SE1 a média do controle basal corresponde a 24 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células), e para SE6 corresponde a 17 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células). Para SE1 a média do controle com Glutamato + malato corresponde a 33 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células), e para SE6 corresponde a 40 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células). Para SE1 a média do controle com FCCP corresponde a 47 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células), e para SE6 corresponde a 60 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células). Para SE1 a média do controle com SHAM corresponde a 31 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células), e para SE6 corresponde a 24 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células). E para SE1 a média do controle com Antimicina A corresponde a 9 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células), para SE6 equivale a 6 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células). Valores estatisticamente diferentes do Controle \* $p < 0,05$ .

A partir dos valores da Tabela 3, foram calculados os valores de respiração dependentes do citocromo *c* e da via mediada pela AOX (TABELA 4). Observa-se que para a linhagem SE1 a via do citocromo *c* foi significativamente reduzida em ~36% (48h) em sua atividade. Já para a linhagem SE6 houve aumento significativo de ~38% (24 e 48h). Em relação a AOX, para a linhagem SE1 não houve diferença estatisticamente significativa, porém, há uma tendência de estímulo que poderia justificar o aumento da respiração no estado basal em 24h de estresse. Já na linhagem SE6 houve redução de ~53% apenas em 48h, porém, nos tempos de 24 e 72h há uma tendência de diminuição o consumo de oxigênio, porém, não é significativa.

Estes resultados mostram que a respiração, de ambas as linhagens, é afetada pelo estresse pelo calor, mas de maneira diferenciada. Na linhagem SE6 há prevalência de inibição, que é mais pronunciada quando o processo de fosforilação oxidativa está acoplado (na ausência de FCCP). Já na linhagem SE1, parece haver uma resposta inicial ao estresse, com o aumento da respiração no estado basal e,

em 48h, uma inibição quando o transporte de elétrons ocorre em velocidade máxima (na presença de FCCP).

TABELA 4 - RESPIRAÇÃO VIA CITOCROMO C E AOX DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS ESTRESSADAS A 30°C

Respiração	Controle		24 h stress		48 h stress		72 h stress	
	SE1	SE6	SE1	SE6	SE1	SE6	SE1	SE6
Via do Citocromo c	21±4	18±3	17±2	25±4	13±1*	26±5*	24±6	17±2*
AOX	16±3	35±17	30±13	20±4	14±4	19±4*	23±11	20±8

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: A respiração correspondente à via do citocromo c foi determinada após a adição de SHAM. A respiração mediada pela AOX foi estimada pela subtração do valor da respiração após a adição do FCCP do valor obtido após a adição de SHAM (FCCP – SHAM). Os valores de consumo de oxigênio devido a reações independentes da cadeia respiratória (após a adição da Antimicina) foram descontados de todos os estados da respiração. Controle: células cultivadas a  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A condição de estresse foi a exposição a temperatura de  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  pelos tempos indicados na tabela. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes em duplicata. Para SE1 a média do controle da via dependente do citocromo c corresponde a 21 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células), e para SE6 corresponde a 18 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células). Para SE1 a média do controle da AOX corresponde a 16 pmols de  $\text{O}_2$  consumido ( $\text{min} \cdot \text{mg}$  peso fresco de célula), e para SE6 corresponde a 35 pmols de  $\text{O}_2/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de células). Valores estatisticamente diferentes do Controle \* $p < 0,05$ .

O estímulo da respiração no estado basal, no estresse de 24 h, em SE1 pode ter ocorrido em resposta ao aumento dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (~40%), e até mesmo ter contribuído para sua redução nos tempos de 48 e 72h. Por outro lado, a ausência deste estímulo pode ter favorecido os maiores níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em SE6 (~110%). Por sua vez, os níveis elevados de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em SE6, poderiam levar a maior produção do radical hidroxila, justificando a maior ocorrência de lipoperoxidação nestas células (~77% - 72h) em comparação a SE1(~34% - 72h). Esta modulação diferencial em resposta ao estresse, também foi observada em relação às enzimas antioxidantes, que foram mais ativas no tempo de 48 e 72 h nas duas linhagens, mas com destaque para a maior atividade das enzimas CAT e SOD para linhagem SE6 e, das enzimas do ciclo glutatona/ascorbato para SE1 (TABELA 2).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados deste estudo considera-se que:

1) O estresse pelo calor ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) não altera a morfologia das linhagens SE1 e SE6 (24, 48 e 72h), porém, reduz a viabilidade das células SE1 em todos os tempos de exposição (24, 48 e 72h), e das células SE6 somente a partir de 48h de exposição;

2) A redução da viabilidade celular e aumento da lipoperoxidação em ambas as linhagens está possivelmente associado ao aumento dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;

3) O estímulo da respiração e da atividade de enzimas antioxidantes contribui para a diminuição dos níveis de peróxido nos tempos de 48 e 72h; na linhagem SE1;

4) A lipoperoxidação mais pronunciada na linhagem SE6 é compatível a inibição da respiração nestas células;

5) As linhagens apresentaram vias diferenciadas de defesa antioxidante. Enquanto que na linhagem SE1 houve a prevalência da ativação das de enzimas do ciclo glutational/ascorbato, na linhagem SE6 as enzimas CAT e SOD estavam mais ativas;

6) Os resultados sugerem que o estresse por alta temperatura foi capaz de promover o estresse oxidativo nas linhagens SE1 e SE6 de *Araucaria angustifolia*, que responderam de forma diferenciada a esta condição. Tais diferenças podem estar relacionadas à sua responsividade à maturação. Estudos futuros devem ser realizados para explorar e comprovar esta hipótese.

## REFERÊNCIAS

- ABIKO, M.; AKIBAYASHI, K.; SAKATA, T.; KIMURA, M.; KIHARA, M.; ITOH, K.; HIGASHITANI, A. High-temperature induction of male sterility during barley (*Hordeum vulgare* L.) anther development is mediated by transcriptional inhibition. **Sexual Plant Reproduction**, v. 18, n. 2, p. 91-100, 2005.
- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, v. 51, n. 3, p. 167-173, 2008.
- ALMAGRO, L.; ROS, L. G.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; BARCELÓ, A. R.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 2, p. 377-390, 2009.
- ALMESELMANI, M.; DESHMUKH, P. S.; SAIRAM, R. K.; KUSHWAHA, S. R.; SINGH, T. P. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. **Plant Science**, v. 171, n. 3, p. 382-388, 2006.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 36, n. 3, p. 194-200, 2000.
- ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*—induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Braz J Plant Physiol**, v. 10, p. 113-118, 1998.
- BAILEY-SERRES, J.; MITTLER, R. The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 311, 2006.
- BECWAR, M. R.; NOLAND, T. L.; WYCKOFF, J. L. Maturation, germination, and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 25, n. 6, p. 575-580, 1989.
- BEHLING, H. Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the *Araucaria* forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 97, n. 1, p. 109-121, 1997.
- BITA, C.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 273, 2013.
- BLUM, W. Ecologia da *Araucaria angustifolia* e futuras condições de reflorestamento no Sul do Brasil. **Brasil Madeira, Curitiba**, v. 7, p. 10-12, 1977.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707-716, 1973.

BOYD, V.; CHOLEWA, O. M.; PAPAS, K. K. Limitations in the use of fluorescein diacetate/propidium iodide (FDA/PI) and cell permeable nucleic acid stains for viability measurements of isolated islets of Langerhans. **Current trends in biotechnology and pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 66, 2008.

BOZHKOVA, P. V.; FILONOVA, L. H.; SUAREZ, M. F. Programmed cell death in plant embryogenesis. **Current topics in developmental biology**, v. 67, p. 135-179, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. John Wiley & Sons, 2015.

BUITRAGO, M. F.; GROEN, T. A.; HECKER, C. A.; SKIDMORE, A. K. Changes in thermal infrared spectra of plants caused by temperature and water stress. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, v. 111, p. 22-31, 2016.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira (p. 163). Brasil: **EMBRAPA-CNPQ/SPI**. 1994.

CASSOL, C. A. Relações entre características do solo, crescimento e produtividade em povoamento implantado de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria. Passo Fundo, RS. 1982.

CASTRO-CONCHA, L. A.; ESCOBEDO, R. M.; DE LOURDES MIRANDA-HAM, M. Measurement of cell viability. **Plant Cell Culture Protocols**, p. 49-56, 2012.

CASTRO-CONCHA, L. A.; ESCOBEDO, R. M.; DE MIRANDA-HAM, M. L.. Measurement of cell viability in in vitro cultures. **Plant Cell Culture Protocols**, p. 71-76, 2006.

DALTON, T. P.; SHERTZER, H. G.; PUGA, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 39, n. 1, p. 67-101, 1999.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; BREUSEGEM, F.V. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 779–795, 2000.

DESIKAN, R.; REYNOLDS, A.; HANCOCK, T. J.; NEILL, J. S. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. **Biochemical Journal**, v. 330, n. 1, p. 115-120, 1998.

DJANAGUIRAMAN, M.; ANNIE SHEEBA, J.; DURGA DEVI, D.; BANGARUSAMY, U. Cotton leaf senescence can be delayed by nitrophenolate spray through enhanced antioxidant defence system. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, n. 3, p. 213-224, 2009.

DJANAGUIRAMAN, M.; PRASAD, P. V. V.; SEPPANEN, M. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 999-1007, 2010.

CLENILSO, C. V. T. A.; MOTAI, S.; IDEIII, C. A. M. G. M. Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, 2007.

DO NASCIMENTO VIEIRA, L.; SANTA-CATARINA, C.; DE FREITAS FRAGA, H. P.; DOS SANTOS, A. L. W.; STEINMACHER, D. A.; SCHLOGL, P. S.; GUERRA, M. P. Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. **Plant science**, v. 195, p. 80-87, 2012.

DONG, J. Z.; DUNSTAN, D. I. Cloning and characterization of six embryogenesis-associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, v. 39, n. 4, p. 859-864, 1999.

DOULIS, A. G.; DEBIAN, N.; KINGSTON-SMITH, A. H.; FOYER, C. H. Differential localization of antioxidants in maize leaves. **Plant Physiology**, v. 114, n. 3, p. 1031-1037, 1997.

DUARTE, L.S.; DOS SANTOS, M.M.G.; HARTZ, S.M.; PILLAR, V.D. Role of nurse plants in *Araucaria* Forest expansion over grassland in south Brazil. **Austral Ecology**, v.31, p.520-528, 2006.

DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 6, n. 1, p. 341-378, 1988.

DUTRA, N. T.; NETO, L. G.; AZEVEDO, I. G.; SILVEIRA, V.; SANTA CATARINA, C. Poliaminas como moduladores da embriogênese somática de *Araucaria angustifolia*. **Confict**. 2010.

FONTOURA, S.B.; GANADE, G.; LAROCCA, J. Changes in plant community diversity and composition across an edge between *Araucaria* Forest and pasture in South Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, n.1, p.79-91, 2006.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant physiology**, v. 155, n. 1, p. 2-18, 2011.

FRANCINI, A.; GALLESCHI, L.; SAVIOZZI, F.; PINZINO, C.; IZZO, R.; SGHERRI, C.; NAVARI-IZZO, F. Enzymatic and non-enzymatic protective mechanisms in recalcitrant seeds of *Araucaria bidwillii* subjected to desiccation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 556-563, 2006.

FURLANETTO, A. L. D. D. M., Estresse oxidativo e transição de permeabilidade mitocondrial em células embriogênicas somáticas de *Araucária angustifolia* estressadas pelo frio. [dissertação]. 2014.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B.; TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Embriogênese somática e sementes sintéticas. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, 1999.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; REIS, M. D.; SCHNEIDER, L. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais**, 2002.

GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneraflon in loblolly pine. **Biotechnology**, v. 5, p. 147, 1987.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?. **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 3, p. 410-418, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Biosciences**. 2007.

HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; DA SILVA, J. A. T.; FUJITA, M. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In: **Crop stress and its management: Perspectives and strategies**. Springer Netherlands, p. 261-315, 2012.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ALAM, M. M.; ROYCHOWDHURY, R.; FUJITA, M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9643-9684, 2013a.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In: **Ecophysiology and responses of plants under salt stress**. Springer New York, p. 25-87, 2013c.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. **Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants**. INTECH Open Access Publisher, 2013b.

HATFIELD, J. L.; PRUEGER, J. H. Temperature extremes: effect on plant growth and development. **Weather and Climate Extremes**, v. 10, p. 4-10, 2015.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant

tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta.**, v. 207, p. 604–611, 1999.

HOEBERICHTS, F.A.; WOLTERING, E.J. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. **BioEssays.**, v. 25, p. 47–57, 2003.

HUANG, C. N.; CORNEJO, M. J.; BUSH, D. S.; JONES, R. L. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. **Protoplasma**, v. 135, n. 2, p. 80–87, 1986.

HURA, K.; HURA, T.; BAÇZEK-KWINTA, R.; GRZESIAK, M.; PŁAŻEK, A. Induction of defense mechanisms in seedlings of oilseed winter rape inoculated with *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Phytoparasitica**, v. 42, n. 2, p. 145-154, 2014.

INUPAKUTIKA, M. A.; SENGUPTA, S.; DEVIREDDY, A. R.; AZAD, R. K.; MITTLER, R. The evolution of reactive oxygen species metabolism. **Journal of Experimental Botany**, p. erw382, 2016.

JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INES, J.; AL-JUBURI, H. J.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 3, p. 427-436, 2009.

JALEEL, C. A.; RIADH, K.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; INES, J.; AL-JUBURI, H. J.; PANNEERSELVAM, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 3, p. 427-436, 2009.

JO, L.; DOS SANTOS, A. L.; BUENO, C. A.; BARBOSA, H. R.; FLOH, E. I. Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. **Tree physiology**, v. 34, n. 1, p. 94-104, 2014.

JONES, K.H.; SENFT, J.A. An Improved Method to Determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 33, n. 1, p. 77-79, 1985.

KARUPPANAPANDIAN, T.; WANG, H. W.; PRABAKARAN, N.; JEYALAKSHMI, K.; KWON, M.; MANOHARAN, K.; KIM, W. 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 168-177, 2011.

KAUSHAL, N.; GUPTA, K.; BHANDHARI, K.; KUMAR, S.; THAKUR, P.; NAYYAR, H. Proline induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 3, p. 203, 2011.

KAZIUK, F. D. Estabelecimento e Manutenção de Células Embrionárias de *Araucaria angustifolia* em Cultura e Efeito do Estresse pelo Calor. Universidade estadual do Paraná, UNESPAR, União da Vitória, Paraná, Brasil, 2014.

KEEGSTRA, K.; THOMASHOW, M. Adapting physiology and metabolism to changes in the environment. **Cur Opi. Plant Biol.**, v.5, p.191–192, 2002.

KLIMASZEWSKA, K.; OVERTON, C.; STEWART, D.; RUTLEDGE, R. G. Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. **Planta**, v. 233, n. 3, p. 635-647, 2011.

KÖNIGSHOFER, H.; TROMBALLA, H. W.; LÖPPERT, H. G. Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. **Plant, cell & environment**, v. 31, n. 12, p. 1771-1780, 2008.

KUMAR, S.; GUPTA, D.; NAYYAR, H. Comparative response of maize and rice genotypes to heat stress: status of oxidative stress and antioxidants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 1, p. 75-86, 2012.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, p. 583-593, 1994.

LIU, X.; WILLIAMS, C. E.; NEMACHECK, J. A.; WANG, H.; SUBRAMANYAM, S.; ZHENG, C.; CHEN, M. S. Reactive oxygen species are involved in plant defense against a gall midge. **Plant physiology**, v. 152, n. 2, p. 985-999, 2010.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, MS dos. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 787-796, 2004.

MARIANO, A. B.; VALENTE, C.; MAURER, J. B. B.; CADENA, S. M. S. C.; ROCHA, M. E. M.; DE OLIVEIRA, M. B. M.; CARNIERI, E. G. S. Functional characterization of mitochondria isolated from the ancient gymnosperm *Araucaria angustifolia*. **Plant science**, v. 175, n. 5, p. 701-705, 2008.

MATTOS, J. R. O pinheiro brasileiro. vol. 1. **Artes Gráficas Princesa Ltda**, 1994.

MAURER, J. B. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; PETTOLINO, F. A.; GASPAR, Y. M.; BACIC, A. Effects of Yariv dyes, arabinogalactan-protein binding reagents, on the growth and viability of Brazilian pine suspension culture cells. **Trees**, v. 24, n. 2, p. 391-398, 2010.

MILLER, G. A. D.; MITTLER, R. O. N. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants?. **Annals of Botany**, v. 98, n. 2, p. 279-288, 2006.

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. **Plant and Cell Physiology**, v. 33, n. 5, p. 541-553, 1992.

MØLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual review of plant biology**, v. 52, n. 1, p. 561-591, 2001.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 58, p. 459-481, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURSHED, R.; LOPEZ-LAURI, F.; SALLANON, H. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate–glutathione cycle. **Analytical biochemistry**, v. 383, n. 2, p. 320-322, 2008.

NAGESH BABU, R.; DEVARAJ, V. R. High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). **Aust J Crop Sci**, v. 2, n. 2, p. 40-48, 2008.

NASA. Climate International. Disponível em: < <http://climateinternational.org/#map> >. Acesso em: 15 jun. 2017.

NAVROT, N.; ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J. P. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 129, n. 1, p. 185-195, 2007.

NOGUEIRA, F.T.S. **Identificação e Caracterização de Genes Expressos em Resposta ao Estresse por Baixas Temperaturas em Cana-de-açúcar**. Campinas, 2004. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

PALOVAARA, J.; HAKMAN, I. Conifer WOX-related homeodomain transcription factors, developmental consideration and expression dynamic of WOX2 during *Picea abies* somatic embryogenesis. **Plant molecular biology**, v. 66, n. 5, p. 533-549, 2008.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant cell reports**, v. 24, n. 5, p. 255-265, 2005.

PASTORE D.; TRONO D.; LAUS M.N.; DI FONZO N. ; PASSARELLA S. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: *durum wheat* mitochondria. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.2, p.195-210, 2007.

PEREIRA, A. R.; YOKOYAMA, L.; ALHADEFF, E. M. REMOÇÃO DE COR UTILIZANDO ENZIMA HORSE RADISH PEROXIDASE E PÉROXIDO DE HÍDROGÊNIO. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 8156-8163, 2015.

PITZSCHKE, A.; FORZANI, C.; HIRT, H. Reactive oxygen species signaling in plants. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1757-1764, 2006.

RANI, B.; DHAWAN, K.; JAIN, V.; CHHABRA, M. L.; SINGH, D. High temperature induced changes in antioxidative enzymes in *Brassica juncea* (L) Czern & Coss. 2013.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1189-1202, 2004.

REITZ, R., & KLEIN, R. M. Flora ilustrada catarinense: Araucariáceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 1966.

RODRÍGUEZ, M.; CANALES, E.; BORRÁS-HIDALGO, O. Molecular aspects of abiotic stress in plants. **Biotecnología Aplicada**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2005.

RUBIO, M. C.; JAMES, E. K.; CLEMENTE, M. R.; BUCCIARELLI, B.; FEDOROVA, M.; VANCE, C. P.; BECANA, M. Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 12, p. 1294-1305, 2004.

SAATHOFF, A.; DONZE, T.; PALMER, N.; BRADSHAW, J.; HENG-MOSS, T.; TWIGG, P.; SARATH, G. Towards uncovering the roles of switchgrass peroxidases in plant processes. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 202, 2013.

SANCHEZ-CASAS, P.; KLESSIG, D. F. A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. **Plant Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1675-1679, 1994.

SANTOS, A. L. W. D.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; MARASCHIN, M.; GUERRA, M. P. Biochemical and morphological changes during the growth kinetics of *Araucaria angustifolia* suspension cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 497-504, 2010.

SANTOS, A. L. W. D.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; VIDOR, M.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in parana pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 97-106, 2002.

SANTOS, A. L. W.; ELBL, P.; NAVARRO, B. V.; DE OLIVEIRA, L. F.; SALVATO, F.; BALBUENA, T. S.; FLOH, E. I. S. Quantitative proteomic analysis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze cell lines with contrasting embryogenic potential. **Journal of proteomics**, v. 130, p. 180-189, 2016.

SANTOS, A. W. D.; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; ZOGLAUER, K.; MOERSCHBACHER, B. M. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 195-199, 2008.

SAVCHENKO, G. E.; KLYUCHAREVA, E. A.; ABRAMCHIK, L. M.; SERDYUCHENKO, E. V. Effect of periodic heat shock on the inner membrane system of etioplasts. **Russian journal of plant physiology**, v. 49, n. 3, p. 349-359, 2002.

SAVICKA, M.; ŠKUTE, N. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). **Ekologija**, v. 56, n. 1, p. 26-33, 2010.

SCHEEREN WEBER, L.; GEHRARDT, E. J.; FINGER GUIMARÃES, C. A.; LONGHI JONAS, S.; SCHNEIDER, P. R. Agrupamento de unidades amostrais de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. em função de variáveis do solo, da serapilheira e das acículas, na região de Canela, RS. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, 2000.

SHIMIZU, J.Y.; OLIVEIRA, Y.M.M. Distribuição da variação e usos dos recursos genéticos de araucária no Sul do Brasil. **EMBRAPA-URPFCS**, documento 4, 1981.

SHOHAEL, A. M.; ALI, M. B.; YU, K. W.; HAHN, E. J.; ISLAM, R.; PAEK, K. Y. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1179-1185, 2006.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N. N.; SCHERER, G. F.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, v. 171, n. 1, p. 91-98, 2006.

SILVEIRA, V.; STEINER, N.; SANTOS, A. L. W.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biotechnology tools in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. **Crop Breed Appl Biotechnol**, v. 2, p. 463-470, 2002.

SOLIMAN, W. S.; FUJIMORI, M.; TASE, K.; SUGIYAMA, S. I. Oxidative stress and physiological damage under prolonged heat stress in C3 grass *Lolium perenne*. **Grassland science**, v. 57, n. 2, p. 101-106, 2011.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v. 11, n. 3, p. 431-443, 1999.

SONG, L.; DING, W.; ZHAO, M.; SUN, B.; ZHANG, L. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant Science**, v. 171, n. 4, p. 449-458, 2006.

STASOLLA, C.; BOZHKOVA, P. V.; CHU, T. M.; VAN ZYL, L.; EGERTSDOTTER, U.; SUAREZ, M. F.; SEDEROFF, R. R. Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. **TREE PHYSIOLOGY-VICTORIA**, v. 24, n. 10, p. 1073-1086, 2004.

STEFENON, V. M.; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: a case study of *Araucaria angustifolia*. **Biodiversity and conservation**, v. 18, n. 9, p. 2433-2448, 2009.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E. I.; GUERRA, M. P. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria*

angustifolia embryogenic cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 55-62, 2007.

STEINER, N.; VIEIRA, F. D. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

SUN, X.; ZHAO, T.; GAN, S.; REN, X.; FANG, L.; KARUNGO, S. K.; XIN, H. Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR 057. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

TAUTORUS, T. E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 9, p. 1873-1899, 1991.

TAYLOR, N.L.; HEAZLEWOOD, J.L.; DAY, D.A.; MILLAR, A.H. Differential Impact of Environmental Stresses on the Pea Mitochondrial Proteome. **Molecular & cellular proteomics**, v.4, n.8, p.1122-1133, 2005.

THOMAS, P. *Araucaria angustifolia*: The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014. 3. 2013.

THOMASHOW, M. F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. **Annual review of plant biology**, v. 50, n. 1, p. 571-599, 1999.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience reports**, v. 17, n. 1, p. 3-8, 1997.

VALENTE, C.; PASQUALIM, P.; JACOMASSO, T.; MAURER, J. B. B.; DE SOUZA, E. M.; MARTINEZ, G. R.; CADENA, S. M. S. C. The involvement of PUMP from mitochondria of *Araucaria angustifolia* embryogenic cells in response to cold stress. **Plant science**, v. 197, p. 84-91, 2012.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.

VERCESI A.E.; MARTINS I.S.; SILVA M.A.P.; LEITE H.M.F.; CUCCOVIA I.M.; CHAIMOVICH H. PUMPing plants, **Nature**, v.375, p.24, 1995.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, v. 164, n. 4, p. 645-655, 2003.

VOLKOV, R. A., PANCHUK, I. I.; MULLINEAUX, P. M.; SCHÖFFL, F. Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. **Plant molecular biology**, v. 61, n. 4, p. 733-746, 2006.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 870-874, 1981.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, n. 3, p. 233-249, 2002.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **J. Exp. Bot.**, v. 53, n. 372, p. 1227-1236, 2002.

WANG, J. Z.; CUI, L. J.; WANG, Y.; LI, J. L. Growth, lipid peroxidation and photosynthesis in two tall fescue cultivars differing in heat tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 2, p. 237-242, 2009.

WANG, K. L. C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The plant cell**, v. 14, n. suppl 1, p. S131-S151, 2002.

WANG, L. J.; LI, S. H. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca<sup>2+</sup> homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. **Plant Science**, v. 170, n. 4, p. 685-694, 2006.

WANG, X.; HUANG, W.; YANG, Z.; LIU, J.; HUANG, B. Transcriptional regulation of heat shock proteins and ascorbate peroxidase by CtHsfA2b from African bermudagrass conferring heat tolerance in Arabidopsis. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

WU, A.; ALLU, A. D.; GARAPATI, P.; SIDDIQUI, H.; DORTAY, H.; ZANOR, M. I.; FERNIE, A. R. JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 24, n. 2, p. 482-506, 2012.

YADAV, S. K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. **Agronomy for sustainable development**, v. 30, n. 3, p. 515-527, 2010.

YAN, J.; YU, L.; XUAN, J.; LU, Y.; LU, S.; ZHU, W. De novo transcriptome sequencing and gene expression profiling of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves under heat stress. **Scientific reports**, v. 6, p. 19473, 2016.

ZAHRA, J.; NAZIM, H.; CAI, S.; HAN, Y.; WU, D.; ZHANG, B.; ZHANG, G. The influence of salinity on cell ultrastructures and photosynthetic apparatus of barley genotypes differing in salt stress tolerance. **Acta physiologiae plantarum**, v. 36, n. 5, p. 1261-1269, 2014.

ZARPELÃO, C. A. Efeito do aumento de temperatura sobre células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* em cultura: Estresse oxidativo e defesas antioxidantes. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC/PR, Curitiba, Paraná, Brasil 2014.

ZHAO, D. Y.; SHEN, L.; YU, M. M.; ZHENG, Y.; SHENG, J. P. Relationship between activities of antioxidant enzymes and cold tolerance of postharvest tomato fruits. **Food Science**, v. 14, p. 309-313, 2009.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1411, 1993.