

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS**

Pâmela Martins Vieira

Dinâmica da metilação global do DNA e de poliaminas livres durante a indução e o desenvolvimento inicial de culturas nodulares de *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais. Orientadora: Prof^a Rosete Pescador. Co-orientador: Prof^o. Lírio Luiz Dal Vesco.

Florianópolis
2014

“Nossa saúde mental depende da compreensão de nossa conectividade com toda forma de vida.

A habilidade de sermos gentis, generosos e compassivos em relação aos outros, quer sejam humanos, animais ou plantas, é a base sobre a qual a felicidade é construída”.

Dr. Helgo Scholmer

À Isabela Vieira Bizzocchi e Leon Bizzocchi
Ofereço

À Gilberto Martins de Faria *in memoriam*,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela iluminação e força por meio das quais houve a possibilidade de fechamento de mais um ciclo da minha vida com muita dedicação.

A todos os meus queridos familiares, especialmente meus pais e minha avó Nila, por estarem sempre torcendo por mim e por trazerem palavras de estímulo.

À minha filha Isabela por dar sentido à minha vida e ser a minha fonte de inspiração e motivação.

Aos meus irmãos Rafael, Amanda, Luís Felipe e Pedro Luís já que todo o amor que sinto por eles me torna uma pessoa melhor e mais humana.

À minha orientadora Rosete Pescador pelo apoio, confiança e compreensão e principalmente pela oportunidade que me deu de ingressar na Pós-Graduação.

Ao meu co-orientador Lírio Luiz Dal Vesco, que mesmo distante deu apoio essencial para a realização deste trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal (LFDGV) da UFSC, em especial a Hugo Fraga e à Jenny Paola Corredor Prado por todo o apoio sem o qual não haveria a possibilidade de realização desse trabalho.

Àquelas que se tornaram minhas irmãs de coração, Daniela de Conti e Diana Diaz Cánova, por todos os momentos de felicidade que passamos. Faltam palavras que descrevam todo o carinho que sinto.

Aos meus queridos amigos do laboratório, especialmente à Vivian, Raphaela e Daniel.

À família Freitas, em especial a minha querida amiga Monique e à Juliana, que auxiliou na elaboração dos esquemas do trabalho.

E por fim, um agradecimento especial ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, por ter me proporcionado um grande crescimento profissional e pessoal.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
3. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	13
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. OBJETIVO GERAL	17
5. REVISÃO DE LITERATURA	18
5.1 AS BROMÉLIAS E A MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DAS CULTURAS NODULARES.....	18
5.2. A METILAÇÃO DO DNA E O DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS	21
5.3. AS POLIAMINAS E SEUS PAPEIS NO DESENVOLVIMENTO E NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE DE PLANTAS.....	24
6. MATERIAL E MÉTODOS	27
6.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> E PADRONIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	27
6.2. INDUÇÃO DAS CULTURAS NODULARES (CN).....	28
6.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANATÔMICA.....	28
6.4. METILAÇÃO GLOBAL POR HPLC	29
6.4.1. Extração de DNA	29
6.4.2. Digestão de ácidos nucleicos	30
6.4.3. Análise por HPLC/UV	31
6.5. DETERMINAÇÃO DE POLIAMINAS (PAS) LIVRES ENDÓGENAS.....	32
6.5.1. Extração de Poliaminas	32
6.5.2. Dansilação de poliaminas.....	32
6.5.3. Identificação e quantificação de poliaminas livres	33
6.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
7.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E ANATÔMICAS DAS CN.....	35
7.2 METILAÇÃO GLOBAL DO DNA DURANTE A INDUÇÃO DAS CN.....	39
7.3 CONTEÚDO E CARACTERIZAÇÃO DAS POLIAMINAS LIVRES ENDÓGENAS	46

8. CONCLUSÕES	51
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP = polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado

(Amplified Fragment Length Polymorphism)

ANA - ácido α -naftalenoacético

ANOVA = Análise da Variância

AzaC – 5-Azacidina

BAP - 6-benzilaminopurina

CNs - Culturas Nodulares

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

DNA MTase - DNA metiltransferase

dNTP - deoxirribonucleotídeo fosfatado

ES – embriogênese somática

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

2,4-D - 2.4-ácido diclorofenoxiacético

MET1 – Metiltransferase 1

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MS - formulação salina de Murashige & Skoog (1962)

MSB - meio MS básico

% - porcentagem

μ g – micrograma

μ M – micromolar

μ L – microlitro

μ m - micrometro

5mC – 5'-metilcitidina

5mdC – 5'-metildeoxicitidina

PÁS - Poliaminas

Put – Putrescina

Spd – Spermidina

Spm - Spermina

UV - ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem da espécie de Bromélia <i>Vriesea reitzii</i> Leme & Costa, objeto de estudo do presente trabalho. (DAL VESCO, 2010).	13
Figura 2. Mecanismos moleculares da interação entre Auxina e Citocinina na regulação do desenvolvimento do meristema. CK – citocinina. (SU et al., 2011).	19
Figura 3. Culturas nodulares de <i>Vriesea reitzii</i> . Destaque para os grupos de células em proliferação: 1 – Camada central; 2 – Zona meristemática (zm) e 3 – Estruturas globulares contendo a protoderme (pt). (DAL VESCO e GUERRA, 2010).	20
Figura 4. Mecanismo de silenciamento do gene mediado pela histona desacetilase 6 (HDA6) e pela citosina metiltransferase (MET1) (KIM et al., 2012).	21
Figura 5. Ilustração diagramática da regulação do desenvolvimento de plantas pela metilação da citosina por meio da rota de metilação do DNA direcionada pelo RNA (RdDM) (ZHANG et al. 2010).	23
Figura 6. Brotações de <i>Vriesea reitzii</i> selecionadas por tamanho serviram de fonte de bases foliares para a indução das culturas nodulares (CN)	27
Figura 7. Indução de CN a partir de explantes foliares de <i>Vriesea reitzii</i> cultivadas em meio de cultura MSB suplementado com ANA (4µM) e BAP (2µM), durante o período de quatro semanas	38
Figura 8. Representação esquemática dos eventos que modulam a indução e o desenvolvimento inicial das CN a partir de bases foliares em <i>Vriesea reitzii</i>	38
Figura 9. Porcentagem de metilação (5mdC) em relação ao tempo de cultivo (semana) das bases foliares de <i>V. reitzii</i> em meio de cultura MSB suplementado com ANA (4µM) e BAP (2µM) para a indução de CN.	39
Figura 10. Esquema ilustrativo dos possíveis mecanismos envolvidos na regulação da morfogênese in vitro das CN de <i>Vriesea reitzii</i> durante o decréscimo da metilação do DNA.	45
Figura 11. Teores endógenos médios (µg.g ⁻¹ de massa fresca) das poliaminas livres Putrescina, Espermidina e Espermina, em relação ao tempo (semana) de indução das CNs a partir de bases foliares cultivadas em meio de cultura MSB suplementado com ANA (4µM) e BAP (2µ)	47

Figura 12. Resumo esquemático dos eventos ocorridos durante a indução e o desenvolvimento inicial de CN de *Vriesea reitzii*. 52

RESUMO

Vriesea reitzii Leme & Costa é uma bromélia da Floresta Atlântica, ocorre em altitudes que variam de 750 a 1200m, e é endêmica no estado de Santa Catarina. Em um contexto de coleta desordenada e ameaça de extinção, destaca-se a importância das técnicas de cultura de tecidos, as quais possibilitam a propagação massal desta espécie e a redução da pressão de coleta na natureza. O sistema regenerativo definido como Culturas Nodulares (CNs) configura como uma estratégia eficiente para a micropropagação dessa bromélia, visto que culmina na produção múltipla de brotos adventícios. Supõe-se que a aquisição da competência celular *in vitro* para a obtenção de CNs é modulada pelos percentuais de metilação global do DNA e pelo conteúdo de poliaminas livres, e que ambos são mediadores-chave da morfogênese *in vitro* e estão envolvidos na regulação da expressão gênica. Então, o objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica da metilação global do DNA nuclear e das poliaminas (PAs) livres endógenas durante a indução e o desenvolvimento inicial das culturas nodulares (CNs) provenientes de explantes foliares de brotos *in vitro* de *Vriesea reitzii*. Para tanto, brotos submetidos a sucessivos subcultivos em meio MS básico líquido suplementado com ANA (2 μ M) mais BAP (4 μ M) foram individualizados, padronizados por tamanho e incubados em meio MSB líquido isento de fitorreguladores. Após 3 semanas, esses brotos foram utilizados como fonte de explantes para excisão das bases foliares. Bases foram inoculadas sobre ponte de papel em tubos de ensaio contendo meio MSB líquido suplementado com ANA (4 μ M) + BAP (2 μ M). Amostras representativas foram coletadas em T0 (base segmentada, mas não inoculada), T1, T2, T3 e T4 (uma, duas, três e quatro semanas de cultivo, respectivamente.) e congeladas a -80°C . Bases foliares recém-coletadas nos respectivos tempos de cultivo foram submetidas à caracterização morfológica por meio de registro em microscópio estereoscópio e a análises histoquímicas. Amostras obtidas nos tempos de cultivo descritos foram submetidas à extração de DNA, à posterior digestão de ácidos nucleicos, e à detecção da porcentagem de metilação da citosina (% 5mdC) em HPLC/UV. Amostras dos mesmos tempos de cultivo foram submetidas à identificação e quantificação das PAs em HPLC/UV após extração e dansilação delas. As culturas nodulares originam-se a partir da proliferação de células meristemáticas da base foliar e em duas semanas de cultivo evidenciou-se a sua formação. Durante a indução de CNs observou-se um decréscimo expressivo nos percentuais de metilação (5mdC) também evidenciado em T2, sendo que em T0 houve 24,8% de metilação e em T4 12,5%. Portanto, existe uma correlação entre percentuais de 5mdC e competência para indução de CNs e o evento epigenético envolvido na morfogênese *in vitro* foi a demetilação. Os teores endógenos das PAs livres Espermidina (Spd) e Espermina (Spm) mantiveram-se constantes durante a indução das CNs. A Putrescina (Put) apresentou um aumento a partir de T2 o que indica que o seu envolvimento na divisão celular.

ABSTRACT

Vriesea reitzii Leme & Coasta is a bromeliad from the Atlantic Forest, occurs at elevations ranging from 750 to 1200m, and is endemic in the state of Santa Catarina. In a context of disordered collection and threat of extinction, we highlight the importance of tissue culture techniques, which the mass propagation of this species and the reduction of pressure in the natural habitat. The regenerative system defined as Nodule Clusters (NCs) configured as an efficient strategy for micropropagation of this bromeliad, since culminates in the production of multiple adventitious shoots. It is assumed that the acquisition of in vitro cell competence to obtain NCs is modulated by the global methylation percentage of the DNA and the content of free polyamines, and both are key mediators in vitro morphogenesis and are involved in regulating the expression gene. So, the aim of this study was to evaluate the dynamics of the global nuclear DNA methylation and polyamines (PAs) endogenous free during induction and early development of nodule clusters (NCs) from leaf explants of in vitro shoots of *Vriesea reitzii*. For both, shoots subjected to successive subcultures in MS medium supplemented with NAA net (2 mM) plus BAP (4 mM) were individualized, standardized by size and incubated in MSB liquid medium free of growth regulators. After 3 weeks, these buds were used as source of explants for excision of leaf bases. Bases were inoculated on paper bridge in test tubes containing MSB liquid medium supplemented with NAA (4 mM) + BAP (2 mM). Representative samples were taken at T0 (segmented basis but not inoculated) T1, T2, T3 and T4 (one, two, three and four weeks of culture, respectively). And frozen at -80°C. Freshly collected in their times of cultivation bases underwent morphological characterization by registering a stereoscopic microscope and histochemical analyzes. Samples obtained in cultivation periods described were subjected to DNA extraction, the subsequent digestion of nucleic acids, and detection of the percentage of cytosine methylation (% 5mdC) HPLC/UV. Samples from the same culture times were submitted for identification and quantification of PAs in HPLC / UV after extraction and dansylation them. Nodule clusters arise from the proliferation of meristematic cells of leaf base and in two weeks of culture showed up his training. During induction of NCs observed a significant decrease in the percentage of methylation (5mdC) also evidenced in T2, and was 24.8% at T0 and T4 methylation of 12.5 %. Therefore, there is a correlation between percentage of 5mdC and competence for induction of NCs and the epigenetic event involved in morphogenesis in vitro was demethylation. The endogenous levels of free PAs spermidine (Spd) and Spermine (Spm) remained constant during the induction of NCs. The Putrescine (Put) showed an increase from T2 indicating that their involvement in cell division.

3. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

As bromélias consistem em um grupo taxonômico de grande importância, as quais são endêmicas do bioma Mata Atlântica, um *hotspot* de biodiversidade (MYERS et al., 2000), onde contribuem para a manutenção da estabilidade dos ecossistemas (ARANDA-PERES e RODRIGUEZ, 2006). *Vriesea reitzii* Leme & Costa (FIGURA 1) é uma espécie endêmica do estado de Santa Catarina (REITZ, 1983), ocorre na Floresta Ombrófila Mista (LEME e COSTA, 1991) em altitudes que variam de 750 a 1200m (BAENSCH e BAENSCH, 1994).

Em função de seu uso ornamental e paisagístico, ela vem sendo extraída de forma desordenada de seu habitat natural, encontrando-se em perigo de extinção. Neste contexto, destaca-se que as técnicas de cultura de tecidos possibilitam a sua propagação massal e a redução da pressão de coleta na natureza.



Figura 1. Imagem da espécie de Bromélia *Vriesea reitzii* Leme & Costa, objeto de estudo do presente trabalho (DAL VESCO, 2010).

Embora apresentem grande potencial ornamental, poucas espécies de bromélias são produzidas em escala comercial, em razão da sua disponibilidade e fácil retirada do ambiente natural. Desta maneira, pouco tem sido feito para se estabelecer sistemas de cultivo visando suprir a sua

demanda crescente no mercado ornamental (ANACLETO e NEGRELLE, 2009) e assim minimizar o perigo de extinção da espécie. Para evitar a erosão genética de espécies nestas condições, tem sido desenvolvidos protocolos de propagação e conservação das espécies nativas.

Segundo Guerra e Dal Vesco (2010) as técnicas de cultura de tecidos têm se apresentado como uma estratégia de conservação e propagação em larga escala para as espécies ameaçadas, já sendo aplicadas para várias espécies de bromélias nativas (ALVES; GUERRA, 2001; POMPELLI et al., 2004; RECH FILHO et al., 2005; DAL VESCO et al., 2010; DAL VESCO et al., 2011). Ao mesmo tempo, as técnicas de cultivo *in vitro* têm permitido o estudo da fisiologia das bromélias, relacionado ao efeito das alterações hormonais nos tecidos (ALVES et al., 2006; DAL VESCO e GUERRA, 2010; DAL VESCO et al., 2011; SCHERER et al., 2013).

Os sistemas tradicionais de cultivo regenerativos *in vitro* e mais comumente conhecidos são a embriogênese e a organogênese somática. Um padrão de resposta que apresenta características diferenciadas desses sistemas e que pode ser classificada como uma terceira via da morfogênese *in vitro* (GEORGE, 1993) é observada em Bromélias. Este sistema regenerativo é definido como culturas nodulares (CNs) e se configura em uma estratégia eficiente para a micropropagação em grande escala, para esta e outras bromélias do gênero, já que em condições de cultura adequadas apresentam alto potencial regenerativo, culminando na produção múltipla de brotos adventícios (GUERRA e DAL VESCO, 2010).

O sistema de culturas nodulares foi descrito para o gênero *Vriesea* por Alves e Guerra (2001); Rech Filho et al. (2005); Alves et al. (2006) e mais recentemente por Guerra e Dal Vesco (2010); Dal Vesco e Guerra (2010). Culturas nodulares são definidas como grupos de nódulos organogênicos de forma globular, de coloração verde amareladas a translúcidas, apresentando textura friável a levemente compacta e compostas basicamente por aglomerados meristemáticos que, e em condições de cultivo adequado, resultam na regeneração múltipla de brotos (DAL VESCO et al., 2011; SCHERER et al., 2013).

Uma das estratégias para a indução de CN em bromélias se baseia no uso de bases foliares (ALVES et al., 2006; RECH FILHO et al., 2009; DAL

VESCO, 2010), que se fundamenta na existência de elementos vasculares na região basal das folhas de bromélias que contêm células competentes para re-diferenciação quando ativadas por sinais regulatórios (HOSOKI & ASAHIRA, 1980). O início do desenvolvimento de *Vriesea reitzii* foi observado a partir de tecidos parenquimáticos após três semanas em cultura, sendo que o elevado potencial de regeneração de explantes foliares foi atribuído à presença do meristema intercalar na região basal das folhas (HOSOKI & ASAHIRA, 1980).

Corredor (2012) caracterizou os aspectos morfo-histoquímicos envolvidos durante a formação das CNs de *V. reitzii* e verificou que o início da sua indução ocorreu a partir dos meristemas intercalar e marginal presentes nas bases foliares a partir da segunda semana de cultivo em meio suplementado com ácido α -naftalenoacético (ANA) (2 μ M) mais 6-benzilaminopurina (BAP) (4 μ M) (A2B4). Tendo em vista que este sistema regenerativo é afetado pelo tipo e concentração dos reguladores de crescimento empregados (GAHAN & GEORGE, 2008), em trabalhos anteriores buscou-se a criação de métodos que ajustassem a composição do meio de cultura (RECH FILHO et al., 2005; ALVES et al., 2006; DAL VESCO, 2010). O meio de cultivo MS básico suplementado com A₄B₂ tem sido empregado para a indução das CN de *V. reitzii* a partir dos resultados obtidos por Dal Vesco e Guerra (2010).

A fase de indução de culturas nodulares envolve processos de sinalização celular, estimulados por auxinas e citocininas, os quais estão envolvidos na decisão das células durante o ciclo celular, visto que são sinalizadores para a entrada na rota de transdução de sinais que levará ao processo morfogenético. As etapas que envolvem a aquisição da competência das células meristemáticas e os reguladores de crescimento necessitam de uma regulação precisa da expressão de genes específicos associados à formação dos meristemas.

A metilação do DNA, que consiste no principal mecanismo epigenético em plantas, envolve o silenciamento gênico e, em muitas situações, é essencial para a aquisição da competência celular *in vitro* durante estádios específicos do desenvolvimento (RUIZ-GARCÍA et al. 2005). A metilação da citosina em regiões promotoras pode afetar a expressão gênica e, portanto, pode contribuir com a variação fenotípica e o desenvolvimento das plantas (ZHANG et al.,

2010). Ela regula vários processos envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas e seus distintos padrões podem ser um reflexo dos diferentes processos do desenvolvimento envolvidos (CHAKRABARTY et al., 2003). Tem sido discutido que é possível relacionar o *status* de metilação específico à competência morfogênica *in vitro*, e que mudanças específicas na metilação do DNA de plantas estão associadas com o desenvolvimento (NOCEDA et al. 2009).

Por sua vez, as poliaminas (PAs) têm sido consideradas fortes sinalizadoras na proliferação e diferenciação celular em processos como a embriogênese somática e durante a exposição das plantas a estresses ambientais (KAUR-SAWHNEY et al. 2003; SILVEIRA et al. 2004; KUSANO et al. 2007). Poliaminas como a Putrescina, espermidina e espermina são consideradas as mais importantes para as plantas, atuam em estágios essenciais do desenvolvimento embriogênico (Minocha et al., 1999). Elas têm sido indicadas como atuantes em muitos eventos celulares, como por exemplo, replicação do DNA nuclear (TASSONI et al., 2000).

Supõe-se que a aquisição da competência celular *in vitro* para a obtenção de CNs é modulada pelos níveis de metilação do DNA e pelo conteúdo e tipo de poliamina, e que ambos são mediadores-chave da morfogênese *in vitro* e estão envolvidos na regulação da expressão gênica. Não há estudos envolvendo esta rota morfogenética e estas variáveis para espécies de bromélias. Portanto, a avaliação da metilação global do DNA e dos teores e tipos de poliaminas é de grande relevância para o entendimento e elucidação dos pontos de controle associados a fases específicas durante a indução e o desenvolvimento inicial das CNs em *Vriesea reitzii*.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetivou avaliar o padrão de desenvolvimento de plântulas da bromélia *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa provenientes de explantes foliares e estudar processos avançados de cultivo *in vitro* na regeneração de brotos adventícios por meio de culturas nodulares.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Caracterizar etapas específicas do desenvolvimento inicial das culturas nodulares (CNs) em *Vriesea reitzii* por meio de análises morfológicas e histoquímicas;
- ii) Estudar a dinâmica dos níveis de metilação global do DNA durante a indução e desenvolvimento inicial das culturas nodulares (CNs) associados às características morfo-anatômicas;
- iii) Determinar o conteúdo endógeno das poliaminas (PAs) livres putrescina, espermidina e espermina durante a indução e o desenvolvimento inicial das culturas nodulares (CNs).

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 AS BROMÉLIAS E A MORFOGÊNESE *IN VITRO* DAS CULTURAS NODULARES

As florestas neotropicais do mundo apresentam considerável diversidade biológica de epífitas vasculares, contribuindo com a manutenção desses ecossistemas, bem como, com a biodiversidade (BENZING, 1990). Dentre as epífitas vasculares representadas por pteridófitas e angiospermas, destacam-se as Bromeliaceae (BENZING, 1990).

A família Bromeliaceae está distribuída pelos Neotrópicos possuindo 58 gêneros em 3172 espécies e subespécies (LUTHER, 2008; GIVNISH et al., 2011). Desse total, 40 % das espécies são encontradas em território brasileiro (MOLLO et al., 2011). No Brasil, a maior riqueza de espécies dessa família ocorre na Floresta Atlântica, sendo que nas regiões Sul e Sudeste existem populações com elevado endemismo (REITZ, 1983; MARTINELLI, 2000).

A coleta das bromélias para fins ornamentais e comerciais, bem como o desmatamento das Florestas tropicais causam uma redução na sua biodiversidade (RECH FILHO et al., 2005), o que pode levar à extinção de espécies.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais possibilitam por meio de um conjunto de estratégias a propagação massal e conservação das espécies (REICH FILHO et al., 2005). O estabelecimento de protocolos e sistemas regenerativos *in vitro* tem aplicação tanto para a conservação quanto para a propagação em grande escala e eles compõem estratégias importantes em bromélias (DAL VESCO et al., 2011).

A utilização de sementes como fonte inicial de explante consiste em uma estratégia importante para a conservação da espécie, mantendo a variabilidade genética (RECH FILHO et al., 2005; SILVEIRA et al., 2009). Por sua vez, a utilização de explantes foliares tem relevância para a propagação clonal em grande escala pelo alto potencial de regeneração que apresentam (DAL VESCO e GUERRA, 2010).

Na indução de culturas nodulares, os explantes mais comumente utilizados são a base foliar (bainha) e os segmentos nodais. Nos estudos de

indução de culturas nodulares de Bromeliaceae foram utilizados 2,4-D e KIN, ANA e 2-iP e ANA e BAP para *Vriesea reitzii* (ALVES et al., 2006; DAL VESCO & GUERRA, 2010; DAL VESCO, 2010), TDZ ou BAP e ANA para *Billbergia zebrina* (DAL VESCO et al., 2011).

Os reguladores de crescimento exercem sua função por meio do reconhecimento de receptores específicos, presentes nessas células, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (HARADA, 1999). Entre os reguladores, as auxinas e as citocininas, foram postuladas como as duas classes hormonais que agem conjuntamente, controlando o desenvolvimento vegetal e atuando diretamente na definição dos meristemas e, portanto, no tipo de órgão a ser formado (SKOOG & MILLER, 1957). Os hormônios vegetais têm apresentado variações estágio-específicas, podendo ser utilizados como marcadores moleculares durante os processos de morfogênese *in vitro* (FLOH et al, 2007).

A forma como auxina e citocinina atuam na formação do meristema foi descrita por Su et al., (2011). Auxina antagoniza citocinina para iniciação do primórdio de órgão na zona periférica do meristema caulinar, sendo que a citocinina tem o papel de proliferação celular para manutenção das células-tronco na zona central por meio da regulação do *feedback* negativo entre *WUSCHEL* e *CLAVATA 3* (FIGURA 2A). Também no meristema caulinar, a auxina reprime a biossíntese de citocinina para regulação da produção de brotos e aumento da dominância apical (FIGURA 2B).

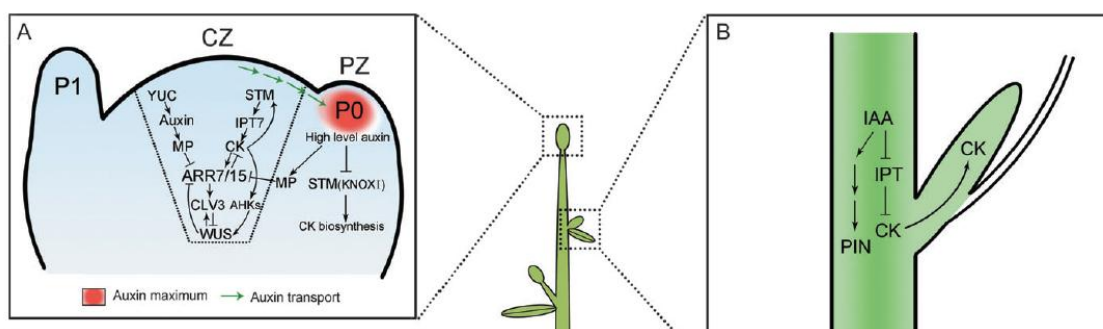


Figura 2. Mecanismos moleculares da interação entre Auxina e Citocinina na regulação do desenvolvimento do meristema. CK – citocinina. (SU et al., 2011).

A indução das CN, regulada pela interação de tipos e concentração de hormônios, envolve a formação de camadas de células, as quais foram

caracterizadas por Dal Vesco e Guerra (2010): 1) Camada central, composta por um grupo maior de células não organizadas de diferentes tamanhos; 2) Região mais externa, contendo um grupo de pequenas células mais adensadas e isodiamétricas denominado de zona meristemática e; 3) Região externa onde se forma a protoderme e organizam-se as estruturas globulares chamadas culturas nodulares (FIGURA. 3).

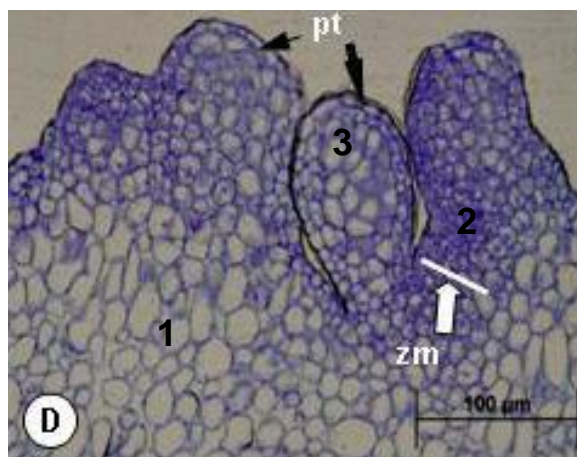


Figura 3. Culturas nodulares de *Vriesea reitzii*. Destaque para os grupos de células em proliferação: 1 – Camada central; 2 – Zona meristemática (zm) e 3 – Estruturas globulares contendo a protoderme (pt). (DAL VESCO e GUERRA, 2010).

Os eventos que levam à indução das CN baseiam-se no princípio da totipotência das células vegetais, ou seja, na potencialidade de uma única célula se diferenciar e regenerar uma planta completa (KERBAUY, 1998). A totipotência é uma característica especial de células em tecidos mais novos e meristemas. No entanto, ela pode ser exibida por algumas células diferenciadas, tais como as células cambiais e as células em paliçadas da folha (GEORGE, 2008).

As variações na forma e nas funções das células, resultantes de mudanças quantitativas e alterações qualitativas dos componentes celulares, conduzem ao processo morfogenético que depende, sobretudo, da intensidade de determinação e da competência das células (GEORGE, 1996).

Basicamente a regeneração ou morfogênese *in vitro* consiste de três fases: desdiferenciação, que é a perda da especialização e a reversão da célula diferenciada, onde o tecido adquire competência para responder ao processo morfogênico; indução, quando as células se tornam determinadas a

desenvolver uma estrutura (monopolar ou bipolar); e desenvolvimento, com crescimento de órgãos ou embrião (DE KLERK et al., 1997; KERBAUY, 1998).

5.2. A METILAÇÃO DO DNA E O DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS

Entende-se por Epigenética como as mudanças hereditárias na expressão do gene que ocorrem sem as mudanças na sequência de DNA (WOLFFE & GUSCHIN, 2000). Os mecanismos epigenéticos são parâmetros flexíveis no genoma que podem mudar sua função mediante influências exógenas, e também permitem a propagação estável dos estados da atividade dos genes a partir de uma geração de células para a próxima (BOLLATI & BACCARELLI, 2010).

Dentre os níveis de controle da expressão gênica, destaca-se que a desacetilação da cromatina e a metilação do DNA são os principais mecanismos epigenéticos em eucariotos, os quais estão envolvidos com o silenciamento do gene, que ocorre por meio da cooperação entre a enzima histona desacetilase 6 (HDA6) e a enzima citosina metiltransferase (MET1) (FIGURA 4), e com a modificação da sua expressão sob os diferentes estímulos recebidos pela célula (KIM et al., 2012).

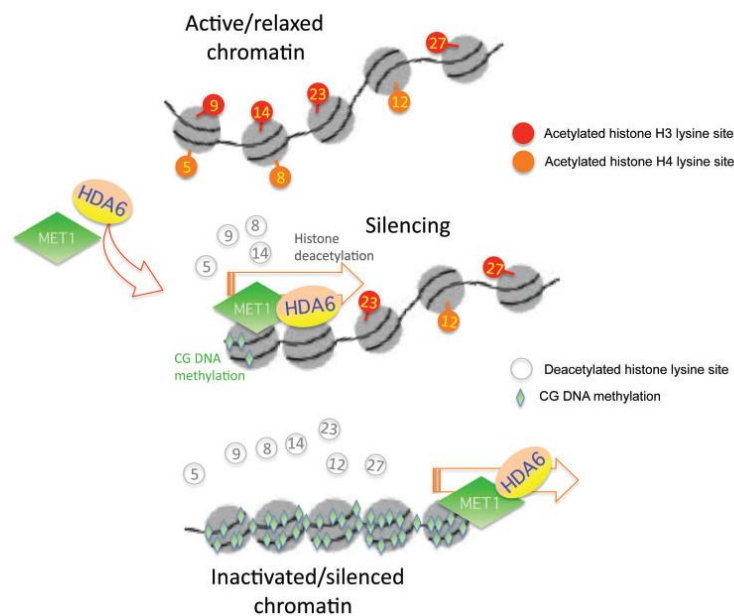


Figura 4. Mecanismo de silenciamento do gene mediado pela histona desacetilase 6 (HDA6) e pela citosina metiltransferase (MET1) (KIM et al., 2012).

Conforme Fransz e Jong (2002), o mecanismo do silenciamento de genes envolve a capacidade de a citosina metilada atrair proteínas de ligação ao grupamento metil, que por sua vez recrutam histona desacetilase e proteínas de remodelamento da cromatina para formar um complexo que dificulta a ligação a fatores de transcrição.

A metilação do DNA refere-se à adição do grupo metil pós-síntese de deoxicitosinas na posição 5' do anel de pirimidina da citosina para formar metildeoxicitosina. Esta modificação pode ocorrer em qualquer sequência no DNA de plantas, mas a transmissão dos padrões de metilação somente pode ocorrer em sequências simétricas CG, CHG ou CHH, onde H pode ser qualquer deoxynucleotídeo (FINNEGAN, 2010). A metilação do DNA em plantas é mais comum em ilhas CG, que é uma característica dos transposons, e devido à alta presença desses elementos no genoma de plantas, contribui-se com o aumento nos níveis de metilação da citosina (VALLEDOR et al. 2007).

Segundo Rabinowicz et al. (2003), transposons são metilados em condições normais, mas uma diminuição na metilação global, em condições de cultura de tecidos, estaria relacionada com a expressão desses elementos, controlada pelo grau de metilação de suas sequências.

A metilação da citosina precisa ser dinâmica e ela ocorre por meio da expressão coordenada de vários tipos de DNA metiltransferases (DNA MTases), DNA glycosilases e fatores de remodelamento da cromatina, os quais têm um papel essencial no desenvolvimento de plantas (Miguel & Marum, 2011). Neste contexto, os siRNAs parecem desempenhar um indispensável papel pela correção oportuna do padrão de metilação através da rota de metilação do DNA direcionada pelo RNA (RdDM) (FIGURA 5) (ZHANG et al., 2010).

Os padrões de metilação resultam não somente do estabelecimento e manutenção de citosina metilada, mas também da demetilação (ZHU et al., 2007), que pode ser passiva, quando citosina metilada é substituída pela citosina não metilada durante a replicação do DNA ou ativa, quando o grupamento metil é removido pelas DNA glicosilases (DME e ROS1) (ZHANG et al. 2010).

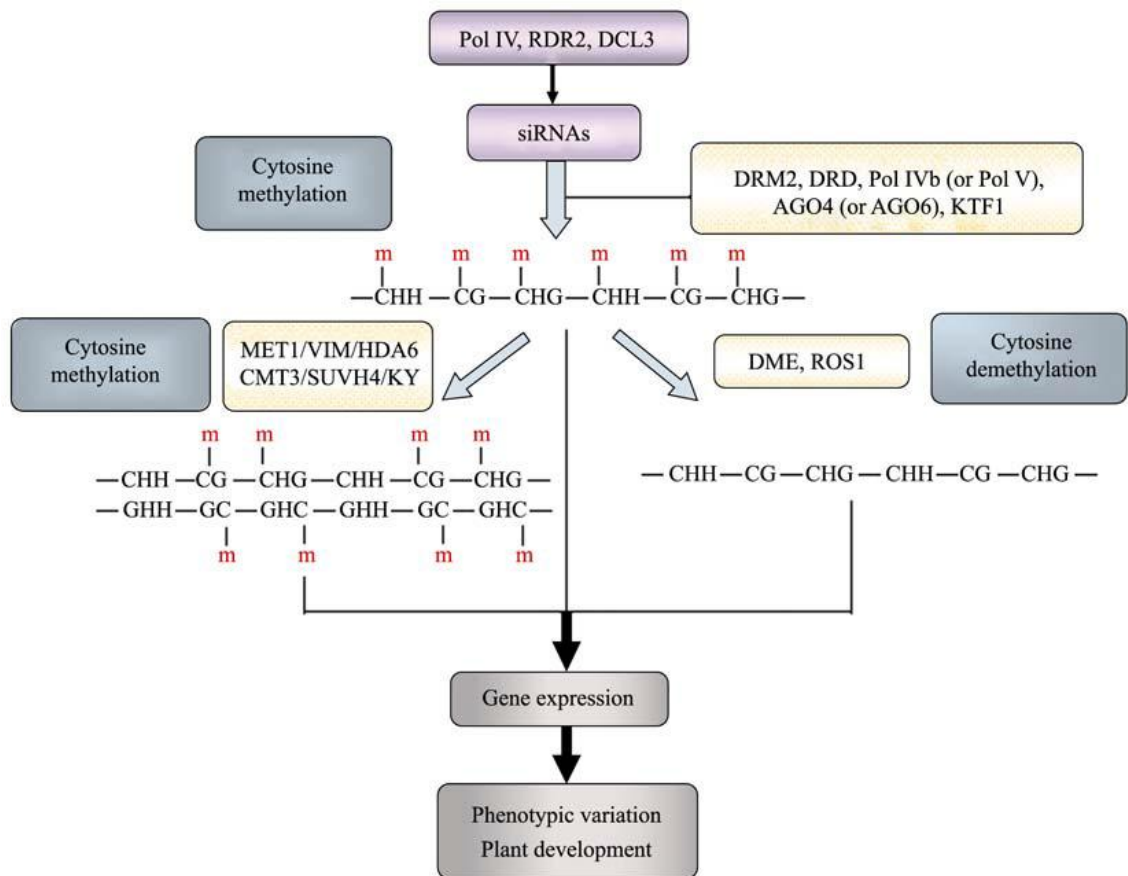


Figura 5. Ilustração diagramática da regulação do desenvolvimento de plantas pela metilação da citosina por meio da rota de metilação do DNA direcionada pelo RNA (RdDM) (Zhang et al. 2010). Destaque para as enzimas MET1, responsável pela metilação da citosina, e para as enzimas ROS1 e DME, que promovem a demetilação.

Muitos processos do desenvolvimento de plantas ocorrem a partir do balanço de metilação/demetilação o qual resulta no controle da expressão gênica. Em *Arabidopsis* DME é requerida para o desenvolvimento de sementes viáveis (CHOI et al., 2002), e ela atua antagonicamente com a MET1 no controle do desenvolvimento de sementes (XIAO et al., 2003). Estudos usando mutantes de MET1 mostram que esta enzima é essencial para a embriogênese e a formação de sementes viáveis em *Arabidopsis* (XIAO et al., 2006).

A demetilação desempenha um papel integral na regulação do tempo de florescimento em *Arabidopsis*. A identificação de genes chave que controlam esse processo apontam que a redução na metilação medeia a vernalização. *FLC*, gene que codifica um repressor do florescimento, tem sua expressão reduzida quando há baixa metilação (SHELDON et al. 1999).

Tanurdzic et al. (2008) propuseram que a desdiferenciação inicialmente envolve a perda de marcas epigenéticas. Conforme os autores, a expressão de MET1 em *Arabidopsis* é menor durante a fase inicial do cultivo de suspensão de células. Subsequentemente, novas marcas epigenéticas precisam ser estabelecidas quando geralmente MET1 é aumentada na cultura de tecido enquanto que a DNA demetilase ROS1 é diminuída.

Seedlings jovens de *Arabidopsis* tiveram menores níveis de metilação do que folhas maduras (FINNEGAN et al. 1998). Ruiz-García et al., (2005) observaram diferentes padrões de metilação em diferentes órgãos também em *Arabidopsis* e observaram um aumento dela durante o desenvolvimento. Segundo eles, transições entre diferentes fases do desenvolvimento envolvem mudanças no padrão de diferenciação celular e formação do órgão no meristema apical que são regulados geneticamente e a metilação do DNA atua como um mecanismo para manter epigeneticamente decisões de desenvolvimento durante a proliferação de células. Portanto, a metilação do DNA desempenha um importante papel na regulação da expressão dos genes envolvidos com o desenvolvimento de plantas e a sua dinâmica tem um papel essencial na manutenção da plasticidade epigenômica que permite as respostas das células aos sinais do desenvolvimento.

5.3. AS POLIAMINAS E SEUS PAPEIS NO DESENVOLVIMENTO E NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE DE PLANTAS

As poliaminas (PAs) espermidina (Spd), espermina (Spm) e sua precursora obrigatória a diamina putrescina (Put), são pequenas aminas alifáticas presentes em células de plantas (BOUCHEREAU et al. 1999), podendo ser encontradas na forma livre ou conjugada (TIBURCIO et al. 1997). Consistem em policátions e estão relacionadas com a regulação da divisão celular, diferenciação e a morfogênese (GALSTON & KAURSAWHNEY, 1995). Os níveis encontrados nas células são significativamente maiores do que os hormônios de plantas, sendo que as concentrações endógenas requeridas para efeito biológico alcançam o milimolar (BAIS & RAVISHANKAR, 2002).

As PAs são sintetizadas a partir de aminoácidos através da descarboxilação. Na biossíntese, Put é a primeira a ser sintetizada a partir dos

aminoácidos ornitina e/ou arginina, em uma reação catalisada por Ornitina Descarboxilase (ODC) e Arginina Descarboxilase (ADC), respectivamente (KAKKAR et al. 2000). A distribuição e atividade de ADC e ODC nos diferentes tecidos e plantas são regulados no desenvolvimento e de um modo tecido-específico (MINOCHA et al. 1995).

As poliaminas Spd e Spm são sintetizadas por uma adição sequencial de grupos aminopropil à Put via reação envolvendo S-adenosilmetionina descarboxilase (SAM) bem como, espermidina e espermina sintases (Bais e Ravishankar, 2002). As PAs são degradadas via enzimas oxidativas diaminoxidases (DAO) que oxidam Put e poliaminas oxidases (PAO) que oxidam Spd e Spm (TIBURCIO et al. 1997). Aminas alifáticas Put e Spd são mais ativamente oxidadas (SMITH, 1974).

Na cultura de tecidos, as poliaminas vêm sendo utilizadas como reguladores vegetais, buscando-se obter respostas como a embriogênese somática (YADAV E RAJAM, 1997). O aumento dos teores endógenos de poliaminas, pela aplicação exógena promove a embriogênese somática (MINOCHA E MINOCHA, 1995; YADAV E RAJAM, 1998). Steiner et al. (2007) observaram que PAs exógenas aumentaram o crescimento das culturas embriogênicas de *A. angustifolia*, sendo que o maior incremento em matéria fresca foi observado nas culturas submetidas ao meio suplementado com Put e Spm.

As PAs estão envolvidas com a transmissão dos sinais celulares, visto que as mesmas regulam a síntese de óxido nítrico, o qual é considerado transmissor de sinais na célula (BESSON-BARD et al., 2008). Elas modulam processos morfogenéticos (ALTAMURA et al., 1993), e suas atividades aumentam principalmente em tecidos de plantas em crescimento e diferenciação, durante a embriogênese, formação da raiz, desenvolvimento do fruto e durante a resposta a fatores de estresse bióticos e abióticos (KUMAR et al., 1997).

Além de as poliaminas mostrarem efeitos durante os eventos organogenéticos (TANG et al., 2004), são atribuídos a essas substâncias efeitos antioxidantes de proteção às células, membranas, ácidos nucléicos e ácidos graxos de danos oxidativos como a peroxidação de lipídeos (LOVAAS, 1997; BOUCHEREAU et al. 1999). Quando a Put é catabolizada, produz H₂O₂ para

sinalização e ativação do sistema antioxidante (GROPPIA & BENAVIDES 2008).

Debiasi et al. (2007) afirmam que o aumento nos teores de Put tem sido atribuído a diferentes tipos de estresse, o que indicaria que os tecidos em que ocorre esse evento estariam sofrendo algum tipo de dano metabólico. Piqueras et al. (2002) descrevem aumento na atividade de enzimas oxidativas como a peroxidase em folhas de *Dianthus caryophyllus* como consequência da hiperhidricidade, devido a danos oxidativos e peroxidação de lipídeos.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO* E PADRONIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Brotos de *Vriesea reitzii* mantidos *in vitro* foram submetidos a sucessivos subcultivos em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) básico (MSB) líquido, constituído pela formulação salina MS adicionado de vitaminas de Morel (MOREL & WETMORE, 1951), sacarose (30g L⁻¹) e suplementado com ANA (2 µM) mais BAP (4 µM), segundo a metodologia descrita por Dal Vesco e Guerra (2010), para promover a multiplicações das brotações.

Para promover o crescimento dos brotos e a padronização por tamanho, as brotações jovens de 2 a 4 cm de altura foram individualizadas em câmara de fluxo laminar (FIGURA 6A) e subcultivadas em novos meios de cultura. No subcultivo foram inoculados oito brotos em cada frasco do tipo conserva de 200 ml (FIGURA 6B) e a cada um deles foram adicionados 10 ml de meio de cultura MSB líquido e isento de fitorreguladores. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,5 e em seguida esterilizado durante 15 min a 121°C e 1.3 atm em autoclave

Após, os brotos foram colocados nos meios de cultura e permaneceram por 3 semanas em cultivo. As culturas foram incubadas em ambiente com 25 ±2 °C, 50-60 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa obtidas com lâmpadas fluorescentes Sylvania® (40-60 W) branca fria e fotoperíodo de 16 h, com uma distância de 10-12 cm de altura das culturas (GUERRA & DAL VESCO, 2010).

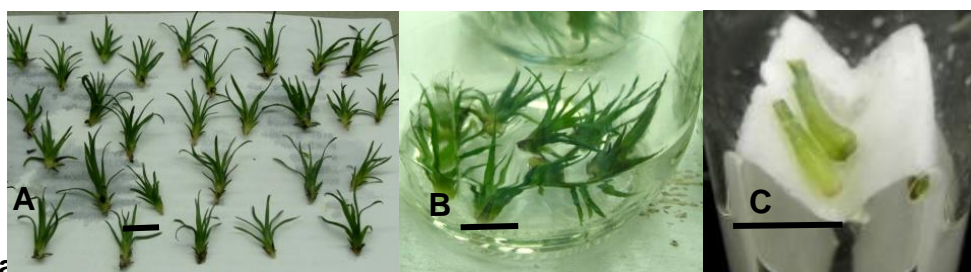


Figura 6 Indução de bases foliares para a indução das culturas nodulares (CN) A) Individualização de brotos após sucessivos subcultivos provenientes de meio MSB suplementado com ANA (2 µM) e BAP (4 µM); B) Novo subcultivo com 8 brotos por frasco com meio MSB líquido, isento de fitorreguladores após 3 semanas em cultivo; C) Bases foliares sob ponte de papel em tubos de ensaio contendo meio MSB líquido e suplementado com ANA (4 µM) mais BAP (2 µM). Barra = 2 cm.

6.2. INDUÇÃO DAS CULTURAS NODULARES (CN)

Brotos de 3 a 4 cm de altura, após 3 semanas de cultivo em MSB líquido, isento de fitorreguladores, foram utilizados como fonte de explantes para a excisão das bases foliares. Foi implantado experimento de indução das culturas nodulares (CN) a partir de explantes foliares. Três folhas foram retiradas de cada broto, compreendidas entre a 3ª e a 6ª folhas e foram utilizados segmentos de bases foliares de 0,5 a 0,8 cm. Foram inoculados quatro destes em cada tubo de ensaio sobre ponte de papel e contendo 15 ml meio MSB líquido, suplementado com ANA (4 µM) + BAP (2 µM), conforme proposto por Dal Vesco & Guerra (2010) (FIGURA 6C).

O delineamento experimental utilizado foi o Completamente Casualizado (DCC), com cinco tratamentos. Cada tratamento corresponde ao tempo (semanas) de incubação para a indução das culturas nodulares: Tempo zero (base foliar segmentada, mas não inoculada) semana (T0), Tempo de uma semana (T1), Tempo duas semanas (T2), Tempo três semanas (T3) e Tempo de quatro semanas (T4) de incubação. A cada semana de incubação foram coletadas amostras representativas e mantidas em freezer a -80°C para posterior quantificação dos percentuais de metilação global e dosagem e caracterização de PAs livres.

6.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANATÔMICA

Bases foliares recém-coletadas, dos tempos T0, T1, T2, T3 e T4 (semana) de cultivo para a indução das CN, foram fontes de amostras para a caracterização morfo-anatômica. Para a caracterização morfológica as bases foliares inteiras foram registradas por fotomicrografia, com o auxílio do microscópio estereoscópico (Olympus SZH-ILLB), equipado com câmara clara (Olympus DP71).

Para a análise histoquímica, quatro bases foliares, de cada tempo de indução das CNs, foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 durante 24 horas (SCHMIDT et al. 2010). Em seguida, as amostras foram lavadas e desidratadas em série etílica (etanol)

gradual (30, 50 e 70, 90 e 100%) por 30 min cada. Após a desidratação, as amostras foram imersas em solução de pré-infiltração do Kit de historesina (Leica® Historesin, Heidelberg, Alemanha) contendo 50 mL de resina básica e 0,5 g de peróxido de benzoila (ativador) com etanol 96% (1:1, v/v) por 16-18 h a 25 °C. Em seguida as amostras foram imersas em solução de infiltração pura durante 24h e incluídas em solução de infiltração com Endurecedor Leica® (dimetil sulfóxido) na proporção de 15:1 (v/v) e orientadas em cápsulas gelatinosas. Secções longitudinais de 5 µm foram obtidas usando micrótomo de rotação modelo Leica® RM 2135 distendidas em lâminas com uma gota de água e mantidas por 1-2h a temperatura de 42 ±2 °C. As secções foram colocadas em lâminas, coradas com azul de toluidina O a 0.05% em H₂O. Os aspectos relevantes foram identificados e fotografados usando câmara (Olympus DP71) acoplada a microscópio (Olympus ® BX-40).

6.4. METILAÇÃO GLOBAL POR HPLC

6.4.1. Extração de DNA

O protocolo foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal da UFSC. As amostras de bases foliares obtidas nos diferentes tempos de cultivo (T0, T1, T2, T3, T4) para a indução das culturas nodulares foram submetidas inicialmente à extração de DNA, conforme protocolo descrito por DOYLE & DOYLE (1987) adaptado para a extração de DNA da folha de milho. Amostras de 350mg de matéria fresca, que foram compostas por todo o tecido da base foliar, foram maceradas em cadinho de cerâmica com nitrogênio líquido. O macerado obtido foi transferido para tubos tipo *ependorf* de 1,5ml, os quais estavam pré-aquecidos em banho-maria a 65°C com 700µL de tampão de extração CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100mM Tris-Cl, pH 8,0; 2% polivinilpirrolidona e 0,2% de β-mercaptoetanol). O material foi incubado durante 50 minutos e a cada 10min procedia-se uma agitação suave para a homogeneização das amostras.

Após o período de incubação em banho-maria, foram adicionados ao material 600µl de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA), e as amostras foram submetidas à agitação por inversão durante 5min e centrifugadas em

microcentrífuga (12.000 a 15.000 RPM durante 10min). A fase superior aquosa obtida foi transferida para novos tubos.

A estes novos tubos contendo o sobrenadante foram adicionados 500µL de isopropanol gelado para a precipitação do DNA. Para tanto, as amostras foram invertidas suavemente por 10 vezes e foram postas em freezer -20°C por 1 hora. Para a formação do pellet, elas foram submetidas à nova centrifugação (12.000 RPM) por 20min. O mesmo foi lavado com 1ml de álcool 70% gelado por 5 minutos e caso o pellet ainda estivesse escuro era realizada mais uma lavagem em álcool absoluto (gelado) por 3min. A secagem dele foi realizada em capela de exaustão para a evaporação do álcool. O DNA foi ressuscitado em 100 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop® 1000 (NanoDrop Technologies, Inc.), o qual forneceu a concentração de ácido nucléico das amostras.

6.4.2. Digestão de ácidos nucléicos

Esta etapa foi baseada no protocolo de Johnston et al. (2005). As digestões com RNase foram realizadas em tampão TE com 100 µl de ácido nucléico (1 µg.µl⁻¹). Amostras obtidas foram previamente aquecidas a 65°C por 5min para desnaturação e incubadas a 4°C por 10min. Após, foram adicionados 10 µl de RNase A (1 µg.µl⁻¹) e 10 µl de RNase T1 (20 µg.µl⁻¹) e elas foram submetidas ao agitador Vortex e à incubação a 37°C por 17 horas em termociclador.

Finda a digestão, foram adicionados 20 µl de acetato de sódio (3M, pH 5,4) para que se obtivesse uma concentração final de 0,3 M, e os microtubos foram agitados. DNA e RNA resistentes à RNase foram precipitados com 136 µl de isopropanol gelado (-20°C), agitados e incubados por 30min a -20°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 × g por 10 min para a formação do pellet, o qual foi lavado com etanol 70% (v/v) e re-centrifugado a 5000 × g por 5 min. Os pellets foram secos a temperatura ambiente e após ressuscitados em 100 µl de H₂O deionizada e autoclavada. Determinou-se a concentração de ácidos nucléicos em Nanodrop® e as concentrações das amostras ficaram ajustadas em 0,25 µg. µl⁻¹.

As digestões de DNA com nuclease P1 e fosfatase alcalina foram realizadas com os 25 µg de ácido nucléico diluídos em 100 µl de H₂O deionizada, conforme descrito por Johnston et al. (2005). Os ácidos nucléicos foram desnaturados por aquecimento a 100°C por 2 min e mantidos a 4°C por 5 min. Após, foram adicionados 5 µl de ZnSO₄ (10 mM) e 10 µl de nuclease P1 (1.0 U.ml⁻¹ em NaOAc 30 mM e pH 5.4) com posterior agitação das amostras e incubação para a reação de digestão a 37°C por 17 horas em termociclador. Após este período, foram adicionados 10 µl de Tris 0.5 M (pH 8.3) e 10 µl de fosfatase alcalina (10 U.ml⁻¹ em (NH₄)₂SO₄ 2.5 M) aos microtubos, sendo agitados e incubados por 2h a 37°C. Ao final, as amostras foram centrifugadas a 10.000 × g por 5 min e o sobrenadante armazenado a -20°C até a análise por HPLC.

6.4.3. Análise por HPLC/UV

Esta etapa foi baseada no protocolo descrito por Song et al. (2005). Foi utilizada uma coluna Shim-Pack XR-ODS 2,2 µm C18 (30 × 2 mm) (Shimadzu®) e um HPLC Agilent 1200® com bomba quaternária acoplado a um espectrômetro de massa 3200 Q TRAP® LC/MS/MS (Applied Biosystems®). Foram utilizados dois eluentes: eluente A (metanol 95%) e eluente B (ácido fórmico 0,1%), com um gradiente linear de 2 min 1% A e 99% de B e 6 min com 22,5% de A e 77,5% de B para a eluição de nucleosídeos, em um tempo total de corrida de 8 min. A separação foi realizada em um fluxo de 220 µL.min⁻¹, sendo o volume de injeção de 5 µL.

Os padrões de nucleosídeos utilizados foram os mesmos acima descritos, sendo suas concentrações determinadas nas amostras de acordo com a área do pico formado. A identificação de cada nucleosídeo foi feita de acordo com a massa conhecida de cada um (5mdC: 242,1/126,3; dC: 228,2/112,2; dG: 268,1/152,3; dA: 252,3/135,9 a dT: 243,3/127,2 em Daltons). A área dos picos obtidos foi analisada pelo software Analyst 1.5.1 (Applied Biosystems®) sendo selecionados os picos com tempo de retenção médios de 5,7 para a citosina (dC) e de 12 para a citosina metilada (5mdC). A quantificação da citosina metilada - 5mdC (%) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$5mdC (\%) = 5mdC / ((5mdC + dC)) * 100$$

A partir dela, dados de área foram convertidos em dados de % de citosina metilada.

6.5. DETERMINAÇÃO DE POLIAMINAS (PAS) LIVRES ENDÓGENAS

6.5.1. Extração de Poliaminas

O protocolo foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal da UFSC. A determinação de PAs livres foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Silveira et al. (2004). As amostras provenientes dos tempos de cultivo (T0, T1, T2, T3, T4) específicos de indução das CN (média de 260 mg de massa fresca (MF)) foram maceradas com 1,4 mL de ácido perclórico 5% (v/v). O material macerado foi mantido no gelo por uma hora e posteriormente centrifugado a temperatura ambiente a 20.000 g por 20 min. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de ácido perclórico 5%, centrifugado novamente e os dois sobrenadantes coletados nas duas centrifugações foram homogeneizados. A fração sobrenadante contém as PAs livres e conjugadas solúveis em ácido perclórico. Foram coletados 200µL do sobrenadante o qual foi congelado a -20°C para posterior dansilação.

6.5.2. Dansilação de poliaminas

Na dansilação 40 µL da amostra contendo PAs (livres ou conjugadas) foram misturadas com 100 µL de solução de Cloreto de Dansil (5 mg/mL de acetona – 1,8 mM), 50 µL de solução saturada de NaHCO₃ e 20 µL de Diaminoheptano (DAH) a 0.05 mM, utilizado como padrão interno. Após a mistura, as amostras foram lacradas, homogeneizadas e incubadas no escuro por 50min a 70°C. O excesso de Cloreto de Dansil foi convertido em dansilprolina adicionando-se 25 µL de solução de prolina (100 mg/mL de água Milli-Q) com posterior homogeneização e incubação por 30 min no escuro à temperatura ambiente. Em seguida, as PAs derivatizadas foram particionadas com 200 µL de tolueno e após agitadas. A fase superior apolar (tolueno)

contendo as PAs foi coletada (175 µL) e seca em rotador concentrativo à vácuo (RVC 2-25, analítica) e ressuspensa em 175 µL de acetonitrila.

6.5.3. Identificação e quantificação de poliaminas livres

A identificação e quantificação das PAs foram realizadas utilizando-se HPLC, com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Acetonitrila absoluta e acetonitrila 10% em água (pH 3,5 ajustado com HCl 1N) foram utilizadas como solventes. A mudança na proporção de acetonitrila absoluta em relação à acetonitrila 10% definiu o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65%, durante os primeiros 11 min, de 65 a 100% entre 11 e 25 min, e 100% até 35 min com fluxo de 1 mL.min⁻¹, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 340 nm e emissão de 510 nm. Foram injetados 20 µL da amostra derivatizada com cloreto de dansil. As áreas e tempos de retenção de cada PA livre foram avaliados por comparação com as PAs com concentrações conhecidas: Putrescina (Put), Espermidina (Spd), Espermina (Spm) e DAH (controle interno). Foram selecionados os picos com tempo de retenção médios de 9,8; 22,6; 27,9 e 15,9, respectivamente, sendo que a área dos picos obtidos foi analisada pelo software Analyst 1.5.1 (Applied Biosystems®). Dados obtidos de área do pico corrigida pelo DAH foram transformados em µg/g MF por meio das seguintes curvas padrão:

$$y = 23208x - 12359 \quad R^2 = 0,995 \quad (\text{Putrescina})$$

$$y = 32027x - 21403 \quad R^2 = 0,986 \quad (\text{Espermidina})$$

$$y = 45739x - 64730 \quad R^2 = 0,997 \quad (\text{Espermina})$$

6.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaio contendo quatro bases foliares cada, totalizando 20 bases foliares com aproximadamente 300mg e repetidas seis vezes. Os dados obtidos de porcentagem de metilação global da 5-metildeoxitidina (5mdC) e dos teores de poliaminas livres (µg.g⁻¹ MF) foram analisados por meio da linguagem R, sendo

submetidos à ANOVA e quando necessário ao teste de separação de médias Tukey (1%).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E ANATÔMICAS DAS CN

Em análises morfohistológicas realizadas durante a indução das CNs foi observado que no tempo zero (T0) a região basal dos segmentos foliares é caracterizada pela ausência de protuberâncias (Figura 7A) e não se observa proliferação celular (Figura 7B).

A suplementação ao meio de cultura MSB com ANA (4 μ M) + BAP (2 μ M) promoveu a indução das CN de *Vriesea reitzii* na região basal (Figuras 7 E a J) e sua origem ocorre a partir dos meristemas intercalar e marginal, confirmando o observado por Corredor (2012). Após uma semana de cultivo observou-se o intumescimento da região basal (Figura 7 C) e o alongamento de algumas células (Figura 7 D). Este evento resultou na formação de protuberâncias as quais foram visualizadas em duas semanas de cultivo (Figura 7 E). Também foi identificado um grupo de pequenas células mais adensadas e isodiamétricas denominado de zona meristemática (Figura 7 F).

Neste contexto, em análise por microscopia confocal em bases foliares de *Vriesea reitzii* observou-se maior atividade mitótica no período de duas semanas de cultivo (CORREDOR, 2012). Em trabalho realizado com explantes foliares de *Ananas comosus*, Mercier et al. (2003), também observaram, por meio de análise estrutural, várias protuberâncias na região basal aos nove dias de cultivo em meio de indução.

No presente estudo, após três semanas de cultivo ocorreu aumento das protuberâncias na base do explante (Figura 7 G), resultado da intensa proliferação de células de maior tamanho com espaços intercelulares e de células menores que compõem a zona meristemática (Figura 7 H). Novas protuberâncias apareceram em quatro semanas, as quais se originavam tanto da base do explante quanto a partir de protuberâncias previamente formadas (Figura 7 I), que resultaram na formação de estruturas caracterizadas como pré-nodulares (Fig. 7 J).

Durante o acompanhamento da formação das CN no período de quatro semanas foi observada intensa divisão celular que gerou inicialmente células alongadas e desorganizadas, que correspondem àquelas da primeira camada

de células descrita por Dal Vesco e Guerra (2010), em seguida ocorreu a proliferação de um grupo de pequenas células mais adensadas e isodiamétricas da segunda camada denominada pelos mesmos autores de zona meristemática e que é localizada na região mais externa da base foliar. Por fim foram originadas as estruturas pré-nodulares. Na Figura 8, é indicada uma sequência dos eventos que modulam a indução e o desenvolvimento inicial das CN.

Portanto, as CN de *Vriesea reitzii* originam-se a partir do meristema intercalar onde ocorre intensa proliferação celular e em duas semanas de cultivo, evidenciou-se o início da formação das estruturas nodulares, sendo que estes resultados confirmam os observados por Dal Vesco e Guerra (2010) e Corredor (2012).

O processo de origem dos microbrotos de *V. reitzii* iniciou com a formação de uma zona meristemática na região subepidérmica das CN, que a partir da qual se desenvolve em estruturas nodulares, em três semanas de cultivo, seguida da formação de meristemas caulinares e posteriormente em microbrotos (DAL VESCO E GUERRA, 2010).

Também por meio de microscopia confocal, foram observadas na base do explante e nas bordas das estruturas formadas a formação de novas zonas meristemáticas, em quatro semanas de cultivo (CORREDOR, 2012). Segundo o referido autor, por meio de análise em MEV das bases foliares, foi observada a presença do meristema intercalar, sendo, portanto, uma região com células totipotentes à formação de CNs.

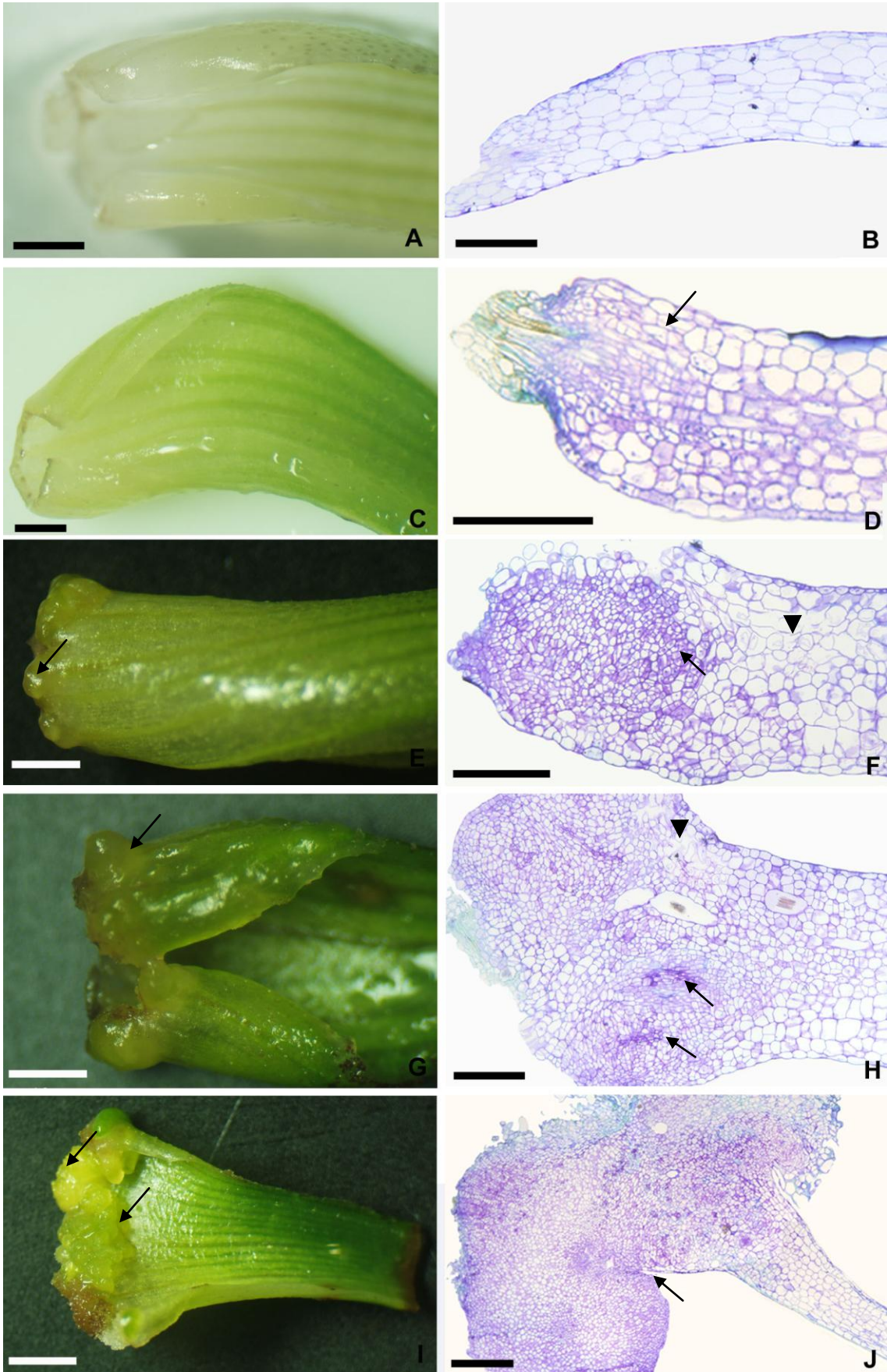


Figura 7. Indução de CN a partir de explantes foliares de *Vriesea reitzii* cultivadas em meio de cultura MSB suplementado com ANA (4 μ M) e BAP (2 μ M), durante o período de quatro semanas A) Base foliar segmentada, mas não inoculada, tempo zero (T0); B) Secção longitudinal submetida ao ATO com ausência de proliferação celular em T0; C) Base foliar com ausência de protuberâncias, após uma semana de cultivo (T1); D) Secção longitudinal de bases foliares com o alongamento de células na base do explante (seta) em T1, E) Formação de protuberâncias na base do explante (seta), após duas semanas; F) Proliferação de células pequenas com características meristemáticas (seta) e outras maiores com espaços intercelulares (cabeça de seta) em T2; G) Aumento das protuberâncias na base do explante (seta) após três semanas de cultivo (T3); H) Acentuada proliferação celular das células pequenas meristemáticas (seta) e outras maiores com espaços intercelulares (cabeça de seta) em T3; I) Formação de novas protuberâncias que se originavam tanto da base do explante como a partir de protuberâncias já formadas (seta) em 4 semanas de cultivo; J) Observação de estruturas pré-nodulares (seta) em T4.

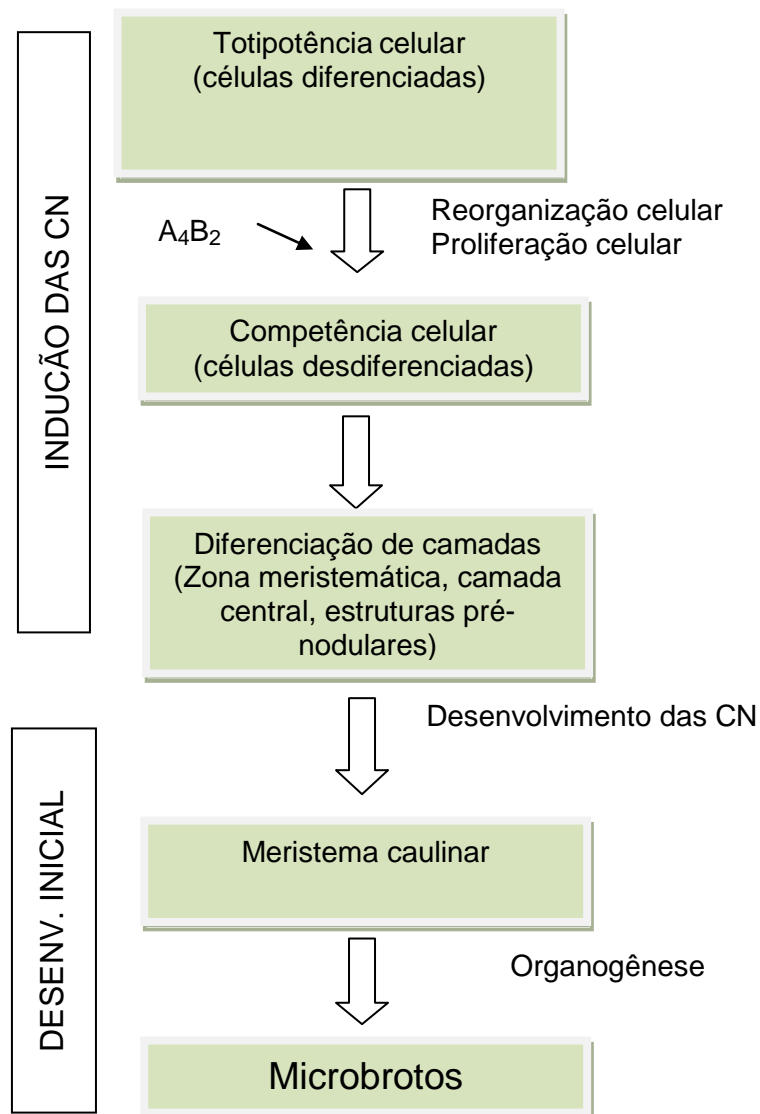


Figura 8. Representação esquemática dos eventos que modulam a indução e o desenvolvimento inicial das CN a partir de bases foliares em *Vriesea reitzii*.

7.2 METILAÇÃO GLOBAL DO DNA DURANTE A INDUÇÃO DAS CN

A quantificação da metilação global do DNA foi utilizada para investigar se a capacidade de indução das CN é dependente do status de metilação do tecido. Cada tempo de cultivo (semana) foi associado a um nível de metilação da citosina: T0 - 24,8%; T1 - 21,3%; T2 - 17,7%; T3 - 15,7% e T4 - 12,5% (Figura 9). Os níveis encontrados estão dentro daqueles esperados para plantas, que vão de 6% a 30% (CHEN E LI, 2004).

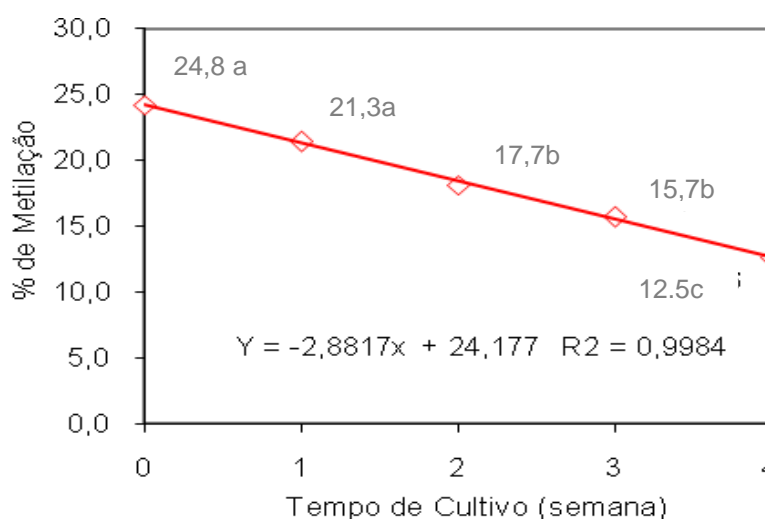


Figura 9. Porcentagem de metilação (5mdC) em relação ao tempo de cultivo (semana) das bases foliares de *V. reitzii* em meio de cultura MSB suplementado com ANA (4 μ M) e BAP (2 μ M) para a indução de CN. Média de 6 repetições. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, segundo Tukey ($p < 0,01$).

Um aumento significativo na proliferação celular durante a indução das CN (Figura 7) foi acompanhado por um decréscimo da porcentagem de metilação (5mdC) durante o período de cultivo. No 14º dia de cultivo considerou-se o início da morfogênese *in vitro* (Figuras 7 E-F), e foi observada uma acentuada, e significativa ($p < 0,01$), queda nos percentuais de 5mdC. Em quatro semanas, quando as CN já estavam formadas, foi observado o menor percentual, 12,5% de 5mdC (Figura 9).

Até a primeira semana de cultivo no meio de indução foram observadas poucas alterações morfo-anatômicas (Figuras 7 A a D). Este mesmo evento foi encontrado em relação à metilação, quando comparadas as porcentagens de 5mdC destes dois estádios, que também não revelaram diferença estatística

entre si (Figura 9). Da segunda a terceira semana, observou-se um aumento no volume das protuberâncias através da proliferação e padrões de divisão celular (Figuras 8 E a H), bem como os percentuais de metilação não diferiram entre si. Na quarta semana a metilação observada diferiu estatisticamente dos demais estádios de desenvolvimento (Figura 9). Portanto, sugere-se uma correlação entre 5mdC (%) e competência para indução das CN. A equação de regressão linear foi ajustada para determinação da relação entre o tempo de cultivo e a metilação.

A regeneração de uma planta inteira a partir da diferenciação de células cultivadas *in vitro* mostra a plasticidade das suas células (ZHANG et al. 2010). Segundo Causevic et al. (2006), as plantas requerem uma interação específica entre o programa de desenvolvimento e a rota de sinalização que é desencadeada por um estímulo externo e esta interação é coordenada epigeneticamente. A partir de estímulos específicos do ambiente as células adquirem competência para mudar seu destino e se tornarem diferenciadas quando entram na rota de desenvolvimento.

De acordo com Miguel e Marum (2011), a sequência de eventos que envolvem a proliferação e a diferenciação celular é acompanhada por mudanças em nível de cromatina e pela reprogramação do gene, o que evidencia o papel central da regulação epigenética nesses processos. Esses autores afirmam também que, durante a transição de mitose para G1, os níveis de metilação participam do processo de reativação dos genes envolvidos na decisão do destino celular. Enquanto que, Costa e Shaw (2006) mostram evidências de que o estado da cromatina pode se restabelecer e se remodelar em cada ciclo celular durante o desenvolvimento.

A metilação do DNA pode desempenhar um papel no desenvolvimento de *Arabidopsis* como um mecanismo de controle epigenético envolvido nas decisões de desenvolvimento nas células em proliferação (Ruiz-García et al, 2005). Durante a diferenciação da célula, a metilação do genoma pode mudar especificamente para ativar ou inativar genes que afetam a determinação do destino da célula, e a expressão gênica de tipos específicos de células é também controlada pela metilação nas células diferenciadas (ATTWOOD et al., 2002). Portanto, o decréscimo na metilação observado durante a indução e o desenvolvimento inicial das CN, observado neste trabalho, pode estar

associado à mudança de padrões que ocorre no processo de competência e de determinação e estão intrinsecamente relacionados ao tipo de evento que ocorre, como é o caso da indução de CNs a partir de bases foliares em *V. reitzii*.

Uma precisa regulação da expressão gênica no espaço e no tempo é fundamental para o normal desenvolvimento de todos os organismos (ZHANG et al., 2010) visto que os processos de competência e determinação são determinados pelo seu controle. Destaca-se que a metilação da citosina implica na regulação da expressão gênica no decorrer do desenvolvimento da planta *Arabidopsis* e em momentos de estresse (ZHANG et al., 2006). Vanyushin (2006) destaca que a metilação específica da citosina em plantas controla praticamente todos os processos genéticos como a transcrição, a replicação e os mecanismos de diferenciação celular e reparo do DNA, além de estar envolvida no silenciamento de genes específicos e elementos de transposição.

No presente trabalho, os resultados obtidos indicam que a expressão gênica foi controlada em parte pelos mecanismos epigenéticos relacionados à metilação/demetilação do DNA. Durante a diferenciação das células para indução e desenvolvimento inicial das CNs, os eventos de demetilação superaram os de metilação, visto que um expressivo decréscimo foi observado. Esta demetilação pode ter envolvido a ativação de genes anteriormente silenciados, possivelmente aqueles envolvidos no desenvolvimento dos meristemas (SU et al., 2011), visto que se supõe que as etapas de indução das CNs são dependentes da regulação gênica.

Processos do desenvolvimento são regulados por um controle dinâmico de ambos metilação e demetilação (ZHANG et al. 2010). Esta natureza dinâmica da metilação da citosina pode ser importante para manutenção da plasticidade epigenômica como um todo para permitir uma resposta eficaz aos sinais do desenvolvimento e aos estresses ambientais em tempo hábil em *Arabidopsis* (ZHU et al.,2007).

O processo de indução e desenvolvimento inicial das CNs, observado neste trabalho, pode ter sido responsável pela alteração no padrão de metilação do DNA, evidenciado pelos picos de 5-metilcitosina (5mC) e de 5-metildeoxicitosina (5mdC). Chakrabarty et al. (2003) afirmaram que as diferenças na metilação podem ser um reflexo dos diferentes processos do

desenvolvimento envolvidos, visto que em seus estudos calos embriogênicos e não-embriogênicos oriundos do mesmo genótipo de *Eleuterococcus senticosus* e cultivados nas mesmas condições apresentaram distintos padrões de metilação do DNA.

Segundo Yamauchi et al. (2008), a expressão de genes que codificam as MTase é dinâmica durante o desenvolvimento, o que está de acordo com a natureza dinâmica da metilação da citosina em diferentes tecidos e órgãos de plantas e nos estágios do desenvolvimento. Níveis de metilação são consequência do balanço entre replicação do DNA, metilação/demetilação *de novo*/manutenção do DNA (HSIEH, 2000).

Elhiti et al. (2010) observaram que a embriogênese somática de *Arabidopsis* coincide com a hipometilação global do DNA durante a fase de indução. Noceda et al. (2009) quantificaram a metilação global do DNA e revelaram uma relação inversa entre metilação do DNA e potencial embriogênico em *Pinus nigra*.

A demetilação tem um efeito pleiotrópico na morfologia de plantas, particularmente para a regulação do processo de desenvolvimento que ocorre em tecidos específicos ou em estágios do desenvolvimento (FINNEGAN et al. 2000). Segundo Meng et al. (2012), os eventos de demetilação foram três vezes maiores do que a metilação *de novo* durante a germinação de sementes de *Triticum aestivum* L., o que indica que a demetilação foi essencial na ocorrência desse processo.

Há muitos trabalhos que envolvem o padrão de metilação do DNA à embriogênese somática. Apesar de o padrão de desenvolvimento das CNs não envolver a formação de uma estrutura bipolar, já que somente parte aérea é formada, supõe-se que os mesmos mecanismos epigenéticos que regulam a expressão gênica estão envolvidos. Avivi et al. (2004) mostraram que a embriogênese somática de *Arabidopsis* coincide com a global hipometilação do DNA durante a fase de indução. Em análise por HPLC, Chakrabarty et al. (2003) mostraram que a taxa de metilação global do DNA de calo embriogênico de *Eleuterococcus senticosus* foi significativamente menor quando comparada com a de calos não-embriogênicos.

Ruiz-García et al. (2005) observaram por meio da análise molecular por AFLP, um aumento na metilação do DNA durante o desenvolvimento de

coltilédones a órgãos vegetativos e dos mesmos aos órgãos reprodutivos em *Arabidopsis*. Estes autores também discutem que as mudanças na metilação têm um papel na manutenção dos estágios do desenvolvimento no meristema das plantas ou refletem a saída de um mecanismo genético de silenciamento dos elementos transponíveis e outras sequências repetitivas.

Fraga et al. (2012) observaram um aumento nos níveis de metilação nos tratamentos em que houve formação de embriões somáticos de *Acca selowiana* submetidos a pulso com 2,4-D e a meio de cultura com ou sem o agente hipometilante AzaC. As culturas mantidas na ausência de 2,4-D e em meio de cultura suplementado com o AzaC não formaram embriões somáticos e apresentaram padrões decrescentes de metilação global.

O papel da metilação do DNA na regulação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento de plantas e que podem auxiliar na compreensão de como a morfogênese *in vitro* das CNs está relacionada com a metilação do DNA, já foram praticamente elucidados. Segundo Abarca e Díaz-Sala (2009), a família de fatores de transcrição envolvida na pluripotência das células, incluindo WUSCHEL (WUS), SHOOT MERISTEMLESS (STM), KNOX E GRAS, tem um papel na manutenção da população das células-tronco nos meristemas apical de raiz e de caule e, portanto, desempenham um papel chave durante a mudança de destino das células em condições *in vitro*. Eles são regulados e atuam junto com os reguladores da cromatina, incluindo as DNA metiltransferases (SANG et al. 2009; SHEN e XU, 2009).

A metilação do DNA e os modificadores de histonas são reguladores da expressão do gene *WUS* e dos componentes de sinalização de auxinas (NEELAKANDAN e WANG, 2011), os quais desempenham um papel fundamental durante a formação de novos brotos e nos processos regenerativos (SU et al, 2011). Em estudos envolvendo mutantes de *Arabidopsis thaliana* para uma DNA metiltransferase (*MET1*), os quais apresentaram redução nos níveis de metilação e maior expressão de *WUS*, resultaram na precocidade da formação de novos brotos em relação ao tipo selvagem (LI et al., 2011).

Avivi et al. (2004) sugerem que os produtos dos genes *NAM*, *ATAF1* e *CUC2*, descritos por Duval et al. (2002) como reguladores da funcionalidade do meristema, tem mostrado uma regulação dependente da hipometilação em

protoplastos pluripotentes. Esses fatores, segundo eles, determinam o estado pluripotente das células. A expressão de genes envolvendo a sinalização e percepção dos hormônios bem como a codificação de DNA metiltransferases e enzimas do metabolismo da glutathione são afetados em *Brassica oleracea* pela superexpressão de STM em linhas que mostram uma melhora acentuada no rendimento de embriões somáticos (ELHITI et al. 2010).

Desde o trabalho de Lo Schiavo et al. (1989), tem sido sugerido que os reguladores de crescimento de plantas afetam o padrão de metilação do DNA. Esses autores encontraram uma correlação positiva entre AIA exógena suplementada ao meio de cultura e a metilação da citosina de *Daucus carota*. Altos níveis de metilação da citosina durante a indução da embriogênese somática foram associados com a presença de 2,4-D. Os mesmos autores também observaram que depois da fase de indução, subcultivos sem adição de 2,4-D apresentaram decréscimo dos níveis de metilação.

Xu, Li e Korban (2004) atribuíram as diferenças observadas na metilação do DNA de diferentes tecidos embriogênicos de *Rosa hybrida* L. à presença de reguladores de crescimento no meio de cultura, como o 2,4-D. Porém, Miguel e Marum (2011) afirmam que ainda não está claro como a atividade desses compostos interfere na metilação do DNA. Smulders e Klerk (2011) destacam que as condições de cultivo *in vitro*, que incluem a presença de reguladores de crescimento, causam estresse aos cultivos e discutem que parte da variação epigenética pode ser atribuída a essas condições.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o mecanismo epigenético que ocorreu foi a demetilação do DNA, visto que padrões decrescentes de metilação global foram associados à morfogênese *in vitro*. Esta variação nos percentuais de 5mdC era esperada com base no conhecimento atual do papel da metilação como um dos mecanismos regulatórios da expressão gênica durante o desenvolvimento e a diferenciação das células.

Na Figura 10, é mostrado um esquema que envolve resultados obtidos neste trabalho e os possíveis eventos e mecanismos que podem estar regulando a indução e o desenvolvimento inicial das CN, com base na literatura consultada, os quais precisam ser elucidados em pesquisas futuras.

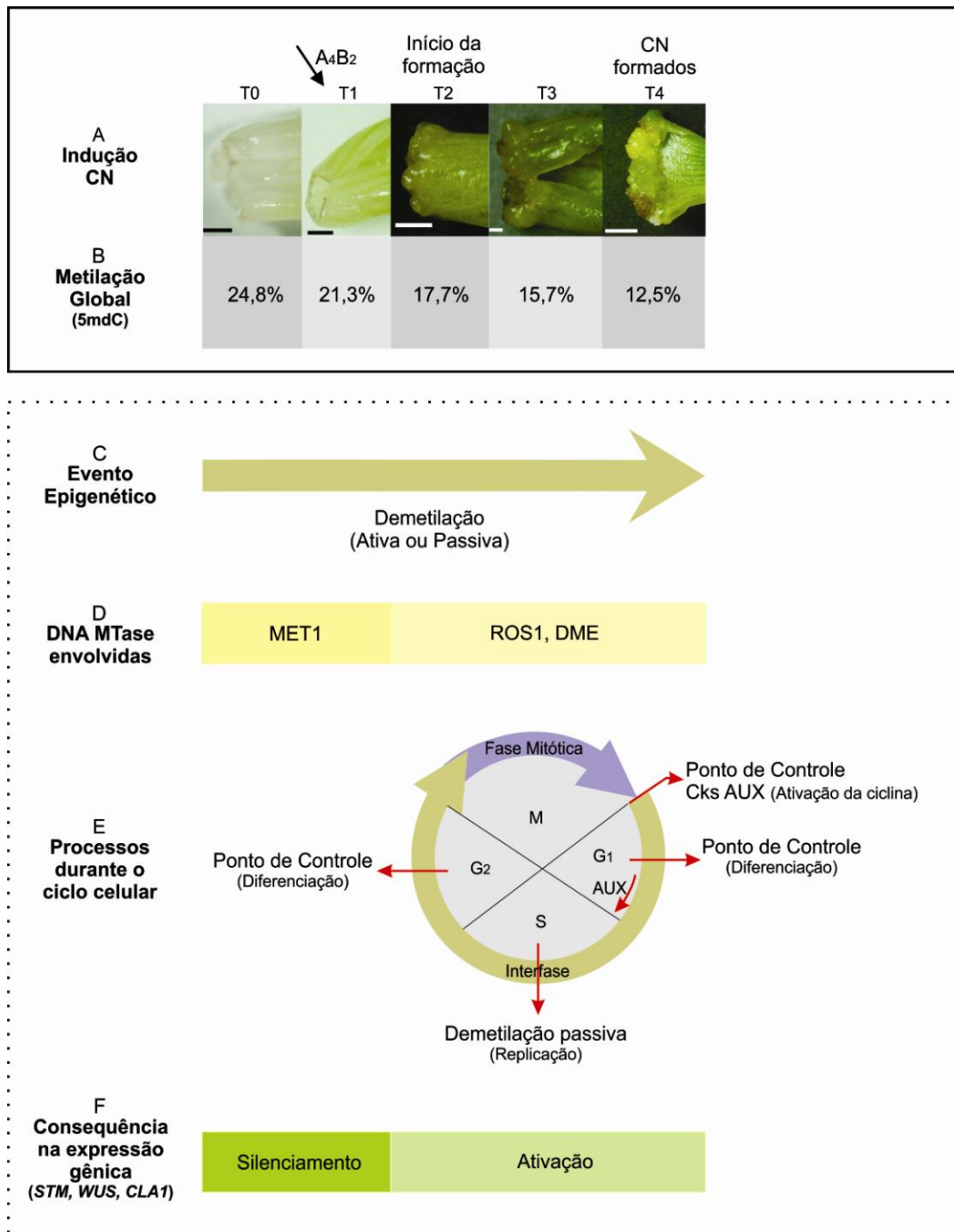


Figura 10. Esquema ilustrativo dos possíveis mecanismos envolvidos na regulação da morfogênese in vitro das CN de *Vriesea reitzii* durante o decréscimo da metilação do DNA. A) Indução das CN. A partir da primeira semana as bases foram submetidas ao A4B2. Em duas semanas houve o início da morfogênese e na quarta semana as CN foram consideradas formadas; B) Porcentagens de metilação global da 5mdC; C) Evento epigenético envolvido com a formação das CN; D) DNA metiltransferases (DNA MTase) possivelmente expressas; E) Processos ocorridos durante o ciclo celular, envolvendo auxina e citocinina e a demetilação passiva durante a replicação

do DNA; F) Consequência da demetilação na expressão gênica. Possivelmente estão envolvidos os genes homeóticos (*STM*, *WUS*, *CLA1*) e seus fatores de transcrição. Linhas contínuas indicam eventos observados e linhas pontilhadas indicam eventos que provavelmente estão ocorrendo de acordo com a literatura consultada.

7.3 CONTEÚDO E CARACTERIZAÇÃO DAS POLIAMINAS LIVRES ENDÓGENAS

Os teores endógenos médios de espermidina (Spd) foram os mais elevados ($0,68 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF) quando comparados com as demais poliaminas livres, putrescina (Put) e espermina (Spm), durante os diferentes períodos de cultivo em meio de cultura MSB suplementado com ANA ($4\mu\text{M}$) e BAP ($2\mu\text{M}$) na indução de CNs a partir de bases foliares (Figura 11). Estes resultados sugerem que, para o período de indução das CNs, entre o tempo zero (T0) e quatro semanas (T4) de cultivo a principal amina sintetizada nos tecidos foi a Spd, seguida pela Put, com teores médios de $0,55 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF em T0 e de $0,58 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF em T4 e após pela Spm, com nível médio de $0,15 \mu\text{g.g}^{-1}$ MF (Figura 11).

Foi observado por Noceda et al. (2009) que durante a indução da embriogênese somática a partir de linhagens celulares em *Pinus nigra*, um maior potencial de formação de embriões somáticos quando os níveis de Spd eram maiores em relação a Put, enquanto que em linhagem não-embriogênica ocorreu o inverso.

As poliaminas (PAs) regulam funções da célula pela promoção da divisão celular, crescimento ou diferenciação, dependendo do tipo de célula e dos sinais ambientais (Wallace et al. 2003). Propõe-se que elas são indicadoras do processo de embriogênese somática, como descrito em trabalho realizado por Steiner e colaboradores (2007) no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e de Genética Vegetal da UFSC. Porém estes fatores não foram observados durante a indução e o desenvolvimento inicial das CN, quando avaliados pelas alterações nos teores endógenos de Epermidina (Spd) e Epermina (Spm), resultados estes que se mantiveram constantes nos tempos de cultivo avaliados. No entanto, os teores de Putrescina (Put) revelaram um aumento mais significativo a partir da segunda semana de cultivo (T2) (Figura 11).

Astarita et al. (2003) analisaram as mudanças no conteúdo de PAs em *Araucaria angustifolia* em diferentes estágios do desenvolvimento do embrião e nos tecidos durante o desenvolvimento das sementes. Segundo estes autores, os maiores conteúdos de PAs ocorreram no eixo embrionário durante os estágios iniciais e que, os teores de Put e a Spm revelaram ser mais abundantes. Enquanto que os níveis de Spd foram maiores a partir do estágio em que surgiu o cotilédone, quando os teores de Put decresceram. A fase de proliferação de culturas embriogênicas de espécies de *Pinus* foi combinada com alto conteúdo de Put livre comparado com Spd e Spm. Já durante a fase de maturação, a razão Spd/Put aumentou para a linhagem celular, para a qual resultou na formação de embriões somáticos (MINOCHA et al. 1999).

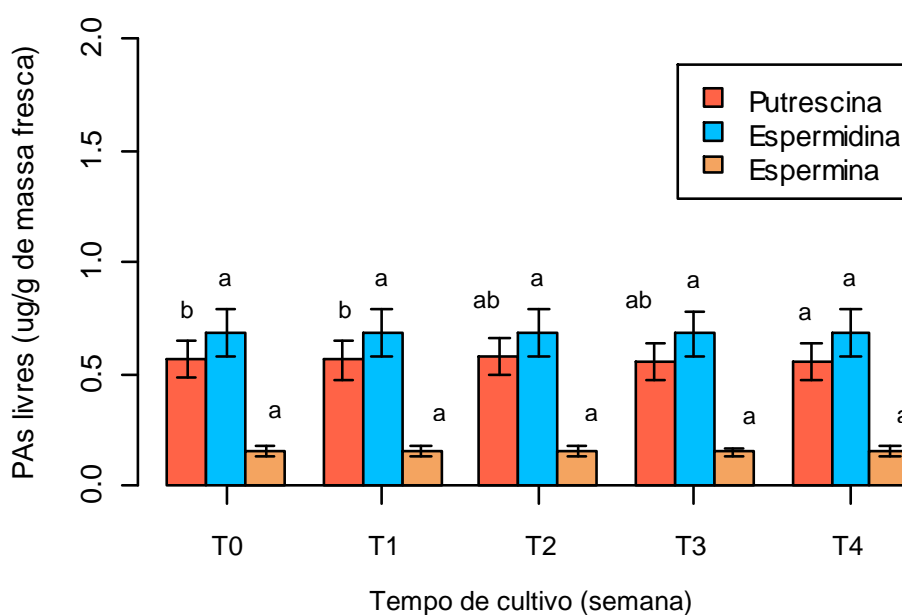


Figura 11. Teores endógenos médios ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca) das poliaminas livres Putrescina, Espermidina e Espermina, em relação ao tempo (semana) de indução das CNs a partir de bases foliares cultivadas em meio de cultura MSB suplementado com ANA ($4\mu\text{M}$) e BAP ($2\mu\text{M}$) Médias de 6 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias nas colunas do mesmo parâmetro ($P < 0,01$, teste Tukey).

Durante estágios de desenvolvimento do embrião somático de *Picea abies*, a transição da aparente massa embriogênica do suspensor até o estágio cotiledonar inicial foi caracterizada pela maior concentração de Spd em relação à Put e pelo aumento na atividade de enzimas biossintéticas de PA (GEMPERLOVÁ et al. 2009). Vários trabalhos mostram que o aumento dos

teores endógenos é um indicador da competência para embriogênese somática em algumas espécies como *Solanum melongena*, *Oriza sativa*, *Medicago sativa* e *P. ginseng* (YADAV e RAJAM 1997; SHOEB et al. 2001; HUANG et al. 2001; MONTEIRO et al. 2002). De acordo com Galston e Kaur-Sawhney (1990), Put sozinha poderia manter a proliferação da célula, mas Spd e Spm são essenciais para induzir a diferenciação em cultivo de células de *Daucus carota*.

O pequeno aumento do teor endógeno de Put que foi observado a partir de T2, coincide com o início da indução das CN. Isto sugere que a Put pode estar envolvida durante a fase de divisão celular, e eventos posteriores relacionados ao desenvolvimento das CNs. A elevação nos teores de Put está geralmente associada à idade e alongamento celular, enquanto que o aumento na síntese de Spd é característico de tecidos meristemáticos (CVIKROVÁ et al. 1998). Essa poliamina estimulou a divisão celular em culturas embriogênicas de *Pinus oocarpa* e *Pinus patula* (FEIRER, 1995), mas em culturas em suspensão de *Pinus taeda*, altos níveis de Put endógena foram associados com a redução no crescimento celular (SILVEIRA et al. 2004).

A Spm foi a PA encontrada em menores teores nas bases foliares de *Vriesea reitzii*, da mesma forma foi observado em trabalho realizado por Silveira et al. (2004) em cultivos de suspensão embriogênica de *Pinus taeda*. A Spm é biologicamente mais dinâmica do que outras poliaminas e atua na estabilização da membrana celular e mostra efeitos antioxidantes em plantas (BOUCHEREAU et al., 1999).

É importante destacar que, em sistemas de cultivo *in vitro*, os teores de poliaminas variam conforme a composição do meio de cultivo, principalmente no que diz respeito ao regulador de crescimento utilizado ou à adição de PAs exógenas (SILVEIRA et al. 2004; STEINER et al. 2007), ao pH do meio (VUOSKU et al. 2012), em resposta aos estresses oxidativos ocasionados pela adição de metais pesados (GIAMPAOLI, 2010) ou por condições de cultivo que promovam estresse osmótico, alteração da salinidade do meio, dentre outros (GROPPIA E BENAVIDES, 2008).

Em estudo realizado para verificar o efeito de cobre e zinco no desenvolvimento *in vitro* da bromélia *Aechmea blanchetiana*, os teores foliares médios de PAs livres obtidos foram de 800 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS para Spm; 500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS para Put e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS para Spd. Comparando-se esses teores com os

encontrados na matéria fresca das bases foliares da bromélia *Vriesea reitzii* percebe-se que a regulação da síntese dessas amins pode estar relacionada com as condições de cultivo *in vitro*.

A biossíntese de poliaminas em plantas ocorre em resposta aos estresses bióticos ou abióticos (ACÁZAR et al. 2010), e como consequência ocorre seu acúmulo, diminuição ou mesmo uma leve alteração de seus teores endógenos, o que demonstra que o metabolismo delas é alterado de diferentes maneiras pelo estresse (LIU et al. 2007).

Tang e Newton (2004) mostraram o papel das poliaminas na proteção das células e tecidos contra a oxidação por meio do cultivo de calos não oxidados de *Pinus virginiana*, no qual observaram a manutenção de conteúdos constantes das PAs ao longo de 35 dias, o que não ocorreu em calos oxidados. A predominância de Spm em relação à Put e à Spd em massas celulares oriundas de calos cultivados *in vitro* em meio MS suplementado com Spd, Spm e Put de *Hemerocallis* sugere que ela pode ter agido como protetora contra o estresse oxidativo já que reduziu o escurecimento dos tecidos (DEBIASI et al., 2007). Quando Spm foi associada com Put, não foi observada oxidação nos tratamentos contendo essa combinação de PAs exógenas. Tang et al. (2004) demonstraram que Put e Spd exógenas foram mais efetivas contra danos oxidativos, promovendo baixa atividade da peroxidase.

Atribui-se à Spd e à Spm a contribuição para o aumento da tolerância das plantas a diferentes estresses (LEFREVE et al. 2001), as quais estão relacionadas com a regulação, estabilidade e permeabilidade das membranas celulares e modulação das cargas superficiais da membrana (ROY et al. 2005). Nessas condições de estresse, os teores de Put podem ser catabolizados e o produto desse processo é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é requerido para a sinalização e ativação do sistema antioxidante (GROPPA & BENAVIDES 2008). Neste contexto, destaca-se também que as PAs não respondem em tempo hábil às condições de estresse. A exemplo disto, em *Populus alba* o uso de concentrações tóxicas de cobre não foram capazes de induzir a síntese de poliaminas rapidamente, acumulando poliaminas livres e conjugadas apenas com a exposição prolongada ao estresse e indicando que a toxicidade do cobre pode retardar a ativação da biossíntese de poliaminas (FRANCHIN et al., 2007).

A regulação dos teores de poliaminas livres em plantas ocorre por meio do catabolismo oxidativo e também pela formação de poliamina conjugada (BAIS E RAVISHANKAR, 2002). As poliaminas conjugadas, que são covalentemente ligadas ao ácido hidroxicinâmico, ocorrem em altos níveis em plantas e podem ser correlacionadas com o desenvolvimento de plantas de forma geral (MARTIN-TANGUY, 1997).

Baixos teores das poliaminas obtidos neste trabalho pressupõem que elas podem estar sendo metabolizadas em formas conjugadas ou mesmo podem estar sendo degradadas por enzimas oxidativas, tais como poliaminas oxidases. A degradação é um circuito regulatório complexo, capaz de ajustar os níveis de Put, Spd e Spm nas células, o que é necessário para a ocorrência de diferentes transformações metabólicas dos tecidos (BOUCHEREAU et al. 1999). Portanto, a partir dos dados obtidos no presente trabalho, pode-se inferir que os níveis de PAs endógenos não estão correlacionados com a indução e o desenvolvimento inicial das CN de *V. reitzii*. No entanto, eles podem ser um indicativo de que não houve estresse oxidativo nos tecidos das bases foliares, e caso este fator ocorra, não foram observados significativos aumentos nos teores das PAs livres durante este estágio da morfogênese *in vitro*.

8. CONCLUSÕES

As culturas nodulares de *Vriesea reitzii* originam-se a partir da proliferação de células meristemáticas da base foliar e em duas semanas de cultivo observou-se a formação de protuberâncias. Os eventos que modulam a indução e o desenvolvimento inicial das CNs envolveram a competência das células do meristema intercalar, as quais se desdiferenciaram após exposição das bases foliares ao meio de cultura MSB suplementado com ANA e BAP.

Em seguida, a intensa divisão celular gerou células alongadas e desorganizadas, após formou-se uma camada de células denominada zona meristemática e por fim foram originadas as estruturas pré-nodulares que dão origem às CNs. Esses eventos foram acompanhados por um decréscimo na porcentagem de metilação evidenciado a partir da segunda semana de cultivo.

A queda na metilação pode ser relacionada com o novo programa de rediferenciação e serviu como base da plasticidade das células nos tempos de cultivo estudados. O aumento no conteúdo de Put pode ser um indicativo do seu envolvimento no processo de divisão celular e seguido da formação de protuberância e desenvolvimento das CNs.

Na Figura 12, apresenta-se uma síntese dos eventos ocorridos durante a indução e o desenvolvimento inicial das CN de *Vriesea reitzii*.

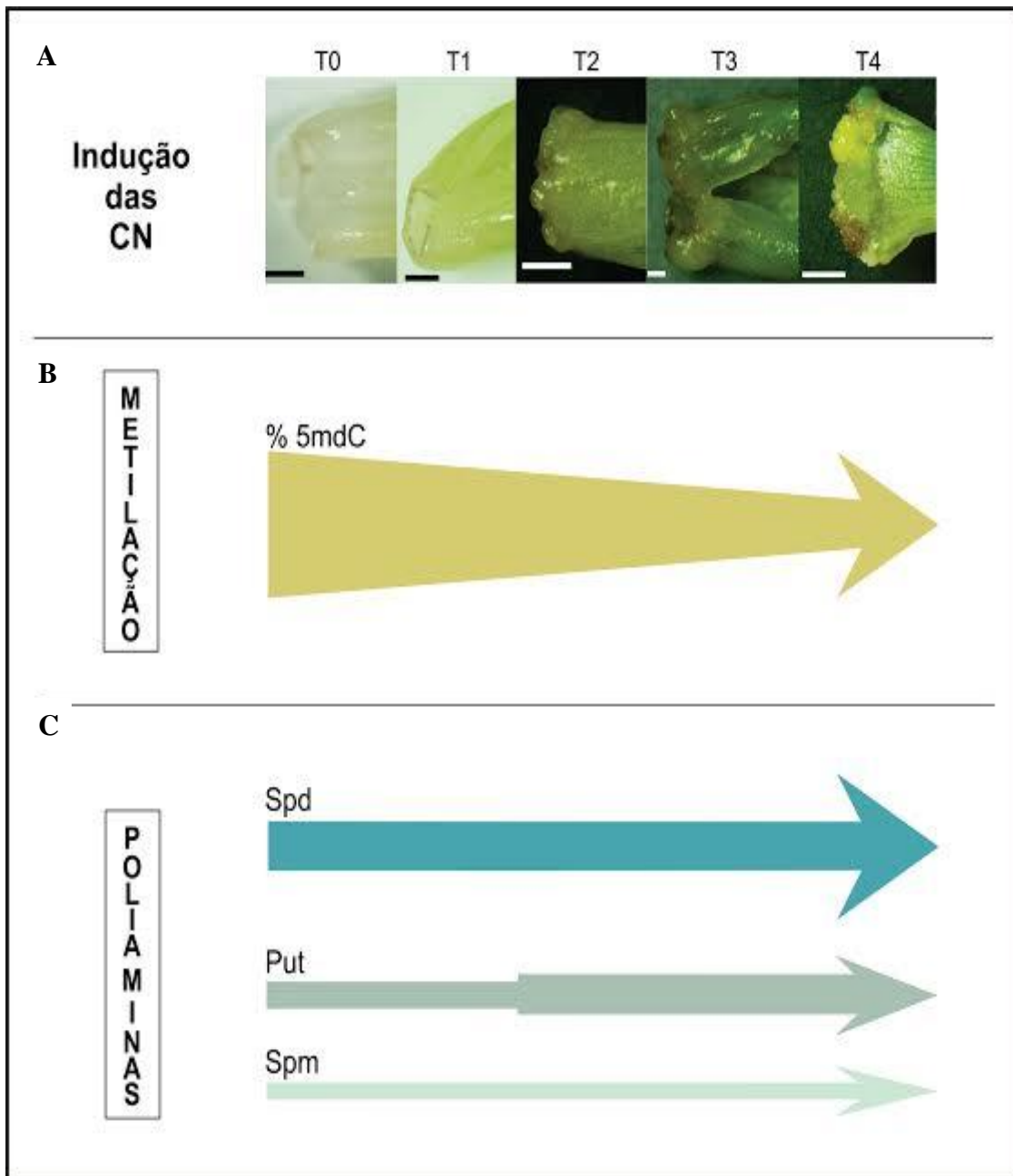


Figura 12. Resumo esquemático dos eventos ocorridos durante a indução e o desenvolvimento inicial de CN de *Vriesea reitzii*. A) Bases foliares durante as quatro semanas de indução: T0, T1, T2, T3 e T4; B) Decréscimo da metilação da 5mdC a partir de T2 e C) Níveis de poliaminas livres endógenas: Spd e Spm mantiveram-se constantes, e Put aumentou a partir de T2. As setas e suas espessuras indicam as flutuações nos percentuais de metilação global e no conteúdo endógeno das PAs.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Experimentos futuros devem priorizar análises de transcriptômica e de proteômica para identificação dos genes e fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação deste processo morfogênético. Desta forma, será possível relacionar as contribuições das modificações epigenéticas com a expressão gênica.

Apesar de o HPLC/UV consistir em uma técnica robusta, ela é indicada para quantificação da metilação global do DNA. Sugere-se o uso de marcadores moleculares como o AFLP, o uso de enzimas de restrição sensíveis a sítios ricos em citosina metilada e análises por MSAP (*"methylation sensitive amplified polymorphism"*), para detecção da metilação de sítios específicos.

Fazem-se necessários estudos os quais objetivem o estabelecimento de padrões oxidativos de células e tecidos, seja por meio de análises visuais e/ou por avaliação da atividade de enzimas como a ascorbato peroxidase ou pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que têm sido relacionados ao sistema de defesa das plantas. Desta forma, será possível associar os teores de PAs endógenos com a oxidação dos tecidos, e a aplicação de PAs exógenas no meio de cultivo poderá gerar conhecimento acerca do potencial antioxidante dessas aminas em *Vriesea reitzii*.

Destaca-se que a adição de PAs exógenas ao meio de cultivo tem sido amplamente usada para estudar a função das PAs durante o crescimento e diferenciação de plantas cultivadas *in vitro* e pode ser uma estratégia interessante para regulação dos pools de PAs endógenas. Francisco et al. (2008) sugerem a partir de seus resultados que a aplicação exógena de poliaminas supriria as necessidades endógenas, promovendo melhor desenvolvimento e tuberização *in vitro* de taro, sendo que putrescina teria maior efeito, sendo possivelmente um fator limitante nos eventos morfogênicos estudados por eles.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, D.; DÍAZ-SALA, C. Reprogramming adult cells during organ regeneration in forest species. *Plant Signaling and Behavior*. 4: 793–795, 2009.

ALTAMURA, M.M.; TORRIGIANI, P.; FALASCA, G.; ROSSINI, P. & BAGNI, N.. Morphofunctional gradients in superficial and deep tissues along tobacco stem: polyamine levels, biosynthesis and oxidation, and organogenesis in vitro. *Journal of Plant Physiology*. 142:543-551, ISSN 0176-1617, 1993.

ALVES, G. M.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Hort*. 110: 204–207, 2006.

ALVES, G.M. & GUERRA, M.P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. *Journal of the Bromeliad Society*. 51(5): 202-212, 2001.

ANACLETO, A.; NEGRELLE, R. R. B. Extrativismo de rametes e propagação vegetativa de *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae). *Scientia Agrária*, Curitiba, 10 (1): 85-88, 2009.

ARANDA-PERES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. Bromeliads. In.: Silva, J.A.T. da. (org.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. 1ª Ed. London, UK: Global Science Books. (4): 644-655, 2006.

ASTARITA, L.V.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Revista Brasileira de Botânica*. (26): 163-168, 2003.

ATTWOOD, J.T., YUNG, R.L., RICHARDSON, B.C. DNA methylation and regulation of gene transcription. *Cell Mol. Life Sci*. 59: 241-257, 2002.

AVIVI, Y.; MORAD, V.; BEN-MEIR, H.; ZHAO, J.; KASHKUSH, K.; TZFIRA, T.; CITOVSKY, V.; GRAFI, G. Reorganization of specific chromosomal domains and of silent genes in plant cells acquiring pluripotentiality. *DevDyn* 230: 12–22, 2004.

BAENSCH, U. e BAENSCH, U. *Blooming Bromeliads*. Rasch Druck Verlag, Bramsche, GE. 1994.

BAIS, HP e RAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 69:1–34, 2002.

BENZING, D.H. *Vascular epiphytes: General biology and related biota*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 370p., 1990.

BESSION-BARD, A.; COURTOIS C.; GAUTHIER, A.; DAHAN, J.; DOBROWOLSKA, G.; JEANDROZ, S.; PUGIN, A. & WENDEHENNE D. Nitric

oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ + signaling. *Molecular Plant*. 1(2): 218-228, ISSN 1674-2052, 2008.

BOLLATI, V. & BACCARELLI, A. Review: Environmental epigenetics. *Heredity*, 105: 105-112, 2010.

BOUCHEREAU, A., AZIZ, A., LARHER, F. AND MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent developments. *Plant Sci*. 140: 103–125, 1999.

BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARCHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci*. 140:103–125, 1999.

CAUSEVIC, A.; GENTIL, M.V.; DELAUNAY, A.; ABU EI-SAUD, W.; GARCÍA, Z.; PANNETIER, C.; BRIGNOLAS, F.; HAGEGE, D.; MAURY, S. Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines. *Planta*. 224:812–827, 2006.

CHAKRABARTY, D.; YU, K.W.; PAEK, K.Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Science*, v. 165, p. 61 – 68, 2003.

CHEN, T. e Li, E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr. Top. Dev. Biol*. 60: 55–89, 2004.

CHOI, Y., GEHRING, M., JOHNSON, L., HANNON, M., HARADA, J.J., GOLDBERG, R.B., JACOBSEN, S.E., e FISCHER, R.L. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell*. 110: 33–42, 2002.

COSTA, S. e SHAW, P. Chromatin organization and cell fate switch respond to positional information in *Arabidopsis*. *Nature*. 43: 9493–496, 2006.

CVIKROVA, M.; MALA, J.; EDER, J.; HRUBCOVA, M.; VAGNER, M. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion potential. *PlantPhysiolBiochem*. (36):247–55. 1998

DAL VESCO, L. L. Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da mata atlântica (*Bilbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): bases para a conservação e propagação massal. Tese Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. *Scientia Hort*. 125: 748-755, 2010.

DAL VESCO, L. L.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Bilbergia zebrina* nodule cluster

cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. *Scientia Horticulturae*. (128): 515–522, 2011.

DEBIASI, C.; FRÁGUAS, C.B.; LIMA, G.P.P. Estudo das poliaminas na morfogênese in vitro de *Hemerocallis* sp. *Ciência Rural*. 37(4): 1014-1020, 2007.

DOYLE, J. J. e J. L. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15, 1987.

DUVAL, M.; HSIEH, T-F.; KIM, S.Y.; THOMAS, T.L. Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant Molecular Biology*. 50: 237–248, 2002.

ELHITI, M; TAHIR, M; GULDEN, R.H.; KHAMISS, K.; STASSOLA, C. Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of Brassica genes involved in the regulation of the shoot apical meristem. *Journal of Experimental Botany*. 61:4069–4085, 2010.

FEIRER, R.P. The biochemistry of conifer embryo development: amino acids, polyamines, and storage proteins. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 1 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 317–336, 1995.

FINNEGAN, E.J. DNA methylation: a dynamic regulator of genome organization and gene expression in plants. In: Pua EC, Davey MR (eds.) *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives: Volume 2*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 295-323, 2010.

FINNEGAN, E.J.; GENGER, R.K.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. DNA methylation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:223–247, 1998.

FINNEGAN, E.J.; KOVAK, K.A. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol*. 43:189–201, 2000.

FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese in vitro. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. (13): 1992-2001, 2007.

FRAGA M.F., RODRÍGUEZ R., CAÑAL, M.J. Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiol*. 22:813–816, 2002.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; MICKE, G. A.; SPUDEIT, D. A.; PESCADOR, R.; GUERRA, M. P. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Accasellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Rep* 31: 2165–2176, 2012.

FRANCHIN, C., FOSSATI, T., PASQUINI, E., LINGUA, G., CASTIGLIONE, S., TORRIGIANI, P. e BIONDI, S. High concentrations of zinc and copper induce differential polyamine responses in micropropagated white poplar (*Populus alba*). *Physiologia Plantarum*. 130:77-90, 2007.

FRANCISCO, A.A.; TAVARES, A.R.; KANASHIRO, S. Reguladores vegetais e teores endógenos de poliaminas durante o desenvolvimento de taro cultivado in vitro. *Ciência Rural*. 38(5): 1251-1257, 2008.

FRANSZ, P.F., e DE JONG, J.H. Chromatin dynamics in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 560–567, 2002.

GAHAN, P.B. & GEORGE. E.F. Adventitious Regeneration. In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3a. Edição, Dordrecht: Springer. 355-401, 2008.

GALSTON, A.W. e SAWHNEY, R.K. Polyamines in Plant Physiology. *Plant Physiol.* 94: 406–410, 1990.

GEMPERLOVÁ, L.; FISCHEROVÁ, L.; CVIKROVÁ, M.; et al. Polyamine profiles and biosynthesis in somatic embryo development and comparison of germinating somatic and zygotic embryos of Norway spruce. *Tree Physiology*; 29:1287-1298, 2009.

GEORGE E.F. Plant Tissue Culture Procedure - Background. Em: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G.-J. De. (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3a. Edição, Springer. 1-28, 2008.

GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture: the technology*. Part 1, 2 ed. Exegetics: Edington, 574 p. 1993.

GIAMPAOLI, P. Efeito de cobre e zinco no desenvolvimento in vitro de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B.Smith. Tese Doutorado. Instituto de Botânica. São Paulo, 2010.

GIVNISH, T.J.; BARFUSS, M.H.J.; EE, RIINA, B.; SCHULTE, R.K.; HORRES, GONSISKA, R.P.A.; JABAILY, R.S. CRAYN, D.M.; SMITH, J.A.C.; WINTER, K.; BROWN, G.K.; EVANS, T.M.; HOLST, B.K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P.E.; SYTSMA, K.J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, v.98, n.5, p.872-895. 2011.

GROPPIA, M.D. e BENAVIDES, M.P. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*. 34: 35-45, 2008.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press-Springer. 589: 47-66. 2010.

HOSOKI, T., ASAHIRA, T. In vitro propagation of bromeliads in liquid culture. HortScience, 15: 603–604, 1980.

HSIEH, C.L. Dynamics of DNA methylation pattern. Curr. Opin. Genet. Dev. 10: 224–228, 2000.

HUANG, X.L.; LI, X.J.; LI, Y.; HUANG, L.Z. The effect of AOA on ethylene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. Physiol Plantarum. 113:424–429, 2001.

JOHNSTON, J.W.; HARDING, K.; BREMNER, D.H.; SOUCH, G.; GREEN, J.; LYNCH, P.T.; GROUT, B.; BENSON, E.E. HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors. Plant Physiology and Biochemistry. (43): 844–853, 2005.

KAKKAR, R.K.; NAGAR, P.K.; AHUJA, P.S.; RAI, V.K. Polyamines and plant morphogenesis. Biol Plantarum, 43:1–11, 2000.

KAUR-SAWHNEY, R.; TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T. e GALSTON, A.W.. Polyamines in plants: An overview. Journal of Cell and Molecular Biology, 2(1):1-12, ISSN 1303-3646. 2003.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (Eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: CBAB/EMBRAPA. (519-531), 1998.

KIM, JM., TO, T.K., SEKI, M. An epigenetic integrator: new insights into genome regulation, environmental stress responses and developmental controls by HISTONE DEACETYLASE 6. Plant Cell Physiol. 53(5): 794-800, 2012.

KUMAR, A.; ALTABELLA, T.; TAYLOR, M. & TIBURCIO, A.F. Recent advances in polyamine research. Trends in Plant Science. 2(4): 124-130, ISSN 1360-1385, 1997.

KUSANO, T.; YAMAGUCHI, K.; BERBERICH, T.; TAKAHASHI, Y. The polyamine spermine rescues Arabidopsis from salinity and drought stresses. Plant Signal Behav. 2(4): 251-252, 2007.

LEFREVE, I., GRATIA, E. e LUTTS, S. Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). Plant Science. 161: 943-952, 2001.

LEME, E.M.V., COSTA, A.. A new species from Southern Brazil, a tribute to Father Raulino Reitz. J. Bromeliad Soc. 41, 195–198. 1991.

LI, W.; LIU, H.; CHENG, Z.J.; SU, Y.H.; HAN, H.N.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.S. DNA methylation and histone modifications regulate de novo shoot regeneration

in Arabidopsis by modulating WUSCHEL expression and auxin signaling. PLoS Genet 7:e1002243, 2011.

LIU, J.H., KITASHIBA, H.; WANG, J., BAN, Y.; MORIGUCHI, T. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. Plant Biotechnology. 24: 117-126, 2007.

LO SCHIAVO, F.; PITTO, L.; GIULIANO, G.; TORTI, G.; NUTI RONCHI, V.; MARAZZATI, D.; VERGARA, R.; ORSELLI, S.; TERZI, M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiations, hormones and hypomethylating drugs. Theor Appl Genet. 77: 325–331, 1989.

LOVAAS, E. Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. Advance in Pharmacology, (38): 119–149, 1997.

LUTHER, H.E. An alphabetic list of Bromeliad Binomials. The Marie Selby Botanical Gardens. 11^a Ed. Sarasota, Florida: Bromeliad Society International, 114p. 2008.

MARTINELLI, G. The Bromeliads of the Atlantic Forest. Scientific American. (282): 86- 93, 2000.

MARTIN-TANGUY, J. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular, and physiological approaches. Physiol. Plant. 100: 675–688. 1997.

MENG, F.R.; Y.C. LI, Y.C.; YIN, J.; LIU, H.; CHEN, X.; NI, N.; SUN, Q.X. Analysis of DNA methylation during the germination of wheat sedes. Biologia Plantarum. 56: 269-275. ed.2, 2012.

MERCIER, H. et al. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured in vitro. Braz. J. Plant Physiol., 15(2): 107-112, 2003.

MIGUEL, C. & MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. Journal of Experimental Botany. 1-13, 2011.

MINOCHA, R.; SMITH, D.R.; REEVES, C.; STEELE, K.D. & MINOCHA, S.C. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. Physiologia Plantarum. 105 (1): 155-164, ISSN 1399-3054, 1999.

MINOCHA, R.S.C. & MINOCHA, S. L. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* Sarg.). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 40: 572–580, 2004.

MINOCHA, S.C. & MINOCHA, R. Role of polyamines in somatic embryogenesis. In Biotechnology in Agriculture and Forestry. Edited by Bajaj, Y.P.S. Springer Verlag Press, Berlin. 55–72, 1995.

- MOLLO, L.; MARTINS, M.C.M.; OLIVEIRA, V.F.; NIEVOLA, C.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*: published on line 1 July 2011.
- MONTEIRO, M.; KEVERS, C.; DOMMES, J.; GASPAR, T. A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 68:225-232, 2002.
- MOREL, G. M. & WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. *Am. J. Bot.* 38:138-140, 1951.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, 1962.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* (40): 853-858, 2000.
- NAKAMURA, I. e LIDA, S.. Alternative splicing of the rice. *Os MET1* genes encoding maintenance DNA methyltransferase. *J.Plant Physiol.* 165: 1774–1782, 2008.
- NEELAKANDAN, A.K. e WANG, K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant cell rep.* 31:597-620, 2012.
- NOCEDA, C.; TEREZIA, S.; MARTA, P.; MARCOS, V.; CANAL, M. J.; SALAJ, J.; RODRIGUEZ, R. DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. **Trees-StructFunct.** 23: 1285–1293, 2009.
- PIQUERAS, A. et al. Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. *Plant Science*, v.162, p.671-678, 2002.
- POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology.* (4): 273-279, 2004.
- PRADO, J.P.C. Caracterização morfo-histoquímica da Germinação e o desenvolvimento pós-seminal in vitro e formação de culturas nodulares em *Vriesea friburguensis* Mez var. *paludosa* (L.B.Smith) L.B. Smith e *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Santa Catarina, 2012.
- RABINOWICZ, P.D.; PALMER, L.E.; MAY, B.P.; HEMANN, M.T.; LOWE, S.W.; MCCOMBIE, W.R.; MARTIENSSEN, R.A. Genes and transposons are differentially methylated in plants, but not in mammals. *Genome Res*, 13:2658–2664, 2003.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MÜLLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biod. Conserv.* 14: 1799-1808, 2005.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO L.L. NODARI, R.O. LISCHKA, R.W. MÜLLER, C.V.; GUERRA, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity & Conservation*,(14): 1799-1808, 2005.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO L.L.; GUERRA, M.P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic Forest. *Ciência Rural*, 39 (3): 909-912, 2009.

REITZ, R. Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. (Flora Ilustrada Catarinense série 983) Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 559 p. 1983.

ROY, P., NIYOKI, K., SENGUPTA, D.N. e GHOSH, B. Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress induced damage of plasma membrane and PM-bound H⁺-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science* 168: 583-591, 2005.

RUIZ-GARCÍA, L.; CERVERA, M.T.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. DNA methylation increases throughout Arabidopsis development. *Planta*, 222: 301–306, 2005.

SANG, Y.; WU, M-F.; WAGNER, D. The stem cell–chromatin connection. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 20: 1143–1148, 2009.

SANTANEN, A. Polyamine metabolism during development of somatic and zygotic embryos of *Picea abies* (Norway Spruce). Academic dissertation, Helsinki, 2000.

SCHERER, R.F.; GARCIA, A.C.; FRAGA, H.P.F.; DAL VESCO, L.L.; STEINMACHER, D.; GUERRA, M.P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas cosmosus* var. *cosmosus*). *Scientia Horticulturae* 151: 38-45. 2013.

SHELDON, C.C., BURN, J.E., PEREZ, P.P., METZGER, J., EDWARDS, J.A., DENNIS, W.J. The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation, *Plant Cell*. 11: 445-458, 1999.

SHEN, W-H.; XU, L. Chromatin remodeling in stem cell maintenance in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant*. 2:600–609, 2009.

SHOEB, F.; YADAV, J.S.; BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of

polyamine metabolism in different genotypes of indica rice, *Plant Sci.*(160): 1229–1235, 2001.

SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; PELACANI, C. R.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. da. S.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation and in vitro Conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 52 (4): 923-932, 2009.

SILVEIRA, V.; BALBUENA, T. S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Biochemical changes during seed development in *Pinustaeda* L. *Plant Growth Regul.* 44:147–156, 2004.

SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regulation*, 44: 147-156, 2004.

SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W, GUERRA, M.P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 76:53–60, 2004.

SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.S.; HANDRO,W.; GUERRA,M.P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 76:53-60, 2004.

SMITH, T.A. Polyamine oxidation by enzymes from *Hordeum vulgare* and *Pisum sativum* seedlings. *Phytochemistry.* 13: 1075-1081,1974.

SMULDERS, M. J. M.; DE KLERK, G. J. Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regul* 63:137–146, 2011.

SONG, L.; JAMES, S.R.; KAZIM, L.; KARPF, A.R. Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem,* (77): 504-510, 2005.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 89:55-62, 2007.

SU, Y-H; Liu, Y-B; Zhang, X-S. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant.* 1-10, 2011.

TAIZ, L; ZEIGER, E. *Fisiologia do Estresse: Fisiologia vegetal.* 4. ed, Artmed, p. 738-773. 2009.

TANG, W. et al. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. *Physiologia Plantarum*. (122): 386-395, 2004.

TANG, W.; NEWTON, R.J. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*, Shannon, (167): 621–628, 2004.

TANURDZIC, M.; VAUGHN, M.W.; JIANG, H.; LEE, T.J.; SLOTKIN, R.K.; SOSINSKI, B.; THOMPSON W.F.; DOERGE, R.W.; MARTIENSSEN, R.A. Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS Biol*. 6:2880–2895, 2008.

TASSONI, A. et al. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiology and Biochemistry*, (385): 383-393, 2000.

TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; BORRELL, A. & MASGRAU, C. Polyamine metabolism and its regulation. *Physiologia Plantarum*. 100 (3): 664-674, ISSN 1399-3054, 1997.

VALLEDOR, L.; HASBÚN, R.; MEIJÓN, M.; RODRÍGUEZ, J.L.; SANTAMARÍA, E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M.; FEITO, I.; FRAGA, M.F.; CAÑAL, M.J.; RODRÍGUEZ, R. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 91:75–86, 2007.

VANYUSHIN, B.F. DNA methylation in plants. In: Doerfler W, Bo" hm P, eds. *DNA methylation: basic mechanisms*. Berlin, Germany: Springer- Verlag. 67–122, 2006.

VUOSKU, J.; SUORSA, M.; RUOTTINEN, M.; SUTELA, S.; MUILU-MAKELA, R.; JULKUNEN-TIITTO, R.; SARJALA, T.; NEUBAUER, P.; HAGGMAN, H. Polyamine metabolism during exponential growth transition in Scots pine embryogenic cell culture. *Tree Physiology*. 32: 1274-1287, 2012.

WALLACE, H. M.; FRASER, A. V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J*. 376:1–14, 2003.

WOLFFE, A.P. e GUSCHIN, D., "Chromatin structural features and targets that regulate transcription", *J STRUCT B*. 129: (2-3): 102-122, 2000.

WOLFFE, A.P., GUSCHIN, D. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol*, 129: 102-122, 2000.

XIAO, W., CUSTARD, R.D., BROWN, R.C., LEMMON, B.E., HARADA, J.J., GOLDBERG, R.B., e FISCHER, R.L. DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell*. 18: 805–814, 2006.

XIAO, W., GEHRING, M., CHOI, Y., MARGOSSIAN, L., PU, H., HARADA, J.J., GOLDBERG, R.B., PENNELL, R.I., e FISCHER, R.L. Imprinting of the MEA

polycomb gene is controlled by antagonism between MET1 methyltransferase and DME glycosylase. *Dev. Cell.* 5: 891–901, 2003.

XU, M.; LI, X.; KORBAN, S. S. DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109, 899–910, 2004.

YADAV, J.S. e RAJAM, M.V. Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. *J. Exp. Bot.* 48: 1537–1545, 1997.

YADAV, J.S. e RAJAM, M.V. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiol.* 116: 617–625. 1998.

ZHANG, M.; KIMATU, J.N.; LIU, K.X. DNA cytosine methylation in plant development. *J. Genet. Genomics.* 37: 1-12, 2010.

ZHANG, X., YAZAKI, J., SUNDARESAN, A., COKUS, S., CHAN, S.W.L., CHEN, H., HENDERSON, I.R., SHINN, P., PELLEGRINI, M., JACOBSEN, S.E., e ECKER, J. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126:1189–1201, 2006.

ZHU, J., KAPOOR, A., SRIDHAR, V.V., AGIUS, F., e ZHU, J.K. The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 17: 54–59, 2007.