

Vivian Almeida

**ANÁLISES DE AMIDO, PROTEÍNA, POLIAMINAS E
METILAÇÃO DO DNA EM *CATTLEYA TIGRINA* A. RICHARD
(ORCHIDACEAE)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Profa. Dra. Rosete
Pescador

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro
Guerra

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Almeida, Vivian
ANÁLISES DE AMIDO, PROTEÍNA, POLIAMINAS E METILAÇÃO DO
DNA EM CATTLEYA TIGRINA A. RICHARD (ORCHIDACEAE) / Vivian
Almeida ; orientadora, Rosete Pescador ; coorientador,
Miguel Pedro Guerra. - Florianópolis, SC, 2014.
98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Orchidaceae. 3.
Bioquímica. 4. Estruturas Semelhantes à protocormos. 5.
Metilação do DNA. I. Pescador, Rosete. II. Guerra, Miguel
Pedro. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.
IV. Título.

"Nosso progresso moral não acompanhou nosso progresso tecnológico."

- Lovelock –

Cientista que pintou um dos cenários mais radicais para os efeitos das mudanças climáticas e do aquecimento global no último século.

À minha mãe, pelo amor incondicional,

Dedico.

Aos meus avós, Dilom e Olívia, que sempre acreditaram em mim,

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as experiências vividas e pela oportunidade de evoluir constantemente.

À minha mãe, Verlei Almeida, por dar sentido às minhas decisões, e por me ajudar a entender cada momento difícil com paciência e amor infinito. Grata!

Aos meus avós, Dilom e Olívia, por serem o elo com a minha essência, e estarem sempre me apoiando mesmo à distância.

Aos queridos Têlvio e Raiza Franco, por cada palavra de apoio e pelo carinho que dão à minha mãe enquanto estou longe.

À querida amiga Jenny Paola Corredor, por ser protagonista em todos os experimentos, análises, produção e formatação de imagens e construção de texto. Por todos os meios de cultura, dias na câmara de fluxo, e pelo exemplo de humildade e generosidade. Não tenho palavras para agradecê-la.

Ao meu queridão Bruno Bachiega, repito todas as palavras ditas à Jenny. Este trabalho é resultado do seu compromisso em me ensinar, acalmar, e conduzir nas análises. Seu bom humor e responsabilidade são um exemplo.

Ao querido amigo André Felipe Lohn, pela sinceridade e amizade incondicional, conversas, caronas, apoio e carinho durante estes dois anos. Sua amizade me faz ter certeza que esta etapa valeu a pena. *Thanks!*

A minha orientadora Profa. Rosete Pescador e co-orientador Profs. Miguel Pedro Guerra pela orientação, colaboração, e compreensão durante a realização deste trabalho.

Ao Profs. Rubens Onofre Nodari pela oportunidade de fazer parte do RGV.

Aos Pós-doutorandos Paulo Poeta e Marcelo Borghezán, pela atenção com que trataram todas as minhas dúvidas.

Aos colegas de laboratório, Daniel Rosa, Pâmela Vieira, Daniela De Conti, Rafaela D. Liz, Dilnei Medeiros, Bruna Pacheco, Bruna Búriço, Jéssica Bueno, Jéssica Podeleski, pelo bom humor, harmonia e ajuda em todos os momentos.

As pessoas queridas as quais conheci e me encantei, Monique dos Santos, Marília Shibata, Luíz Carlos Mamona, Alceu Kunze, Fernando David Sanchez Mora, Gabriella Vanderlinde, Suzeli Simon, Kelly Justin, Larissa Villar, Roberta Guedes, Moisés Júnior e Aline

Cardoso, cada um de vocês foi muito importante para que eu montasse o quebra-cabeça da pós-graduação, e cada conversa vai ser lembrada com carinho e saudosismo.

Ao professor Afonso Celso Dias Bainy, por disponibilizar o espaço e a infraestrutura do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, e aos atenciosos e pacientes Jacó Joaquim Matos e Miguel Angel Saldaña Serrano por todos os conhecimentos passados, e pelo desprendimento de acompanharem a mim e ao Bruno durante as análises.

Ao craque em estatística, Virgilio Uarrota pela paciência e disponibilidade em todos os momentos que precisei de ajuda.

A amiga Luana Moraes de Aguiar, pela companhia diária no nosso querido apartamento, pela paciência necessária para uma boa convivência, pelas infinitas conversas e apoio fraternal sempre que precisei. A amiga Daieli Althaus, pela amizade de oito anos que me deu segurança de vir para Florianópolis e iniciar o mestrado. As amigas Noele Bolzan Duarte e Adriene Bolzan Duarte pelo carinho e amor sinceros dedicados durante... , bom.. desde sempre! Amo todas vocês!

A Denise Basso por compartilhar comigo as angústias da graduação e da pós-graduação. Vamos em frente amiga!

Ao grupo M-tai por compartilhar momentos tão especiais e profundos.

A secretária da Pós Graduação Bernadete Possebon Ribas, pelo carinho especial e atenção com que me atendeu durante o mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, CNPQ e FAPESC.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela formação acadêmica, pela estrutura física e humana para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

O Bioma Mata Atlântica é considerado um *hotspot* de biodiversidade, assim sujeito a medidas para a sua conservação. As constantes agressões e ameaças de destruição deste bioma têm afetado principalmente espécies epífitas como é o caso da família Orchidaceae. A beleza das flores e o alto valor ornamental e comercial agravam ainda mais a exploração destas plantas, sendo necessário realizar estudos de propagação destas espécies. As dificuldades no processo de propagação vegetativa convencional e baixo índice de germinação das sementes na natureza direcionam os estudos para a compreensão do desenvolvimento e de propagação destas espécies *in vitro*. Em vista disso, este trabalho objetivou avaliar aspectos bioquímicos da morfogênese de estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) a partir de explantes foliares de *C. tigrina*. Realizou-se quantificações de proteínas totais e amido, poliaminas totais livres e análise de metilação do DNA global em amostras coletadas a partir do 7º dia da inoculação e com intervalo de sete dias, durante 35 dias de cultivo. O maior teor de proteínas foi observado aos 21 dias de cultivo (106, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$), coincidindo como período de maior taxa de formação de ESP. O decréscimo no conteúdo de proteínas ocorreu concomitantemente com a redução da divisão celular e aumento do volume das células, período que antecede a indução das ESPs. O maior teor de amido foi registrado aos 14 dias de cultivo (3901,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$), com posterior decréscimo. O teor de poliaminas (PA) livres aumentou de acordo com a progressão dos estádios de desenvolvimento das ESP. Os teores de Putrescina foram os mais elevados durante o período de cultivo. Esta PA parece exercer um papel principal na morfogênese de ESP em *C. tigrina*. Enquanto que, a espermina e a espermidina podem ter um papel secundário ou implicariam em processos posteriores de diferenciação, que não foram identificados neste trabalho. Os resultados obtidos na análise de metilação do DNA global mostram que a hipometilação coincide com início da diferenciação e aumento no número e volume celular, e se mantém durante os estágios iniciais de desenvolvimento das ESP. O reestabelecimento da porcentagem de metilação aos 35 dias de cultivo coincide com uma mudança no padrão morfogenético das estruturas, que neste período de cultivo apresentam um alongamento diferenciado. O

padrão de metilação do DNA (metilação/demetilação) parece controlar a expressão gênica durante a formação de ESPs, e a presença de TDZ no meio de cultura pode estar associada aos fatores que desencadearam a divisão e diferenciação celular.

Palavras-chave: Estruturas semelhantes à protocormos. Orchidaceae. Bioquímica

ABSTRACT

The Atlantic Forest Biome is considered a biodiversity hotspot, thus subject to measures for its conservation. The constant attacks and destruction threats on this biome has affected mainly epiphytic species such as the orchid family. The beauty of this flowers and the ornamental and high commercial value of them exacerbate even more the exploration of these plants, becoming necessary to perform studies on the propagation of these species. The slow vegetative propagation, and the difficulty of the seeds to germinate in nature, directs efforts towards the understanding of the development of these species *in vitro*. Therefore, the objective of this study is to analyse aspects of the biochemical morphogenesis of the protocorm like-bodies (PLBs) from *C. trigrina* leaf explants. Quantification of total protein and starch analysis of total polyamines and global DNA methylation in samples collected every seven days, during a 35 days cultivation were performed. It was possible to see the formation of PLB starting at the 7th day of cultivation. Also, the protein highest level was observed after 21 days of cultivation ($106,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$), coinciding with the peak PLB formation. The decreasing in protein content occurred concomitantly with reduction in cell division and the increasing in cell volume. The highest starch content was seen after 14 days of cultivation ($3901,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$), with subsequent decreasing . The content of polyamines (PA) increased with PLB development stages progression, then remaining constant. The Putrescine was the PA with higher levels and appears to play a major role in *C. trigrina* PLB morphogenesis, while spermine and spermidine have a secondary role, or would result in subsequent differentiation processes, which have not been identified in this work. The results of the methylation analysis shows that the global DNA hypomethylation coincides with the beginning of cell differentiation, remaining constant during the stages where there is an increasing in number and volume of the same PLB. The methylation percentage recovery at 35 days of cultivation coincides with a morphogenetic change in the structure pattern, which in this period of cultivation has a marked elongation. The DNA methylation pattern (methylation/demethylation) appears to control gene expression during

the PLB formation, and the TDZ presence in the culture medium may be associated with factors such that initiate this variations.

Keywords: Protocorm like-bodies. Orchidaceae. Biochemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Flores de <i>Cattleya tigrina</i> A. Richard.	17
Figura 2 - Aspectos histológicos da indução de estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) a partir de explantes foliares de <i>Cattleya tigrina</i> A. Rich, cultivados em meio de cultra MS básico modificado (MSBM). .	36
Figura 3 - Teores de proteínas totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$) durante a indução de ESPs de <i>Cattleya tigrina</i> A. Rich em relação ao tempo (dias) de cultivo em meio de cultura MS básico modificado (MSBM).	39
Figura 4 - Estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) a partir de explantes foliares de <i>Cattleya tigrina</i> A. Rich. Cultivadas em meio de cultura MS básico modificado (MSBM).....	41
Figura 5 - Teores de amido ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$) aos zero, 7, 14,21, 28 e 35 dias de cultivo de <i>Cattleya tigrina</i> A. Rich, em meio de cultura MS básico modificado (MSBM).....	43
Figura 6 - Concentração média de: A) Poliaminas (PA) totais livres em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ e B) Razão de PA: Put (Spd+Spm)-1 em diferentes estágios de desenvolvimento de ESPs induzidas a partir de explantes foliares, cultivados em meio de cultura MS modificado (MSBM).	57
Figura 7 - Concentração média de: A) Putrescina em ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$); B) Espermidina em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$; C) Espermina em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ em diferentes estágios de desenvolvimento de ESPs induzidos a partir de explantes foliares, cultivados e meio de cultura MS modificado (MSBM).	59
Figura 8 - Valores médios de 5-metilcitosina expressos em porcentagem, quantificada por HPLC/UV em relação aos dias de cultivo de basesfoliares de <i>C. tigrina</i> em meio de cultura MS modificado (MSBM).....	78
Figura 9 - Resumo esquemático das mudanças bioquímicas durante a indução de ESPs a partir de bases foliares de <i>C. tigrina</i> ao zero, 7, 14, 21, 28 e 35 dias.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACC - Ácido 1-aminociclopropano carboxílico
ANOVA - Análise da Variância
Atm - Atmosfera
C - Citosina
C. - *Cattleya*
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCA - Centro de Ciências Agrárias
CCB - Centro de Ciências Biológicas
CIA - Clorofórmio-álcool isoamílico
cm - Centímetro
CMT3 - CHROMOMETHYLASE 3
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CR - Criticamente em perigo de extinção
CTAB - Brometo de cetil-trimetilamônio
dA - DesoxiAdenosina
DAH - 1,7- diaminopentano
dC - DesoxiCitidina
DFMA - Difluorometilarginina
dG - DesoxiGuanosina
DME - DEMETER
DNA - Àcido desoxirribonucleico
DNMTs - DNA metiltransferases
DNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DRM1/2 - DOMAINS REARRANGED METHYLASE 1 e 2
Dt - DesoxiTimidina
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM - Em perigo de extinção
ESP - Estruturas Semelhantes à Protocormo
FAPESC - Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação de Santa Catarina
g - grama
G - guanina
HCl - Ácido Clorídrico
HPLC - High Performance/Pressure Liquide Chromatography
KH₂PO₄ - Fosfato Monopotássico

LABCAI - Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
LFDGV - Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
M - Molar
MCW - Metanol:clorofórmio:água
MET1 - METHYLTRANSFERASE 1
MF - Massa Fresca
mg - miligrama
ml - mililitro
mm - milímetro
Mm - millimolar
MMA - Ministério do Meio Ambiente
MO - Microscópio Óptico
MS - Meio de cultura Murashige e Skoog, 1962
NaCl - Cloreto de sódio
NaH₂PO₄ - Fosfato monobásico de sódio
NaOAc - Acetato de sódio
NaOH - Hidróxido de Sódio
Nm - nanômetro
p/v - Percentual massa/volume
PA – Poliaminas
pH - Potencial de Hidrogênio
PMSF - Fluoreto fenil metano sulfonil
PPG - Programa de Pós Graduação
PUT - Putrescina
RNA - Ácido ribonucleico
RNAi - RNA de interferência
RNase - Ribonuclease
ROS1 - REPRESSOR OF SILENCING 1
RPM - Rotações por minuto
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SPD - Espermidina
SPM - Espermina
TCL - *Thin cell layer*
TDZ - Thidiazuron
TE - Tris-EDTA

Tris - HCL - Tris hidroximetil amino metano
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
UV - Ultravioleta
v/v - Percentual volume/volume
VU - vulnerável à extinção
ZnSO₄ - Sulfato de Zinco
µg - micrograma
µL - microlitro
µm - micrômetro
µmol – Micromolar
(NH₄)₂SO₄ Sulfato de amônio
5mC 5-metilcitosina

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	10
ABSTRACT	12
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	15
1 INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
2 CAPÍTULO I: TEORES DE AMIDO E PROTEÍNAS TOTAIS NA MORFOGÊNESE DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS A PARTIR DE BASES FOLIARES DE C. TIGRINA	27
2.1 INTRODUÇÃO.....	29
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.2.1 Material Vegetal.....	30
2.2.2 Análise estrutural de ESPs em Microscopia Óptica (MO).....	31
2.2.3 Análises Bioquímicas.....	31
2.2.4 Determinação do Conteúdo de Proteínas Totais.....	32
2.2.5 Determinação do Conteúdo de Amido.....	32
2.3 Análise estatística.....	33
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
2.4.1 Aspectos histológicos na indução e formação de ESPs.....	34
2.4.2 Conteúdo de amido e proteínas totais.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
3 CAPÍTULO II: POLIAMINAS LIVRES NA MORFOGÊNESE DE ESPs EM BASES FOLIARES DE C. TIGRINA	50
3.1 INTRODUÇÃO.....	52
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.2.1 Análise de poliaminas endógenas livres.....	55
3.2.2 Análise estatística.....	56
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

4	CAPÍTULO III: QUANTIFICAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA GLOBAL DE ESPS A PARTIR DE BASES FOLIARES DE <i>C. TIGRINA</i>	71
4.1	INTRODUÇÃO	72
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	74
4.2.1	Extração de DNA	74
4.2.2	Digestão de ácidos nucleicos.....	75
4.2.3	Análise por HPLC/UV.....	76
4.3	Análise estatística.....	76
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	87

1 INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O bioma Mata Atlântica é reconhecido mundialmente pela elevada riqueza e endemismo de espécies. Considerado um *hotspot* para conservação da biodiversidade, estima-se nele a existência de 20.000 espécies de plantas, das quais 8.000 (40%) são endêmicas (MYERS *et al.*, 2000, MITTERMEIER *et al.*, 2004). Em se tratando de um bem ambiental, encontra-se amparado pela Constituição Federal que o inseriu na categoria de Patrimônio Nacional (art. 255). Há inúmeras publicações que citam sua importância e a necessidade de sua proteção. Contudo, este é um dos biomas mais ameaçados do Brasil devido às constantes agressões ou ameaças de destruição dos habitats nas suas variadas tipologias e ecossistemas associados (SOS MATA ATLÂNTICA, 2013).

Estima-se que neste bioma ocorram de 3.000 a 4.000 espécies de epífitos vasculares (KERSTEN, 2010), sendo esta comunidade a mais afetada pelas alterações na floresta, devido às grandes mudanças microclimáticas ocorridas através do processo de fragmentação (PRIMACK & RODRIGUES, 2005). As espécies epífitas são responsáveis por fazerem das florestas tropicais e subtropicais um dos mais complexos ecossistemas da biosfera, representando até 50% destes ambientes (KERSTEN & SILVA, 2001). A dependência de substrato arbóreo em associação à sensibilidade a umidade faz com que as epífitas sejam indicadores ecológicos eficientes, registrando tanto a qualidade dos ecossistemas quanto as variações ambientais naturais (TRIANA-MORENO *et al.*, 2003). Entre as epífitas, as orquídeas, particularmente, constituem excelentes bioindicadores ambientais, pois são sensíveis às interferências antrópicas em matas primárias em virtude da ocupação de nichos especializados (SUZUKI, 2005).

A família Orchidaceae é apontada como a de maior riqueza específica na estrutura do componente epifítico (MEDEIROS & JARDIM, 2011), representando 45,8% desta flora (KERSTEN, 2010). Com cerca de 20.000 espécies distribuídas em aproximadamente 850 gêneros, a família Orchidaceae é uma das mais numerosas e especializadas do Reino Vegetal, (ATWOOD, 1986; DRESSLER, 1993), encontradas em praticamente todos os continentes, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais (DRESSLER, 1993).

De acordo com Barros *et al.* (2013), o Brasil possui cerca de 2.450 espécies distribuídas em 240 gêneros, dos quais 65% são

endêmicos em nível de espécie. Entre as espécies avaliadas no Livro Vermelho da Flora do Brasil, a família das orquídeas apresenta o segundo maior número de espécies consideradas “Críticamente em perigo” (CR), terceiro maior número de espécies consideradas “Em perigo” (EN), e o maior número de espécies consideradas “Vulneráveis à extinção” (VU) (MMA, 2013). Foram avaliadas 439 espécies, das quais 169 foram consideradas ameaçadas de extinção (FORZZA *et al.*, 2010).

Entre as espécies ameaçadas de extinção, destaca-se o gênero *Cattleya*, o qual está entre os mais importantes da família Orchidaceae devido o elevado valor ornamental. Apresenta flores exuberantes e vivamente coloridas (PAULA & SILVA, 2004), e por isso obtém alto valor comercial, tornando-se um importante alvo de coleta predatória. Na lista das espécies da flora brasileira, publicada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2008) encontram-se 34 espécies de Orchidaceae, das quais sete destas pertencem ao gênero *Cattleya*. No Livro Vermelho da Flora do Brasil são citadas 15 espécies de *Cattleya*, das quais 10 são consideradas “Vulneráveis”, três “Em Perigo” e duas “Críticamente em perigo”. Entretanto, há muitas espécies com deficiência de dados, sendo este gênero muito pobremente representado em coleções de herbário. O Brasil possui o maior número de espécies de *Cattleya* (28), das quais 23 são endêmicas (PABST & DUNGS, 1975, 1977; FOWLIE, 1977; VAN DEN BERG, 1996).

Klein *et al.*(1977) encontraram duas representantes do gênero *Cattleya* na Ilha de Santa Catarina (Florianópolis) e nas suas proximidades, *C. leopoldii* Versh. (sinonímia de *C. tigrina* A. Rich) e *C. intermedia* Grah. De acordo com Cruz *et al.* (2003), *Cattleya tigrina* A. Richard é endêmica do bioma Mata Atlântica e habita trechos de matas ribeirinhas, caracterizados pela alta umidade. Esta espécie também é encontrada nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, região Sul da Bahia e Pernambuco. Destaca-se pela coloração e número de flores, sendo muito cultivada e comercializada pelos orquidófilos devido seu alto valor comercial (ROCHA, 2008). Para mais, seu período de floração ocorre em janeiro, época de alta temporada turística no litoral brasileiro, tornando-a alvo constante de coleta por mateiros, que exploram os lucros de sua venda (VENTURA *et al.*, 2002), podendo ser

esse um dos motivos para estar avaliada como vulnerável à extinção no Livro Vermelho da Flora do Brasil (MMA, 2013).

Aliado à coleta indiscriminada, o ciclo de vida altamente especializado e a destruição dos seus habitats pela expansão humana ameaçam muitas espécies de orquídeas de extinção (FERREIRA & SUZUKI, 2008). Além disso, há dificuldade das sementes destas plantas germinarem, pois são extremamente diminutas, com 0,005 a 6 mm de comprimento e geralmente não possuem reservas nutritivas, apresentando um padrão bastante particular de germinação e desenvolvimento, iniciando-se por intumescimento da semente que rompe o tegumento seminal e libera o embrião. Este se desenvolve numa estrutura tuberiforme, geralmente clorofilada, denominada protocormo (ARDITTI, 1992).

O termo protocormo foi proposto em 1890 para descrever o estágio inicial do desenvolvimento de licopodíneas, que formavam uma estrutura tuberiforme a partir da germinação dos esporos (ARDITTI & ERNST, 1993). De acordo com Pridgeon *et al.* (1999; 2005), esta é uma estrutura juvenil e meristemática, a partir da qual se formariam os primórdios dos sistemas caulinar e radicular. Segundo Barabé *et al.* (1993) um único protocormo possui muitos epiblastos ou centros generativos, cada um capaz de produzir uma planta. Sob condições naturais, após a germinação e formação dos protocormos, desenvolvem-se rizoides, necessários para a fixação e absorção de nutrientes (ARDITTI, 1992). Após a associação com um fungo micorrízico apropriado, formam-se envelados de hifas fúngicas no espaço intracelular das células parenquimáticas do embrião, chamados pelotons (PETERSON *et al.*, 2004), e a degradação destas estruturas fornece carbono e sais minerais ao protocormo. Depois de alguns dias (ou semanas) o protocormo desenvolve um ápice caulinar com primórdio foliar e ocorre a formação de raízes.

A propagação vegetativa de orquídeas por meio da divisão de rizomas, bulbos ou pelo enraizamento de brotos também exige um longo tempo (MONDAL *et al.*, 2013). Devido a esta lenta e ineficiente multiplicação por vias naturais de propagação (JUNGHANS & SOUZA, 2009), a conservação de orquídeas depende de estratégias à longo prazo (MACHADO NETO & CUSTÓDIO, 2005). Bancos de semente, uma maneira de conservação *ex situ*, têm se tornado uma boa opção (ALLEM, 2001). O cultivo *in vitro* também é uma ferramenta muito utilizada na conservação de espécies ameaçadas (SARASAN *et al.*,

2006), tanto na propagação clonal por explantes (vegetativa) como na germinação de sementes (FAY, 1994; SARASAN *et al.*, 2006). Segundo Arditti (1992), tanto a germinação das sementes, quanto o desenvolvimento dos protocormos *in vitro*, não diferem muito dos mesmos eventos observados naturalmente. Desde que Knudson, em 1922, desenvolveu um método para a germinação assimiótica, essa técnica passou a ser amplamente utilizada para a propagação em larga escala de várias espécies (HOSSAIN, 2008).

A cultura de tecidos vegetais se fundamenta principalmente na totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade das mesmas em produzir órgãos que regenerem uma planta completa em meio de cultura favorável, podendo ser iniciado com qualquer parte da planta: gemas, raízes, folhas, células isoladas, protoplastos, semente, embrião zigótico, antera, etc (CARVALHO, 1999). Essas técnicas têm gerado grandes avanços nas pesquisas básicas, principalmente na fisiologia, bioquímica e genética de plantas, fornecendo ferramentas de ação em áreas práticas, como no melhoramento genético vegetal, na farmacologia, na micropropagação e na conservação de germoplasma (GEORGE, 1993; KERBAUY, 1998).

A maioria das pesquisas em propagação vegetal de orquídeas está pautada na produção de protocolos de germinação ou organogênese *in vitro*. Muitos estudos foram desenvolvidos utilizando segmentos foliares (GEORGE *et al.*, 2008; GANTAIT & SINNIHAH, 2012;), ápices meristemáticos (MALABADI *et al.*, 2005), protocormos, sejam inteiros, com o ápice retirado ou —*thin cell layer* – TCL (SILVA & TANAKA 2006; NAING *et al.*, 2011; NG & SALEH, 2011), talos florais (CHEN *et al.*, 2002a; CHEN & CHANG, 2000), segmentos caulinares (LUO *et al.*, 2008) e ápices de raiz (MANNERS *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2003). Vários destes explantes, quando submetidos à micropropagação *in vitro*, formaram aglomerados de células meristemáticas, com tecidos bem diferenciados e duas estruturas bipolares discretas, denominados "estruturas semelhantes à protocormos" (ESP). Estas estruturas podem ser induzidas diretamente através de ápices meristemáticos (TOKUHARA & MII, 1993; SUBRAMANIAM & TAHA, 2003), talos florais (ICHIHASHI, 1992; CHEN *et al.*, 2002b) , ápices de raiz (TANAKA *et al.*, 1976), e segmentos foliares (PARK *et al.*, 2002; SHEELAVANTHATH *et al.*, 2005), e indiretamente através da

cultura de calos embriogênicos (ISHII *et al.*, 1998; TOKUHARA & MII, 2001; 2003). Existem padrões variados de formação de ESP, podendo ter origem unicelular (TOKUHARA & MII, 2003; JHENG *et al.*, 2006; VIJ *et al.*, 1984; CHEN *et al.*, 1999) ou multicelular (PARK *et al.*, 2002, 2003).

Embora a morfologia e aspectos do desenvolvimento estrutural sejam conhecidos, são poucos os estudos a respeito da ontogênese de ESPs (LEE *et al.*, 2013). Muitos autores afirmam que ESP são embriões somáticos (STEWART & MAPES 1971; BEGUM *et al.*, 1994; ISHII *et al.*, 1998; CHEN & CHANG, 2000; HUAN *et al.*, 2004; TEIXEIRA DA SILVA & TANAKA, 2006; HOSSAIN *et al.*, 2013; TEIXEIRA DA SILVA, 2013; LEE *et al.*, 2013), ou que a embriogênese somática é um passo inicial na formação das ESPs (ARDITTI & ERNST, 1993; BEGUM *et al.*, 1994; ZHAO *et al.*, 2008). Lee *et al.* (2013) verificaram, através de estudos histológicos e histoquímicos, que em estágios iniciais de formação de ESP, as células apresentam características citológicas e marcadores de membrana semelhantes ao desenvolvimento do embrião zigótico. Estes autores afirmam, com base no padrão de divisão celular, que a maioria das células individuais toma uma forma esférica com um núcleo central e citoplasma composto por vacúolos distintos. A primeira divisão mitótica dá origem a duas células de tamanho desigual, a célula apical, menor, divide-se para dar origem ao "protocormo propriamente dito", que se desenvolve posteriormente em uma ESP. A célula basal, maior, tem menos divisões mitóticas, e as suas células-filhas permanecem vacuoladas. A ausência da formação de células suspensoras no desenvolvimento de ESPs foi atribuída ao meio de cultura, o qual não induz a formação de suspensor. James Antony *et al.* (2014), através de observações histológicas e microscopia eletrônica de varredura, também verificaram a maturação de ESPs e formação gradual de primórdios foliares por meio de embriogênese somática na variedade Mokara Broga gigante.

Muitos autores remetem ESP como embriões somáticos, no entanto, evidências claras de embriogênese somática ainda são limitadas. Baseando-se no fato de que o termo protocormo foi criado devido às sementes de orquídeas apresentarem um padrão de desenvolvimento inicial bastante distinto das demais angiospermas, e específico para o grupo, sugere-se que este comportamento diferenciado perpetue na morfogênese *in vitro*, justificando neste trabalho o uso do

termo estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) quando refere-se às estruturas obtidas diretamente de explantes foliares.

Com tais características, as ESP são capazes de se converterem em plântulas facilmente, quando cultivadas em meio com reguladores de crescimento (NG & SALEH, 2011), e por isso o estudo dessas estruturas é fundamental para avanço das pesquisas em transformação genética em orquídeas (LIAU *et al.*, 2003; SREERAMANAN *et al.*, 2008), bem como para o sistema de propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção.

A espécie *Cattleya tigrina* A. Rich. ex Beer. (Orchidaceae) tem sido usada para estudos de indução e formação de ESP no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV- CCA – UFSC). Fritsche (2012) deu início à compreensão da regeneração de ESPs em sistemas *in vitro*, e Liz (2013) elucidou aspectos envolvidos na morfo-histodiferenciação do desenvolvimento de ESPs.

Dando continuidade a compreensão de ESP em *Cattleya tigrina* A. Rich. ex Beer. (Orchidaceae), este trabalho teve como objetivo apresentar aspectos bioquímicos, como teores de proteínas, amido, poliaminas livres e porcentagem de metilação do DNA global, associando à indução e formação de ESPs, para o aporte de informações e estudos ontogenéticos futuros.

Assim, optou-se por apresentar a presente dissertação em três capítulos, o primeiro deles tem por objetivo apresentar teores de proteínas totais e amido na ontogênese de formação de ESPs a partir de bases foliares de *C. tigrina*. O segundo capítulo por sua vez, apresenta tipos e teores de poliaminas (PA) livres na formação das ESPs em bases foliares de *C. tigrina*. E o terceiro capítulo, aborda as alterações na metilação do DNA global durante a morfogênese de ESP de *C. tigrina*.

Figura 1 - Flores de *Cattleya tigrina* A. Richard.

Disponível em: http://www.orchidnord.com/c_page/cattleya_tigrina/cat_tig.htm



Fonte: orchid-nord



Fonte: orchid-nord

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEM, A. C. Managing genebanks: seed base collection examined. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, 2001.
- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1993.
- ATWOOD, J. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. **Selbyana** 9: 171-186, 1986.
- BARABÉ, D.; SAINT-ARNAUD, M.; LAUZER, D. Sur la natureza des protocormes d'Orchidées (Orchidaceae). **Comptes rendus de l'Académie des sciences** 316: 139-144, 1993.
- BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 15 Dez. 2013.
- BEGUM, A.A.; TAMAKI, M.; KAKO, S. Somatic embryogenesis in *Cymbidium* through in vitro culture of inner tissue of protocorm-like bodies. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science** 63, 419-427, 1994.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Instrução Normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008. Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 145, n. 185. Seção 1, 75-83, 24 set. 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Disponível em: <
<http://cncflora.jbrj.gov.br/porta1/pt-br/livro>>. Acesso em: 15 Dez. 2013

CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa CNPA, 39p (Embrapa CNPA. Documento, 64), 1999.

CHEN, J. T.; CHANG, C.; CHANG, W. C. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium Gower Ramsey* and subsequent plant regeneration. **Plant Cell Rep** 19:143–149, 1999.
CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). **Plant Science** 160: 87-93, 2000.

CHEN, T. Y.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 38: 595-597, 2002.

CRUZ, D.T.; BORBA, E. L.; VAN DEN BERG, C. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) no Estado da Bahia. **Sitientibus, Série Ciências Biológicas**, 3: 26-34, 2003.

DRESSLER, L. R. Phylogeny and classification of the orchid Family. **Dioscorides Press**, Portland, p. 314, 1993.

FAY, M. F. In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservation? **Biodiversity and Conservation**, v. 3, p. 176-183, 1994.

FERREIRA, W. M.; SUZUKI, R.M. O cultivo in vitro de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: M.I.B. Loiola, I.G. Baseia & J.E. Lichston (org.). **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil. Imagem Gráfica**, Natal, pp. 67-68, 2008.

FORZZA, R.C.; LEITMAN, P.M.; COSTA, A.F.; CARVALHO JR., A.A.; PEIXOTO, A.L.; WALTER, B.M.T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D.P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H.C.; PRADO, J.; STEHMANN, J.R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; PIRANI, J.R.;

SYLVESTRE, L.; MAIA, L.C.; LOHMANN, L.G.; QUEIROZ, L.P.; SILVEIRA, M.; COELHO, M.N.; MAMEDE, M.C.; BASTOS, M.N.C.; MORIM, M.P.; BARBOSA, M.R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.B.; SOUZA, V.C. 2010. **Introdução. in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010>.

FOWLIE, J. A. The Brazilian bifoliate Cattleyas and their color varieties. **Pomona, Azul Quinta Press**, p. 132, 1977.

FRITSCHÉ, Y. **Regeneração de estruturas semelhantes à protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas.** Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

GANTAIT, S.; SINNIH, U. R. Rapid micropropagation of monopodial orchid hybrid (Aranda Wan Chark Kuan 'Blue' × Vanda coeruleaGriff. ex. Lindl.) through direct induction of protocorm-like bodies from leaf segments. **Plant growth regulation**, 68: 129-140, 2012.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. D. **Plant propagation by tissue culture.** v.1. The Background, 3ed. Springer, 501p, 2008.

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

HOSSAIN, M. M.; KANT, R.; VAN, P. T.; WINARTO, B.; ZENG, S-J.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences** 32:69–139, 2013.

HOSSAIN, M. M. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of Epidendrum ibaguense Kunth. **African Journal of Biotechnology**, vol. 7. p. 3614-3619, 2008.

HUAN, L. V. T.; TAKAMURA, T.; TANAKA, M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. **Plant Science** 166 : 1443 – 1449, 2004.

ICHIHASHI, S. Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks. **Lindleyana** 7 : 208 – 215, 1992.

ISHII, Y.; TAKAMURA, T.; GOI, M.; TANAKA, M. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. **Plant Cell Reports** 17 : 446 – 450, 1998.

JAMES ANTONY, J. J.; SUNDARASEKAR, J.; RATHINAM, X.; MARIMUTHU, K.; SUBRAMANIAM, S. Microscopical analysis of in vitro *mokara broga* giant orchid's PLBs. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, 26 (1), pp. 73-81, 2014.

JHENG, F. Y.; DO, Y. Y.; LIAUH, Y. W.; CHUNG, J. P.; HUANG, P. L. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’ by adjusting carbohydrate sources. **Plant Science** 170 : 1133 – 1140, 2006.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. DA S. **Aspectos práticos da micropropagação**. Cruz das Almas: Emprapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009.

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**. v. 2 Brasília: Embrapa, 519-531, 1998.

KERSTEN, R. A. Epífitas vasculares - Histórico, participação taxonômica e aspectos relevantes, com ênfase na Mata Atlântica. **Hoehnea** 37: 9-38, 2010.

KERSTEN, R. A.; SILVA, S. M. Composição florística e estrutura do componente epifítico vascular em floresta de planície litorânea na Ilha do Mel, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.2, p.213-226, 2001.

KLEIN, R. B.; BRESOLIN, A.; REIS, A. Distribuição de Orquídeas da Ilha de Santa Catarina e Arredores. **Insula** 9: 3-29, 1977.

KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 1-25, 1922.

LEE, Y.-I.; HSU, S.-T.; YEUNG, E.C. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. **American Journal of Botany**, 100 (11), pp. 2121-2131, 2013.

LIAU, C. H.; YOU, S.J.; PRASAD, V. HSIAO, H. H.; LU, J. C.; YANG, N. S.; CHAN, M. T. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of an Oncidium orchid. **Plant Cell Reports** 21: 993-998, 2003.

LIZ, R. D. **Elucidação da morfo-histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) de espécies de *Cattleya lindl.* Micropropagadas.** Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

LUO, J. P.; WANG, Y.; ZHA, X. Q.; HUANG, L. Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 93: 333-340, 2008.

MACHADO-NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Orchid Conservation through seed banking: ins and outs. **Selbyana**, v. 26, n. 1, 2005.

MALABADI, R. B.; MULGUND, S. G.; KALLAPPA, N. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. **Journal of Plant Physiology** 162: 473-478, 2005.

MANNERS, V.; KUMARIA, S.; TANDON, P. Micropropagation of *Vanda coerulea* Griff ex Lindl.: A study of regeneration competence of roots in vitro. **Proceedings of the International Conference on**

Environmental Engineering and Applications, Singapore (ICEEA 2010), 100-102, 2010.

MEDEIROS, T.D.S.; JARDIM, M.A.G. Distribuição vertical de orquídeas epífitas na Área de Proteção Ambiental (APA) Ilha do Combu, Belém, Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 9(1):33-38, 2011.

MITTERMEIER, R.A.; GIL, P.R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C.G.; LAMOREUX, J.; FONSECA, G.A.B. **Hotspots Revisited. Cemex, México City**, 2004.

MONDAL, T.; ADITYA, S.; BANERJEE, N. In vitro Axillary Shoot Regeneration and Direct Protocorm-like Body Induction from Axenic Shoot Tips of *Doritis pulcherrima* Lindl. **Plant Tissue Cult. & Biotech.** 23(2): 251-261, 2013.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853-858, 2000.

NAING, A. H.; CHUNG, J. D.; LIM, K. B. Plant regeneration through indirect somatic embryogenesis in *Coelogyne cristata* orchid. **American Journal of Plant Sciences** 2, 262–267, 2011.

NG, C. Y.; SALEH, N. M. In vitro propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 105: 193-202, 2011.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**, vol. 2. Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim, 1977.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**. Hildesheim, Brucke. v. 1, 408 p, 1975.

PARK, S. Y.; MURTHY, N. H.; PAEK., K. Y. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. **Plant Science** 164: 919– 923, 2003.

PARK, S. Y.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Rapid propagation of Phalaenopsis from floral stalk-derived leaves. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 38: 168–172, 2002.

PAULA C. C. and SILVA H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. 3a ed. Viçosa, UFV. 106p, 2004.

PETERSON, R. L.; MASSICOTE, H. B.; MELVILLE, L. H. Mycorrhizas: anatomy and cell biology. **Ottawa: NRC Research Press**, 2004.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. Genera orchidacearum. v 4. Epidendroideae **Oxford: Oxford University Press**, 2005.

PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W. Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae. **Oxford University Press, Oxford**, 1999.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Vozes Editora: Rio de Janeiro. 327 p., 2005.

ROCHA, J.R. **ABC do Orquidófilo/ de uma, várias ou muitas orquídeas**. São Paulo, SP. Editora Agronômica Ceres Ltda, 2008.

SARASAN, V. A.; CRIPPS, R.; RANSAY, M. M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J. K. Conservation in vitro of threatened plants – progress in the past decade. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**, 42, 206–214, 2006.

SHEELAVANTHMATH, S. S.; MURTHY, H. N.; HEMA, B. P.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*. **Scientia Horticulturae** 106: 395-401, 2005.

SILVA, J. A. T.; TANAKA, M. Multiple regeneration pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). **J Plant Growth Reg** 25:203-210, 2006.

SOS MATA ATLÂNTICA. 2013. Disponível em: <
<http://www.sosma.org.br/14622/divulgados-novos-dados-sobre-a-situacao-da-mata-atlantica/#sthash.yNpLPjJ1.dpuf> > Acesso em: 22 dezembro 2013.

SREERAMANAN, S.; VINOD, B.; SASHI, S.; XAVIER, R. Optimization of the transient-gusa gene transfer of *Phalaenopsis violacea* Orchid via *Agrobacterium tumefaciens*: an assessment of factors influencing the efficiency of gene transfer mechanisms. **Advances in Natural and Applied Sciences** 2: 77-88, 2008.

STEWARD, F. C.; MAPES, M. O. Morphogenesis in aseptic cell cultures of *Cymbidium*. **Botanical Gazette** 132, 65-70, 1971.

SUBRAMANIAM, G.; TAHA, R. M. Morphogenesis of *Cymbidium atropurpureum* in vitro. **Malaysian Journal of Science** 22: 1–5, 2003.

SUZUKI, R.M. S.O.S. Orquídeas: a coleta indiscriminada já leva espécies à extinção. **Revista Terra da Gente** 15: 29-35, 2005.

TANAKA, M.; SENDA, Y.; HASEGAWA, A. Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis*. **American Orchid Society Bulletin** 46 : 1022– 1024, 1976.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. **Plant Cell Tissue Organ Cult** 113:149–161, 2013.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; TANAKA, M. Embryogenic callus, PLB and TCL paths to regeneration in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). **The Journal of Plant Growth Regulation** 25 (3), 203-210, 2006.

TOKUHARA, K.; MII, M. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting

carbohydrate sources. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant** 39: 635-639, 2003.

TOKUHARA , K.; MII, M. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant** 37: 457– 461, 2001.

TOKUHARA , K.; MII, M. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by shoot tips of flower stalk buds. **Plant Cell Reports** 13 : 7– 11, 1993.

TRIANA-MORENO, L. A. *et al.* Epífitas vasculares como indicadores de regeneración en bosques intervenidos de la amazônia Colombiana. **Acta Biológica Colombiana**, v. 8, n.2, p.31-42, 2003.

VAN DEN BERG, C. **Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae - Laeliinae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 1996.

VENTURA, G.M. *et al.* Organogênese in vitro a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, v. 47, p. 613-628, 2002.

VIIJ, S. P.; SOOD, A.; PLAHA, K. K.. Propagation of *Rhynchostylis retusa* Bl. (Orchidaceae) by direct organogenesis from leaf segment cultures. **Botanical Gazette** 145: 210– 214, 1984.

ZHAO, P.; WU, F.; FENG, F. S.; WANG, W. J. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 44:178–185, 2008.

2 CAPÍTULO I: TEORES DE AMIDO E PROTEÍNAS TOTAIS NA MORFOGÊNESE DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS A PARTIR DE BASES FOLIARES DE *Cattleya tigrina*

RESUMO - O sistema de propagação de orquídeas por sementes ou de forma vegetativa são processos normalmente muito lentos. A propagação por meio de técnicas de cultura de tecidos se mostra como alternativa promissora. Neste trabalho, bases foliares cultivadas em meio de cultura para indução e formação de ESP, foram utilizadas para quantificação de proteínas e amido durante 35 dias de cultivo, com coletas a cada sete dias, a partir da inoculação. Os teores mais baixos de proteína foram observados no tempo zero ($4,50 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$) e sete ($18,67 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$) dias de cultivo e não diferiram estatisticamente entre si. No 14º e 21º dias de cultivo, observou-se um incremento nas concentrações de proteínas totais ($106,2 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$), seguido por um decréscimo deste conteúdo no 28º e 35º dias ($73,8$ e $35,3 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$). Os teores mais elevados de proteínas coincidem com a elevada proliferação de ESPs, enquanto o decréscimo ocorre concomitantemente com a redução da divisão celular e aumento do volume das células, o que sugere o papel das mesmas para suprir a demanda de proteínas durante o processo de divisão celular. O maior teor de amido foi observado aos 14 dias de cultivo ($3901,5 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$) coincidindo com o início da formação das ESPs. O posterior decréscimo do teor de amido aconteceu no 35º dia ($2099,8 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$) e pode estar provavelmente relacionado com a degradação deste composto para o suprimento energético durante a manutenção do crescimento celular.

ABSTRACT - The orchid propagation system by seeds or vegetatively are usually a very slow process. Propagation techniques using a tissue culture is a promising alternative. In this work, cultivated leaf explants cultivated among the induction and formation of ESP were used as a protein and starch quantification, during a 35 days cultivation, sampling every seven days, starting from time zero. The protein content at cultivation day zero and cultivation day seven were low and did not differ statistically. At 14th and 21st days of cultivation, there was an increase in the total protein concentrations, reaching $106,2 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$, followed by a decrease in its content in the 28th and 35th days (73.8 and $35.3 \text{ mg.g}^{-1}\text{MF}$). The protein synthesis peak coincides with the elevated PLB proliferation, as the decreasing occurs concomitant with a cell division reduction and cell volume increasing, suggesting the role of them to meet the demand at the cell division process. The starch content reached its highest value at 14 days of cultivation ($3901,5 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$) coinciding with the beginning of PLB formation. The followed decreasing in the starch content happended at the 35th day ($2099,8 \mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$) and may probably be related to the degradation of this compound for the cell growth maintenance.

2.1 INTRODUÇÃO

Cattleya tigrina A. Richard, anteriormente conhecida como *Cattleya guttata*, é endêmica dos biomas Mata Atlântica e Pampa, habitando trechos de matas ribeirinhas, caracterizados pela alta umidade. Esta espécie está listada como vulnerável à extinção no Livro Vermelho da Flora do Brasil (MMA, 2013) e, apesar do grande valor ornamental, não existem protocolos de clonagem publicados até o momento.

Na natureza, o sistema de propagação de orquídeas ocorre por sementes e vegetativamente pela segmentação de rizomas ou de brotações. As sementes apresentam embrião diminuto tendo a necessidade da associação com fungos micorrízicos para a sua germinação no meio natural, e por propagação vegetativa são poucas as brotações e a multiplicação é muito lenta.

A propagação pelo sistema *in vitro* tem se apresentado como uma boa alternativa para sua propagação massal. Bases foliares cultivadas *in vitro*, na presença de hormônios como auxinas e citocininas, são capazes de formar ESP (GEORGE *et al.*, 2008; GANTAIT & SINIAH, 2012; FRITSCH, 2012). Além das alterações morfológicas deste processo, ocorrem mudanças na síntese de substâncias que são importantes sinalizadoras e/ou reservas para a completa formação de uma plântula.

Proteínas e amido são sintetizados após as primeiras divisões mitóticas, sendo que as proteínas são depositadas em corpos proteicos, que são as organelas de deposição das proteínas de reservas, e os carboidratos são convertidos a amido ou componentes de parede celular (BEWLEY & BLACK, 1994).

Estudos tem mostrado similaridades na morfogênese *in vitro* quanto aos aspectos bioquímicos, como os observados por Fehér *et al.* (2003). Mesmo assim, ocorrem diferenças metabólicas, tais como a falta de retomada de desenvolvimento de embriões somáticos e a ineficiente conversão de carboidratos a lipídios e proteínas de reserva (MERKLE *et al.*, 1995).

Segundo Goldberg *et al.* (1994), o acúmulo de proteínas é resultado da expressão de genes específicos durante a ontogênese da embriogênese somática, e fornece aminoácidos livres durante o metabolismo basal da célula, que podem ser usados no próprio desenvolvimento embrionário ou na retomada do crescimento e

desenvolvimento até a formação de plantas autotróficas (PREWEIN *et al.*, 2006).

A histodiferenciação no processo morfogênético *in vitro* está associada às alterações na síntese e mobilização de proteína e carboidratos. Os níveis destas substâncias agem tanto na cascata de transdução de sinal, como podem servir de substrato para a respiração que leva a indução e diferenciação celular (LÜLSDORF *et al.*, 1992).

Os efeitos do teor total de proteínas nos processos morfogênicos não estão completamente elucidados, porém, na literatura é mostrado que as proteínas podem regular o alongamento e a expansão das células, bem como, a manutenção de características biofísicas necessárias para a morfogênese (JIMÉNEZ, 2001).

Geralmente, embriões somáticos apresentam altos teores de amido e proteínas (ATTREE *et al.*, 1992), em sementes, o acúmulo dessas substâncias na fase de maturação do embrião é fundamental para torná-lo metabolicamente quiescente e tolerante à dessecação (BAUD *et al.*, 2002).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo mostrar os teores de proteína e amido na morfogênese de ESPs em bases foliares de *Cattleya tigrina* (Orchidaceae) cultivadas *in vitro*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material Vegetal

Brotações de *Cattleya tigrina* mantidas *in vitro* desde o ano de 2010 foram multiplicadas através de sucessivos subcultivos de estruturas semelhantes à protocormos (ESP), em meio de cultura, constituído pela formulação salina de MS, desprovido de reguladores de crescimento, de acordo com a metodologia descrita por Fritsche (2012). Explantes foliares obtidos a partir das brotações foram empregados como material inicial para implantação dos experimentos de indução de ESP e assim efetuar as análises bioquímicas e morfo-anatômicas.

A fase de multiplicação de plantas e indução de ESPs foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do Centro de Ciências Agrárias (CCA).

O meio de cultura básico utilizado para indução de ESPs, no presente estudo, foi constituído pela formulação salina de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificada com metade das concentrações salinas adicionado de peptona de soja ($0,001 \text{ mg.L}^{-1}$), NaH_2PO_4 (170 mg.L^{-1}) e vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), sacarose 20 g.L^{-1} e suplementado com TDZ ($9 \mu\text{M}$) doravante denominado meio MS modificado (MSBM).

Os segmentos foliares foram colocados com a face abaxial em contato ao meio de cultura, em frascos de vidro com capacidade de 300ml, contendo 25 ml de meio de cultura. Foram colocados 16 explantes foliares em cada frasco, os quais foram selados com filme plástico e mantidos em sala de crescimento aclimatizada, com temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa de $50\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

2.2.2 Análise estrutural de ESPs em Microscopia Óptica (MO)

Para o estudo histológico, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, por 12 horas (SCHMIDT *et al.*, 2010). Após a fixação, as amostras foram lavadas e desidratadas em série etílica gradual a cada 30 minutos (30, 50 e 70%) sendo conservadas em etanol 70% (RUZIN, 1999). Posteriormente, as amostras foram desidratadas até etanol 96% e infiltradas em historesina (Leica® Historesin, Heidelberg, Alemanha). Os blocos contendo o material foram seccionados de 4 a $5 \mu\text{m}$ de espessura, em micrótomo de rotação *Slee Cut* 4055 (Mainz, Alemanha), e as secções foram distendidas sobre lâminas contendo água, em chapa aquecedora (42°C). Depois da secagem das lâminas, o material foi corado com azul de toluidina em tampão fosfato 0,2M e pH 6,8 (O'BRIEN *et al.*, 1965). As observações e registros foram realizados em Microscópio Olympus BX40, com sistema de captura de imagens Olympus modelo DP71, e software Image Q Capture Pro 5.1 (QImaging Corporation, Austin, TX, USA), no LFDGV – UFSC.

2.2.3 Análises Bioquímicas

Amostras representativas do material cultivado *in vitro* foram coletadas ao zero, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo. A obtenção dos teores de proteína e amido foi realizada no Laboratório de

Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis.

2.2.4 Determinação do Conteúdo de Proteínas Totais

Seis amostras de 300 mg de material vegetal, de cada tempo de coleta, foram maceradas à temperatura de 4°C com tampão de extração, composto de 50 mL.L⁻¹ de fosfato de sódio dibásico (pH 7,0), 1,5% de b-mercapetanol (v/v), 0,5% de SDS (dodecil sulfato de sódio) (p/v) e 1 mM de PMSF. Estas amostras foram maceradas e centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante e o precipitado foram separados, sendo o último novamente armazenado a 20°C para posterior utilização. As proteínas totais, presentes no sobrenadante, foram precipitadas com a adição de dois volumes de álcool etílico absoluto para cada volume de sobrenadante e, em seguida, as amostras foram armazenadas a 0°C por 15 min. Após este período as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) com as modificações de Read e Northcote (1981), e com a utilização de albumina de soro bovino como padrão.

2.2.5 Determinação do Conteúdo de Amido

A extração e a determinação do conteúdo de amido total foram realizadas através do método de McCready *et al.* (1950). Os precipitados das amostras utilizadas para a extração de proteínas foram acrescidos de 2 mL de solução MCA (metanol:clorofórmio:água) na proporção de 12:5:3 e centrifugados durante 10 minutos a 2000 rpm. Após uma segunda centrifugação com 2 mL de MCA, o sobrenadante foi descartado e usou-se o precipitado para a quantificação de amido.

Adicionou-se ao precipitado 1 mL de álcool etílico 80%, aquecido a 50-60°C, para eliminação do conteúdo de açúcares solúveis totais ainda presentes nas amostras. Após centrifugação por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a extração do amido foi iniciada a partir do precipitado. O precipitado foi então acrescido de 1 mL de ácido perclórico 30% e centrifugado a 10000 rpm, por 15 minutos. Alíquotas

de 1 mL das amostras foram adicionadas em 2mL de antrona 0,2%. Em seguida, as soluções foram agitadas e aquecidas em água fervente, por três minutos. Após resfriamento, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 620 nm. Como padrão foi utilizado glicose (Sigma® G 8270) diluída em ácido perclórico 30%.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas, os tempos de coletas foram considerados tratamentos, os quais apresentavam seis repetições cada. Cada repetição foi representada por uma amostra de 300mg, analisada em duplicata no momento da leitura em espectrofotômetro. As médias dos teores de amido e proteínas foram submetidas à análise da variância (ANOVA), e quando necessário realizou-se comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de significância por meio do Software livre R.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Aspectos histológicos na indução e formação de ESPs

Explantos foliares (Figura 2A) usados para implantação do experimento de indução de ESP em *C. tigrina* podem ser observados em cortes transversais nas figuras 2B e 2C. Evidências de desenvolvimento de ESP (Figura 2D) foram observadas aos sete dias de cultivo, na porção basal da face abaxial foliar corroborando com os resultados obtidos por Liz (2013). Cortes transversais do explante podem ser observados da Figura 2E.

Aos 14 dias de cultivo *in vitro* foi observado ESP com aspecto globular bem definido e coloração translúcida (Figura 2F) na porção basal da face adaxial da folha. Segundo Firoozabady e Moy (2004), a região basal da folha pode responder melhor ao processo de embriogênese e/ou organogênese que a região mediana e apical da folha, pois está mais próxima do meristema axilar, podendo conter tanto regiões meristemáticas, quanto tecidos recém-formados, com expressiva atividade metabólica. Os meristemas e os tecidos recém-originados na parte aérea das plantas tem elevada síntese de auxinas (TAIZ & ZEIGER, 2009), e, portanto, tais níveis endógenos dos tecidos foliares próximos aos meristemas axilares em *C. tigrina* devem fundamentar a maior atividade morfogênica na diferenciação de ESP.

A região basal da folha de *C. tigrina* resulta na maior porcentagem de formação de ESPs quando comparada à região mediana e apical das folhas (FRITSCH, 2012). Este autor também observou que todos os explantes que apresentaram a formação de ESPs na região mediana ou apical, também apresentavam indução na região basal da folha, e em geral mais pronunciada.

Em *Dendrobium* também foi observado que a porção basal da folha apresentava maior capacidade de formar diretamente embriões somáticos, e que, ocasionalmente, ocorria a formação a partir dos ápices das folhas (CHUNG *et al.*, 2007). No entanto, em *Oncidium*, Chen *et al.* (1999) e Chen & Chang (2001), observaram que nos ápices das folhas havia maior capacidade de formar ESP, cujos autores consideraram serem embriões somáticos.

No presente estudo, o início da diferenciação celular e formação dos tecidos componentes das ESP ocorreram aos sete dias de cultivo (Figura 2E). A histodiferenciação das bases foliares, com formação de protuberâncias teve início a partir das células epidérmicas da folha, através de sucessivas divisões pericplinais destas células e posteriores divisões nos planos anticlinal e periclinal, no 14º dia de cultivo (Figura 2G). Neste período observa-se também a ocorrência de divisões mitóticas múltiplas e que resultam na formação das ESP (Figura 2H). Liz (2013), também observou a diferenciação dos tecidos na primeira semana de cultivo, com formação mais evidente das ESP após duas semanas, quando as células epidérmicas começaram a sofrer divisões mitóticas para formação das ESPs.

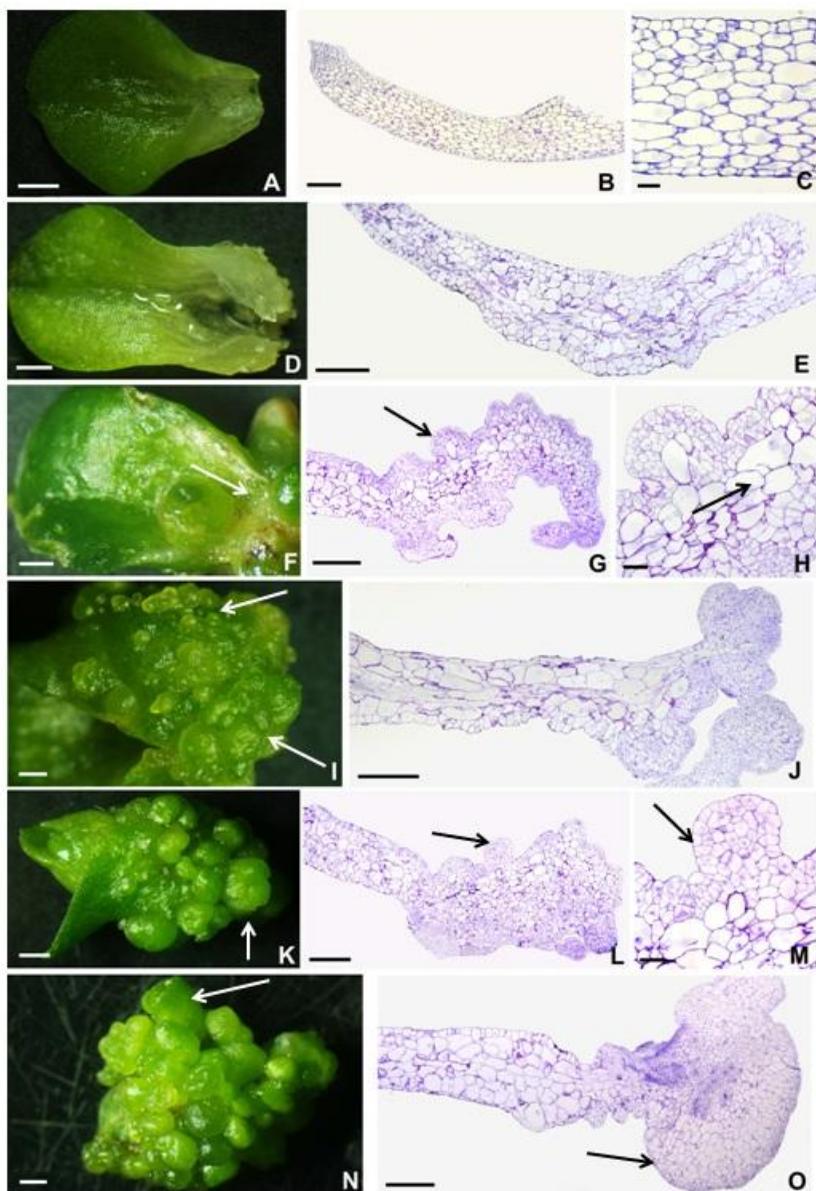
A maior proliferação de ESP foi observada aos 21 dias de cultivo, com estruturas em forma de *clusters* (Figura 2I). Neste período, observou-se um aumento no volume celular, e a formação contínua de novas ESP (Figura 2J). Aos 28 dias de cultivo, algumas ESPs mostraram-se muito mais volumosas que no 7º dia, e com coloração verde-escura (Figura 2K). Segundo Liz (2013), o maior volume das ESPs é determinado não apenas pela proliferação das células do corpo, mas também pela formação secundária de novas ESPs, a partir das células da túnica da ESP inicial, tal como observado nas Figuras 2L e 2M. Este sistema de proliferação caracteriza-se pela forma repetitiva de formação de ESP secundárias, como pode ser observado aos 35 dias de cultivo (Figura 2N e 2O).

Zhao *et al.* (2008) relataram que a maioria das ESPs podem proliferar-se para produzir ESPs secundárias, as quais originam-se a partir das células interiores ou exteriores do calo embriogênico. Chen e Chang (2006) observaram, após a formação de embriões somáticos diretamente de explantes foliares, a produção contínua de embriões, através de embriogênese secundária. Constatando, ao mesmo tempo, embriões desenvolvendo-se em ESPs e embriões secundários no início da formação, revelando ser de proliferação assincrônica.

Liz (2013) observou em *C. tigrina*, a formação de ESPs a partir de células epidérmicas, e constatou a presença de estruturas com túnica e corpo, desde fases muito iniciais. A autora sugere que a regeneração de ESPs de *C. tigrina* não pode ser descrita como embriogênese somática, pois não observou estádios morfológicos similares aos observados na embriogênese zigótica.

Figura 2 - Aspectos histológicos da indução de estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) a partir de explantes foliares de *Cattleya tigrina* A. Rich, cultivados em meio de cultra MS básico modificado (MSBM).

A- Vista geral da face adaxial da folha utilizada como fonte de explantes. B-C- Secção transversal da folha utilizada como explante. D- Entumescimento da região basal após sete dias. E - Secção transversal da folha com a multiplicação celular após 7 dias. F- No 14º dia de cultivo, início da formação de ESPs (seta). G- Secção transversal da folha com organização de estruturas globulares revelando intensa atividade mitótica na epiderme (seta) no 14º dia de cultivo. H- células do mesófilo bastante vacuoladas (seta). I- Indução e multiplicação de ESP; J – Estruturas globulares em proliferação. L – Seta indica camada eriférica de células meristemáticas (túnica) delimitando um maciço de células meristemáticas (corpo). M – Células do mesófilo adjacente ao ESP são amplas e detalhe da região apical de uma ESP em secção longitudinal, com evidências de atividade mitótica na epiderme (setas), indicando formação de ESP secundárias. N – Proliferação múltipla de ESP. O - ESP em secção longitudinal Barras: A, D, F, I, K, N– 1 mm; B, E, G, J, L, O – 500 µm; C, H, M – 100 µm;



2.4.2 Conteúdo de amido e proteínas totais

O teor de proteína aos zero ($4,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$) e sete dias de cultivo ($18,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$) foi baixo, e não diferiu estatisticamente (Figura 3). No 14° e 21° dias de cultivo, houve incremento nas concentrações de proteínas totais, chegando a $106,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$, seguido por um decréscimo deste conteúdo no 28° e 35° dias ($73,8$ e $35,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$). A fase inicial de formação de ESPs é caracterizada pelo estabelecimento da polaridade e individualização da estrutura, o que implica no aumento da síntese e consumo de proteínas.

De acordo com Gallardo *et al.* (2003), durante os estádios iniciais muitas proteínas são expressas continuamente para suprir a demanda do processo de divisão celular, e atuam neste momento, na separação dos cromossomos e organelas (mitose), e na reativação do ciclo celular (CASTRO *et al.*, 2001). Em ESPs de *Phalaenopsis*, Lee *et al.* (2013) observaram após as primeiras divisões celulares, a substituição gradual dos grandes vacúolos por vários vacúolos pequenos com depósito de proteína. A presença desses depósitos na célula é transitória, e desaparecem com o avanço do desenvolvimento das ESP.

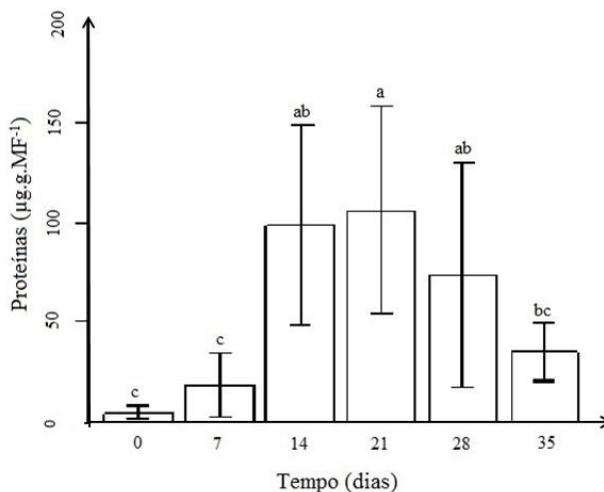
Neste contexto, a presença de citoplasma compacto e ativo, é típico de células em multiplicação e divisão celular, devido à maior concentração de componentes protéicos e intensa produção de organelas celulares (RESCAROLLI, 2011).

Os resultados no presente estudo mostram que o decréscimo no conteúdo de proteínas (Figura 3), ocorre concomitantemente com a redução da divisão celular e aumento do volume das células (Figura 2K e 2N). Observaram-se aos 21 dias de cultivo, o aumento do volume das ESPs (Figura 4D) e o alongamento das ESPs com aparecimento de pequenas cúpulas de meristema apical (Figura 4G; H; I). Nesta etapa, as proteínas estão de maneira geral, associadas ao metabolismo de carboidratos, síntese de parede celular e maturação dos embriões, o qual inclui o acúmulo de compostos de reserva (VON ARNOLD, 2002; CARNEY & PULLMAN, 2007).

Na embriogênese somática, o aspecto das estruturas pode caracterizar o nível de diferenciação celular. Embriões somáticos maduros translúcidos, por exemplo, podem refletir uma deficiência no conteúdo de substâncias de reserva, como amido e proteínas, enquanto o

aspecto opaco aponta acúmulo destes compostos (BEWLEY & BLACK, 1994). No presente trabalho foi possível observar as ESP no início da formação com aspecto translúcido (Figura 4D), e, que, adquirem coloração verde escura com o avanço do desenvolvimento (Figura 4F).

Figura 3 - Teores de proteínas totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$) durante a indução de ESPs de *Cattleya tigrina* A. Rich em relação ao tempo (dias) de cultivo em meio de cultura MS básico modificado (MSBM). Média de 6 repetições. Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa segundo o teste Tukey (5%).



Embora não estudado no presente trabalho, Boon *et al.* (2013), através de análise proteômica de calos de *Vanilla planifolia* observaram que, proteínas de resposta ao estresse foram o grupo com maior expressão durante a formação de calos. Essas proteínas têm sido frequentemente observadas em células e tecidos (CORREIA *et al.*, 2012). Além da função de proteção da célula, podem ter outras funções no processo de diferenciação celular. Provavelmente a prevalência destas proteínas esteja relacionada com as condições durante o cultivo *in vitro* (SHARIFI *et al.* 2012).

O segundo grupo de proteínas que se destacou nos estudos de Boon *et al.* (2013), foram àquelas envolvidas nos processos metabólicos. Para se adaptar as novas condições, as células vegetais

alteram a expressão gênica e reorganizam vias metabólicas e processos fisiológicos (RODE *et al.*, 2012). O aumento das proteínas envolvidas no metabolismo energético durante a morfogênese de calos, provavelmente é decorrente da demanda energética causada pelo rápido crescimento e divisão celular (LYNGVED *et al.*, 2008). Winkelmann *et al.* (2006) sugerem que a abundância de proteínas envolvidas em processos metabólicos pode ser induzida pela sacarose exógena fornecida no meio de cultura em *Cyclamen persicum* Mill.

Grupos de proteínas relacionadas à síntese de outras proteínas também são comuns em células com alta atividade mitótica (BOON *et al.*, 2013). As alterações fisiológicas e metabólicas durante a reprogramação das células requerem a produção e estabilização de proteínas recém-sintetizadas (CORREIA *et al.*, 2012). Tais alterações são necessárias para o estabelecimento de um novo fenótipo celular (SHARIFI *et al.*, 2012). Na indução de embriogênese somática em *Crocus sativus* L., Sharifi *et al.* (2012) observaram que a síntese e o processamento de proteína são necessários para a transição do crescimento somático para embriogênico. Poobathy *et al.* (2013), observaram valores baixos de proteínas totais em ESPs de *Dendrobium*, os quais diminuíram significativamente após tratamento de criopreservação.

Em estudos com calos embriogênicos e organogênicos de *Vanilla planifolia*, Palama *et al.* (2010) observaram a síntese de proteínas de resposta ao estresse, proteínas relacionadas aos processos metabólicos, proteínas relacionadas à síntese de outras e um grupo relacionado à atividade fotossintética. Embora a quantificação de proteínas totais possibilite identificar pontos chave, como início da divisão celular e formação de ESPs, para investigar os perfis proteicos e suas mudanças ao longo da formação das ESPs, é necessário realizar estudos futuros com uma abordagem proteômica.

Da mesma forma, pode-se associar a síntese e acúmulo de amido e o desenvolvimento de ESPs. No presente trabalho os teores de amido nos diferentes estádios da morfogênese diferiram significativamente, e o maior teor de amido ($3901,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$), foi observado aos 14 dias de cultivo (Figura 5), período correspondente ao início da formação das ESP (Figura 4D). Posteriormente houve um pequeno decréscimo, e aos 35 dias (Figura 4F), o teor de amido (2099,8

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$) não diferiu estatisticamente do inóculo inicial ($1608,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$). A degradação do amido armazenado nas ESPs pode estar relacionada com a manutenção do crescimento celular. De acordo com Martin *et al.* (2000), faz-se imprescindível uma grande quantidade de carbono, a fim de fornecer o ATP necessário para manutenção do metabolismo durante a divisão celular. Além disso, em células adjacentes ao meristema, o amido pode atuar como um “tampão” de carbono, controlando a demanda por esqueletos carbônicos e a importação de carbonos na forma de sacarose (SMITH *et al.*, 2003).

Figura 4 - Estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) a partir de explantes foliares de *Cattleya tigrina* A. Rich. Cultivadas em meio de cultura MS básico modificado (MSBM). A- Explante inicial. B- 7 dias após inoculação, formação de estruturas isoladas na porção basal da folha. C - 14 dias após inoculação, formação de estrutura globular bem definida na porção basal da folha. D - 21 dias após inoculação, formação de estruturas semelhantes à protocormos nas faces adaxial e abaxial do explante. E - 28 dias após inoculação, estruturas maiores com coloração verde-escura e estruturas recém-formadas com coloração translúcida. F - 35 dias após inoculação, ESPs iniciando alongamento. G - 49 dias após inoculação, ESPs mais alongadas e formação de ESPs na porção apical da folha. H - 63 dias após inoculação, ESPs em estágio avançado de alongamento, com início da formação de brotos. I- 98 dias após inoculação, ESPs alongadas com meristema apical pronunciado. Barras: 2mm.



O baixo teor de amido na fase final de desenvolvimento das ESPs, também pode estar relacionado com a manutenção do potencial osmótico do meio de cultura durante todo o processo de indução. Na natureza, a desidratação é um requerimento para a maturação do embrião de muitas espécies (OOMS *et al.*, 1994). Em trabalhos realizados com culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis*, Santa-Catarina (2001) e Olmedo (2005) observaram que, com a redução do potencial osmótico do meio de cultura, promoveu um incremento em matéria fresca e acúmulo de substâncias de reserva, como amido.

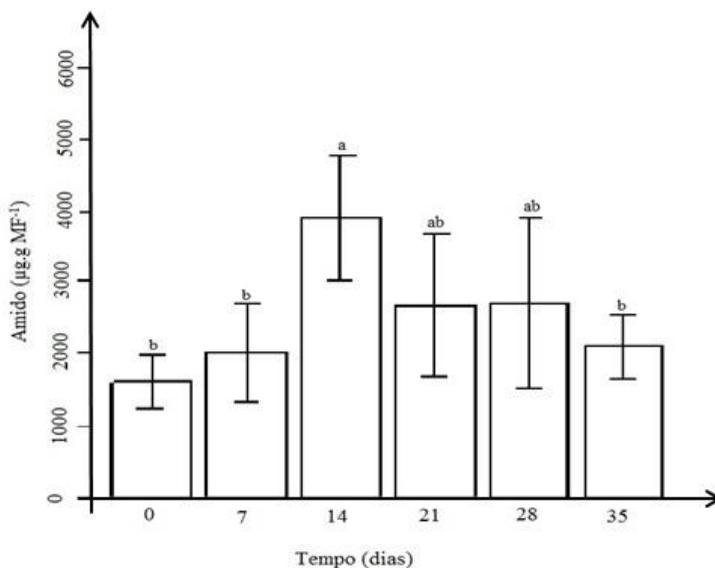
Em embriões maduros de *Paphiopedilum*, Lee *et al.* (2006), observaram compostos de reserva depositados sob a forma de lípidos e proteínas no citoplasma das células, com ausência de grânulos de amido. Este composto de reserva foi observado apenas na fase globular precoce do embrião. Martin *et al.* (2000) reportaram que o conteúdo de amido foi uma característica que distinguiu calos embriogênicos dos não embriogênicos de *Medicago arborea*. Nesta espécie, o baixo conteúdo de amido foi observado em culturas embriogênicas, em contraste com as culturas não embriogênicas. Nas fases iniciais do desenvolvimento de embriões de *Cypripedium*, Lee *et al.* (2005), observaram que o amido foi o primeiro produto a acumular-se dentro do embrião, contudo, na fase madura, apenas proteínas e lípidos foram encontrados. Em calos de *Nicotiana tabacum*, Thorpe e Murashige (1968) observaram um acúmulo de amido especialmente nas células envolvidas na formação dos primórdios caulinares, sugerindo que o acúmulo de amido é um pré-requisito para a regeneração adventícia de brotações.

A presença de sacarose no meio de cultura pode estar ligada ao controle da síntese de proteínas e amido (IRAQI & TRAMBLAY, 2001). Estes autores verificaram que ocorreu maior acúmulo de amido e proteínas durante a maturação de embriões somáticos em *Picea*, em meio de cultura contendo sacarose. Durante esse mesmo estágio de desenvolvimento o conteúdo de proteínas se manteve constante, enquanto houve redução significativa no teor de amido em meio contendo glicose e frutose. Isso ocorre em função da atividade das invertases na hidrólise da sacarose, e pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do embrião.

Em conclusão, no presente trabalho foi observado que a elevação nos teores de proteínas totais e amido no 14º e 21º dia de

cultivo, pode estar relacionada com a demanda destes compostos no processo de divisão celular. O baixo acúmulo no 28° e 35° dia sugere a degradação destes compostos para manutenção do crescimento celular, e também pode estar associado às condições de cultivo *in vitro*.

Figura 5 - Teores de amido ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) aos zero, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo de *Cattleya tigrina* A. Rich, em meio de cultura MS básico modificado (MSBM). Média de 6 repetições. Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa segundo o teste Tukey (5%).



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTREE, S. M.; POMEROY, M. K.; FOWKE, L. C. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. **Planta** 187: 395 – 404, 1992.

BAUD, S.; BOUTIN, J.P.; MIQUEL, M.; LEPINIEC, L.; ROCHAT, C. 2002. An integreed overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiol. Biochem.**, 40: 151-160, 2002.

BEWLEY, J.D.; BLACK., M. Seeds: Physiology of development and germination. 2 ed. New York: **Plenum Press**, 445 p., 1994.

BOON *et al.* Proteomic Analysis of Callus Development in *Vanilla planifolia* Andrews. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, Issue 6 , pp 1220-1229, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

CAIRNEY, J.; PULLMAN, G. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. **New Phytologist** 176:511-536, 2007.

CASTRO, A.; PETER, M.; LORCA, T.; MANDART, E. c-Mos and cyclin B/cdc2 connections during *Xenopus* oocyte maturation. **Biology of the Cell** 93: 15-25, 2001.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. **Plant Biology** 50:169–173, 2006.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’. **Plant Growth Regulator** 34:229–232, 2001.

CHEN, J. T.; CHANG, C.; CHANG, W. C. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium Gower Ramsey* and subsequent plant regeneration. **Plant Cell Reports** 19:143–149, 1999.

CHUNG, H-H.; CHEN, J-T.; CHANG, W-C.. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. **Biologia plantarum**, v. 51, n. 2, p. 346-350, 2007.

CORREIA, S.; VINHAS, R.; MANADAS, B.; LOURENCO, A. S.; VERÍSSIMO, P.; CANHOTO, J. M. Comparative proteomic analysis of auxin-induced embryogenic and nonembryogenic tissue of the Solanaceous tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). **Journal of Proteome Research** 11:1666–1675, 2012.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. N. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 74:201-207, 2003.

FIROOZABADY, E.; MOY, Y. Efficient regeneration of pineapple via somatic embryogenesis and organogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** 40: 67–74, 2004.

FRITSCHÉ, Y. **Regeneração de estruturas semelhantes à protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas**. Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

GALLARDO, K.; SIGNOR, C.; VANDEKERCKHOVE, J. I.; THOMPSON, R. D.; BURSTIN, J. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. **Plant Physiol.** 133:664–682, 2003.

GOLDBERG, R.B.; PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science**, v. 266, p. 605 – 614, 1994.

IRAQI, D.; TREMBLAY, F.M. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose

in embryo development. **Journal of Experimental Botany**, 365(52):2301-2311, 2001.

JIMÉNEZ, V.M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.196-223, 2001.

LEE, Y.-I.; HSU, S.-T.; YEUNG, E.C. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos. **American Journal of Botany**, 100 (11), pp. 2121-2131, 2013.

LEE, Y.I.; YEUNG, E.C.; LEE, N.; CHUNG, M. C. Embryo development in the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii* with emphases on the ultrastructure of the suspensor. **Ann. Bot.** 98: 1311-1319, 2006.

LEE, Y.I.; YEUNG, E.C.; LEE, N.; CHUNG, M. C. Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination in vitro. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 130747–753, 2005.

LIZ, R. D. **Elucidação da morfo-histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) de espécies de *Cattleya lindl.* Micropropagadas.** Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

LULSDORF, M.M.; TAUTORUS, T.E.; KIKCIO, S.I.; DUNSTAN, D.I. Growth parameters of embryogenic suspension cultures of interior spruce (*Picea glaucaengelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). **Plant Science**, v. 82, p. 227 - 234, 1992.

LYNGVED, R.; RENAUT, J.; HAUSMAN, J. F.; IVERSEN, T. H.; HVOSLEF-EIDE, A. K. Embryo specific proteins in *Cyclamen persicum* analyzed with 2-D DIGE. **J Plant Growth Reg** 27:353–369, 2008.

MARTIN, A.B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGU, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, v. 154, p. 143 – 151, 2000.

MCCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V.E.; OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry**, v. 22, p. 1156 – 1158, 1950.

MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in plants. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, Cap. 5, p. 155 – 203, 1995.

MOREL, G.; WETMORE, R. Fern callus tissue culture. *Am. American Journal of Botany* 38,141-143, 1951.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, vol. 15, p. 473-497, 1962.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma** 59: 368-373, 1965.

OLMEDO, A.S. **Caracterização do Crescimento e Parâmetros Bioquímicos em Culturas Embrionárias de *Ocotea catharinensis* (Mez.) Lauraceae**, Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, UFSC, 2005.

OOMS, J.J.J.; VAN DER VEEN, R.; KARSSSEN, C.M. Abscisic acid and osmotic stress or slow drying independently induce desiccation tolerance in mutant seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, 92:506-510. 1994.

PALAMA T. L.; MENARD P.; FOCK I.; CHOI Y. H.; BOURDON E.; GOVINDEN-SOULANGE J.; et al. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage *BMC Plant Biol.*, pp. 82–99, 2010.

POOBATHY, R.; SINNIHAH, U. R.; XAVIER, R.; SUBRAMANIAM S. Catalase and Superoxide Dismutase Activities and the Total Protein Content of Protocorm-Like Bodies of *Dendrobium Sonia-28* Subjected to Vitrification. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Vol.170, 5:1066-1079, 2013.

PREWEIN, C.; ENDEMANN, M.; REINÖHL, V.; SALAJ, J.; SUNDERLIKOVA, V.; WIHELM, E. Physiological and morphological characteristics during development of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) zygotic embryos. **Trees**, v. 20, p. 53 – 60, 2006.

READ, S.M.; NORTHCOTE, D.H. Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v. 116, p. 53 – 64, 1981.

RESCAROLLI, C. L. S. **Embriogênese secundária, caracterização bioquímica e histoquímica de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* (Mez.) (Lauraceae)**. Dissertação (Mestre em Biologia Vegetal). Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

RODE, C.; LINDHORST, K.; BRAUN, H.; WINKELMANN, T. From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. **Planta** 235:995–1011, 2012.

RUZIN, S.E. *Plant Microtechnique and Microscopy*. New York: **Oxford University Press.**, 1999.

SANTA-CATARINA, C. **Crescimento in vitro e caracterização bioquímica, morfológica e histoquímica de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae)**. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

SCHMIDT, E. C.; SANTOS, R.; HORTA, P. A.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. **Micron**, 41: 919-930, 2010.

SHARIFI, G.; EBRAHIMZADEH, H.; GHAREYAZIE, B.; GHARECHAHI, J.; VATANKHAH, E. Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). **Proteome Science** 10:3, 2012.

SMITH, D. L.; WOODMAN, B.; MAHAL, A. *et al.* Minocycline and doxycycline are not beneficial in a model of Huntington's disease **Ann. Neurol**, pp. 1531–8249, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

THORPE, T.A. E MURASHIGE, T. Starch accumulation in shoot-forming tobacco callus cultures. **Science** 160: 421-422, 1968.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZKOV, P.; DYACHOK, J.; FILANOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 69: 233–249, 2002.

WINKELMANN, T.; HEINTZ, D.; VAN DORSSELAER, A.; SEREK, M.; BRAUN, H. P. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. **Planta** 224:508–519, 2006.

ZHAO, P.; WU, F.; FENG, F. S.; WANG, W. J. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 44:178–185, 2008.

3 CAPÍTULO II: POLIAMINAS LIVRES NA MORFOGÊNESE DE ESPs EM BASES FOLIARES DE *C. TIGRINA*.

RESUMO - As poliaminas (PA) livres estão envolvidas em vários processos fisiológicos relativos ao crescimento e desenvolvimento das plantas, entre eles, a estimulação da divisão e a diferenciação celular. O objetivo deste trabalho foi quantificar os teores de PAs totais e Put, Spd e Spm a partir de ESP de *Cattleya tigrina* A. Rich. Bases foliares foram cultivadas em meio de cultura básico modificado (MSBM) para a indução de ESPs. Para a quantificação de PAs totais, de Put, Spd e Spm foram utilizadas culturas no tempo zero, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo. Os teores de PA totais atingiram valores máximos no 14º dia de cultivo *in vitro*, e mantiveram-se constantes até o 35º dia. O aumento nos teores de PA totais coincidiu com o início da formação de ESP isoladas na porção basal dos explantes foliares, em estudos histológicos observou-se que a permanência constante dos teores de poliaminas totais livres correspondeu ao período de alta divisão celular e aumento do volume das ESP. A putrescina (Put) foi a PA que apresentou teores mais elevados, sendo consideravelmente maior que os teores de espermidina (Spd) e espermina (Spm). Portanto, neste trabalho a Put parece exercer o papel principal na morfogênese de ESP em *C. tigrina*, enquanto que, Spm e Spd parecem exercer papel secundário ou estão envolvidas em processos posteriores de diferenciação, que não foram capturados neste estudo.

ABSTRACT - Polyamines (PA) are involved in various physiological processes related to growth and development of plants, including the stimulation of cell division and differentiation. In the present work, *Cattleya tigrina* A. Rich PLB obtained from *in vitro* grown leaf bases, were used for quantification of total PAs in zero, 7, 14, 21, 28 and 35 cultivation days. The PA levels reached its peak values on day 14th of *in vitro* cultivation, remained constant until the 35th day. The increasing in the total PA levels coincided with the start of isolated PLB formation in the leaf explants basal portion, and its constant period corresponded to the period of high PLB cell division and increasing volume. The putrescine (Put) was the PA that showed the highest levels, being considerably higher than the spermidine (Spd) and spermine (Spm) levels. Spd and especially Spm, seem to be more important than Put in later induction steps, being necessary during morphogenesis of somatic and zygotic embryos evolution. Therefore, in this work, Put seems to be the key in *C. tigrina* PLB morphogenesis, while Spd and Spm appear to play a secondary role or they are involved in later differentiation processes, which were not captured in this study.

3.1 INTRODUÇÃO

Cattleya tigrina A. Richard é uma espécie de hábito epífita, porém, eventualmente ocorre como rupícola. Seu período de floração ocorre em janeiro, época da alta temporada turística no litoral brasileiro, tornando-a alvo de coletas indiscriminadas (VENTURA et al., 2002). Estudos da fisiologia do desenvolvimento desta espécie são importantes, tanto pelo viés conservacionista quanto comercial. A compreensão dos eventos bioquímicos envolvidos na morfogênese de ESPs de *C. tigrina*, é necessária na otimização de protocolos para propagação massal.

Poliaminas (PA) livres são pequenas aminas alifáticas de baixo peso molecular, que são onipresentes em ambos os procariotas e eucariotas (COHEN, 1998; TIBURCIO *et al.*, 1997.) Espermidina (Spd), Espermina (Spm) e seu precursor Putrescina (Put) são as PAs mais comuns encontradas em plantas superiores (GALSTON, 1983; MARTIN-TANGUY, 2001). Estes compostos estão presentes na forma livre ou conjugada com outras substâncias de baixo peso molecular (por exemplo, ácidos fenólicos) ou macromoléculas (proteínas, nucleoproteínas), e, em alguns casos, também servem como precursores de metabolitos secundários (BAGNI & TASSONI, 2001).

As PA estão envolvidas em processos fisiológicos relativos ao crescimento e desenvolvimento das plantas, entre eles, estimulação da divisão e diferenciação celular, resposta a estresses ambientais, regulação da rizogênese, senescência, desenvolvimento floral e maturação dos frutos (EVANS & MALMBERG, 1989; KAKKAR & RAI, 1993; MINOCHA & MINOCHA, 1995; BOUCHEREAU *et al.*, 1999; HYVÖNEN *et al.*, 2006; KUZNETSOV *et al.*, 2007; BARON & STASOLLA, 2008; PEREMARTI *et al.*, 2009; ALCÁZAR *et al.*, 2010; LANDAU *et al.*, 2010; MATTOO *et al.*, 2010; MOHAPATRA *et al.*, 2010; QUINET *et al.*, 2010; VERA-SIRERA *et al.*, 2010).

Alguns estudos sugerem que as PA são importantes para a embriogênese somática, como em *Daucus carota* (MONTAGUE *et al.*, 1979), *Brassica campestris* (CHI *et al.*, 1994), *Oryza sativa* (BAJAJ & RAJAM, 1996), *Panax ginseng* (KEVERS *et al.*, 2000), *Gossypium hirsutum* (SAKHANOKHO *et al.*, 2005), *Ocotea catharinensis* (SANTA CATARINA *et al.*, 2004, 2007), *Araucaria angustifolia* (SILVEIRA *et al.*, 2006; STEINER *et al.*, 2007), *Coffea canephora*

(CLELIA *et al.*, 2008), *Citrus sinensis* (WU *et al.*, 2009) e *Momordica charantia* (PAUL *et al.*, 2009).

As PA têm um amplo espectro de ação, com algumas semelhanças com os fitormônios. Atuam principalmente como reguladores de processos, envolvendo expressão gênica, proliferação de células, formação da parede celular, etc (COHEN, 1998). No entanto, as PA são encontradas nas células em concentrações milimolares, ou seja, níveis significativamente mais elevados que os hormônios vegetais (BAIS & RAVISHANKAR, 2002). PA também estão envolvidas na transmissão de sinais celulares, pois regulam a síntese de óxido nítrico, que é conhecido como uma molécula sinalizadora na planta (BESSON-BARD *et al.*, 2008).

Além da embriogênese somática, o papel das PA durante o desenvolvimento *in vitro*, inclui a promoção ou a inibição da formação de gemas, o alongamento celular, o aumento da massa de calos e o enraizamento de plântulas (SCHOLTEN, 1998). Em *Dactylis glomerata* verificou-se níveis mais altos de PA totais em calos embriogênicos quando comparados com calos não embriogênicos. Como os teores de PA são muitas vezes elevados durante a divisão rápida de células meristemáticas, não é inesperado que ocorra um aumento desses teores durante a fase de indução de embriogênese somática, pois é nesta etapa que as células do meristema apical, que dão origem aos embriões, estão sendo formadas (LI & BURRIT, 2003).

Vários estudos têm mostrado maior concentração de Putrescina em culturas embriogênicas durante a multiplicação celular, e fica evidente sua importância nos eventos que precedem a diferenciação celular. Em *Pinus taeda* (SILVEIRA *et al.*, 2004) e *Picea rubens* (MINOCHA *et al.*, 2004), Putrescina foi a poliamina mais abundante e, nesta última verificou-se sua necessidade para o avanço da embriogênese somática. Ademais, em comparação com Spd e Spm, quantidades maiores de Put foram observadas durante a indução de embriogênese somática em *Charantia momordica*, onde esta PA mostrou ser um pré-requisito para divisão celular (PAUL *et al.*, 2009).

Assim, sugere-se que os perfis de PA podem ser utilizados como marcadores das alterações metabólicas ocorridas durante a morfogênese de culturas embriogênicas e não embriogênicas.

O objetivo deste trabalho é estudar a dinâmica das PA na morfogênese de ESP em bases foliares de *C. tigrina*, a fim de

correlacionar as mudanças morfológicas das estruturas com o padrão de síntese e acumulação destes compostos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

As fases de multiplicação de plantas e indução de ESPs foram descritas no Capítulo 1. A análise de poliaminas (PA) livres endógenas foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do Centro de Ciências Agrárias (CCA).

3.2.1 Análise de poliaminas endógenas livres

A determinação de PA foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Silveira *et al.* (2004). Seis amostras de 200 mg de massa fresca cada, 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 20.000 g por 20 min, a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de ácido perclórico 5%, centrifugado novamente e os dois sobrenadantes foram homogeneizados. A fração sobrenadante contém as PAs livres e conjugadas solúveis em ácido perclórico. As PAs livres foram em seguida dansiladas. Neste processo, 40 µL da amostra contendo PAs foram misturadas com 100 µL de cloreto de dansil (5 mg.mL⁻¹ em acetona), 50 µL de solução saturada de NaHCO₃ e 20 µL de 1,7-diaminoheptano (DAH) que foi utilizado como padrão interno. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min, a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 µL de prolina (100 mg.mL⁻¹) com posterior incubação por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, as PAs foram particionadas com 200 µL de tolueno. A fase apolar (tolueno) contendo as PAs foi coletada (175 µL), seca em centrífuga a vácuo, aquecida a 40°C, e ressuspenso em 175 µL de acetonitrila.

A identificação e quantificação das PA 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 a 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 com cloreto de

dansil. As áreas e tempos de retenção de cada PA foram avaliados por comparação com as PAs com concentrações conhecidas: Put, Spd, Spm e DAH (diaminoheptano) utilizado como padrão interno.

3.2.2 Análise estatística

Para as análises estatísticas, os tempos de coletas foram considerados tratamentos, os quais apresentam seis repetições cada. As médias dos teores de PAs totais, Put, Spd e Spm foram submetidas à análise da variância (ANOVA), e quando necessário realizou-se comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de significância por meio do Software livre R. Os dados são apresentados a partir da média e seu respectivo desvio padrão.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de PA totais não diferiram estatisticamente durante o período de indução de ESPs. Os maiores teores de PAs totais foram observados no 14º dia de cultivo *in vitro*, e a partir deste tempo, mantiveram-se constantes até o 35º dia (Figura 6A). De maneira similar ao observado com as PA totais, a relação [Put/(Spd+Spm)] durante a indução de ESPs também foi mais baixa no início do cultivo e entre o 14º e 35º dia resultaram em maiores teores (Figura 6B).

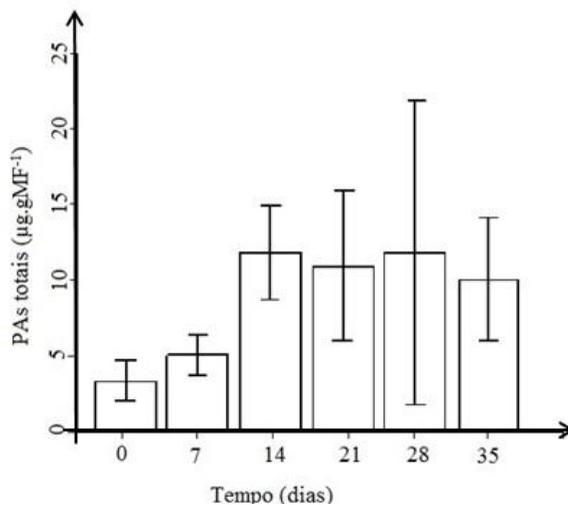
O aumento nos teores de PA totais coincidiu com o início da formação de ESP quando isoladas na porção basal dos explantes foliares (Figura 4C). A permanência constante dos teores de PA totais até o 35º dia de cultivo corresponde ao período de alta divisão celular e aumento do volume celular das ESP. Geralmente as PAs são detectadas em quantidades superiores em tecidos com diferenciação ativa e crescimento de plantas (WALLACE *et al.*, 2003). Na fase de indução de culturas embriogênicas de *Solanum melongena*, uma intensa proliferação celular foi detectada e associada com um aumento nos níveis de PAs (YADAV & RAJAM, 1997). Saiprasad *et al.* (2004) também observaram que putrescina foi a PA mais eficiente na formação de ESP em *Dendrobium*, e que, nos cultivos com adição de Spd ou de Spm obtiveram menores números de ESP em relação ao controle. No entanto, as PAs, Spd, Spm e Put induziram a formação direta de

embriões somáticos, sem a formação de calo em explantes foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume e *P. nebula* Bl., (GOW *et al.*, 2008).

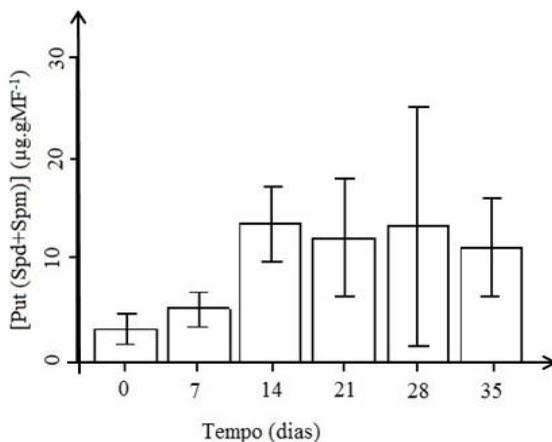
Figura 6 - Concentração média de: A) Poliaminas (PA) totais livres em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF e B) Razão de PA: Put (Spd+Spm)-1 em diferentes estágios de desenvolvimento de ESPs induzidas a partir de explantes foliares, cultivados em meio de cultura MS modificado (MSBM).

(média \pm desvio padrão). Média de seis repetições.

A

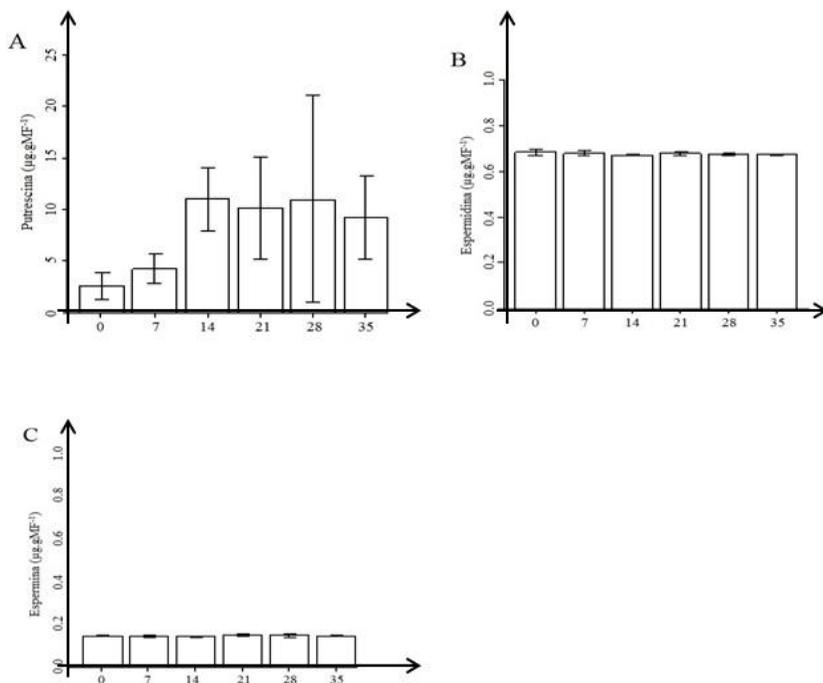


B



No presente trabalho, durante a indução de ESPs foi observado que a Put apresentou teores muito superiores, principalmente a partir do 14º dia de cultivo, quando comparados com os teores de Spd e Spm (Figura 7A). De tal forma, que, o acúmulo de PA totais, observado na figura 6, decorreu principalmente dos níveis de Put. De acordo com Bagni e Tassoni, (2001), Put e Spd são geralmente os PA mais abundantes nas plantas, enquanto Spm só está presente em pequenas quantidades. Alguns estudos indicam que o metabolismo da Put pode estar envolvido na competência de explantes para embriogênese somática em várias espécies de plantas. Em *Medicago sativa* tanto os seus níveis endógenos totais, quanto sua proporção com as outras poliaminas livres, parece ser fundamental para as fases iniciais da embriogênese somática (HUANG *et al.*, 2001), *Oryza sativa* (SHOEB *et al.*, 2001) e *P. ginseng* (MONTEIRO *et al.*, 2002). Contudo, suspensões celulares de *Pinus taeda* (SILVEIRA *et al.*, 2004) e calos de *Nicotiana tabacum* (RASTOGI & DAVIES, 2000) , os elevados níveis de Put endógena foram associados com a redução do crescimento celular.

Figura 7 - Concentração média de: A) Putrescina em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$; B) Espermidina em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$; C) Espermina em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$ em diferentes estágios de desenvolvimento de ESPs induzidos a partir de explantes foliares, cultivados e meio de cultura MS modificado (MSBM).(média \pm desvio padrão). Média de 6 repetições.



A elevada proporção [Put/(Spd+Spm)] verificada nas ESPs de *C. tigrina* neste trabalho, pode ser atribuída ao fato de que ESPs são estruturas juvenis e meristemáticas, e até os 35 dias (Figura 4F), quando foi feita a última análise de poliaminas endógenas livres, não haviam evidências de diferenciação do meristema apical. De acordo com PUGA- HERMIDA *et al.* (2003), a predominância de Put, também pode ser atribuída à transformação da Put na síntese de Spd e Spm, devido às atividades das sintetases de Spd e Spm. Os níveis reduzidos de

espermidina e espermina em relação à putrescina, devido a intensa utilização de Spd e Spm no processo de divisão e diferenciação celular.

Cangahuala-Inocente *et al.*, (2004), verificaram acúmulo de PAs no início da embriogênese somática de *Acca sellowiana*, concomitantemente com uma proliferação intensa de células da epiderme, acumulação de compostos fenólicos, maior organização de centros meristemáticos e proliferação de massas celulares pró-embriônicas. Em *A. angustifolia* altos teores de Put e Spd foram observados em embriões pré-cotiledonares, com posterior redução após a formação dos cotilédones (ASTARITA *et al.*, 2003). Em *O. catarinense* o maior conteúdo de PAs totais ocorreu no embrião somático em estágio globular e os teores mais baixos ocorreram no estágio cotiledonar (SANTA CATARINA *et al.*, 2004). Minocha *et al.* (1999) sugeriram a ocorrência de um decréscimo no conteúdo de Put, concomitantemente a um acúmulo no conteúdo de Spd ou Spm durante o desenvolvimento dos embriões somáticos de *Pinus radiata*. Em *Picea Rubens*, o alto nível de Put foi verificado apenas em tecidos pró-embriônicos, enquanto Spd foi predominante durante o desenvolvimento do embrião (MINOCHA & LONG, 2004). Spd e especialmente Spm parecem ser mais importantes do que a Put, em etapas posteriores a indução, sendo necessárias durante a evolução da morfogênese de embriões somáticos e zigóticos (MINOCHA *et al.*, 1999; SANTA- CATARINA *et al.*, 2007 ; STEINER *et al.*, 2007).

A inibição da síntese de poliaminas livres normalmente bloqueia o desenvolvimento do embrião (SANTANEN, 2000). Dessa forma, no caso de deficiência de PAs na planta, as células são equipadas com um sistema de alta eficiência de transferência e utilização funcional de moléculas de PA a partir de fontes externas (COHEN, 1998, HANFREY *et al.*, de 2001, KUSANO *et al.*, 2008). A adição exógena de PAs, principalmente Spd ou Put, não só elevou os níveis de PAs endógenas, mas também aumentou a frequência de conversão de ESPs em brotos de *Dendrobium huoshanense*. Neste estudo, o número máximo de ESPs foi obtido com a adição de tãoa meio de cultura e todos os tratamentos com Spd e Spm resultaram na produção de um número menor de ESPs que o controle (WANG *et al.*, 2009). Wei *et al.* (2010) verificaram que a adição de Put ao meio de cultura, melhorou o desenvolvimento de ESPs de *Dendrobium officinale*, e apresentou a

maior frequência de conversão (94%) de ESPs em brotos. Neste estudo, esses autores observaram também que a adição de DFMA (inibidor de poliamina) no meio de cultura reduziu a frequência de conversão. Em *Corylus avellana*, tecidos juvenis, com altos níveis de Put demonstraram maior facilidade para estabilização *in vitro*, enquanto tecidos adultos, com baixos níveis de Put, tiveram maior dificuldade (TIBURCIO *et al.*, 1994). Além disso, tem sido relatada que a aplicação de Put pode reduzir a produção de etileno indesejado e aumentar a morfogênese *in vitro* (BAIS & RAVISHANKAR, 2002). As rotas de biossíntese de PAs e etileno são reconhecidamente antagônicas. Durante a embriogênese, a supressão da biossíntese de etileno coincide com a ativação da biossíntese de PAs (BARON & STASOLLA, 2008).

Contudo, têm sido observadas respostas distintas ao etileno durante o processo de morfogênese *in vitro*. Em alguns sistemas o etileno atua de forma a estimular a resposta embriogênica ao passo que em outros, o efeito é inibitório. Chen e Chang (2003), utilizando explantes foliares de *Oncidium*, observaram que baixas concentrações de um precursor do etileno (ACC) retardou a formação direta de embriões, enquanto que concentrações mais elevadas deste precursor acelerou o processo. O acúmulo de etileno, em embriões somáticos de *P. abies*, foi referido como responsável pela existência de meristemas apicais pouco desenvolvidos (KONG & YEUNG, 1994). Dessa forma, a influência do etileno na morfogênese *in vitro* não está totalmente esclarecida, encontrando-se frequentemente resultados contraditórios nos diversos sistemas vegetais.

As PAs também estão envolvidas na regulação dos níveis endógenos de óxido nítrico (SANTA CATARINA *et al.*, 2007) e ácido abscísico (ABA) (STEINER *et al.*, 2007), e no crescimento e polaridade de embriões somáticos (SILVEIRA *et al.*, 2006). Sob condições de estresse osmótico, os tecidos vegetais podem responder aumentando a síntese de poliaminas livres (LITZ, 1986), e contribuindo para o acúmulo de compostos de reserva, como proteínas e triglicerídeos, que são utilizados durante a germinação (GEMPERLOVÁ *et al.*, 2009).

Em conclusão, no presente trabalho, os teores de PAs totais aumentaram concomitantemente com a progressão nas alterações morfológicas observadas durante os 35 dias de cultivo em meio de cultura MS modificado e suplementado com TDZ (9µM). Os resultados obtidos sugerem que a Put é a PA com maior envolvimento na

morfogênese de ESPs em *C. tigrina*, enquanto que, Spm e Spd teriam papel secundário ou implicariam em processos posteriores de diferenciação, que não foram observados neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÁZAR, R.; ALTABELLA, T.; MARCO, F.; MARCO, F.; BORTOLOTTI, C.; REYMOND, M.; KONCZ, C.; CARRASCO, P.; TIBURCIO, A. F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. **Planta** 231:1237–1249, 2010.
- 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**, v. 26, p. 163 – 168, 2003.
- BAGNI, N.; TASSONI, A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. **Amino Acids** 20:301– 317, 2001.
- BAIS, H.P.; RAVISHANKAR, G. A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 69, 1–34., 2002.
- BAJAJ, S.; RAJAM, M. V. Polyamine accumulation and near loss of morphogenesis in long term callus cultures of rice. Restoration of plant regeneration by manipulation of cellular polyamine levels. **Plant Physiology** 112:1343-1348, 1996.
- BARON, K.; STASOLLA, C. The role of polyamines during in vivo and in vitro development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** 44:384–395, 2008.
- BESSON-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** Vol. 1, No. 2, pp 218-228, ISSN 1674-2052, 2008.
- BOUCHEREAU, A., AZIZ, A., LARHER, F. AND MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent developments. **Plant Science** 140: 103–125, 1999.

CANGAHUALA-INOCENTE G. C.; STEINER N.; SANTOS M.; GUERRAM. P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma** 224: 33–40; 2004.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic amid enhanced direct somatic embryogenesis from *Oncidium* leaf cultures. **Plant Biology** 46:455–458, 2003.

CHI, G. L.; LIN, W. S.; LEE, J. E. E.; PUA, E. C. Role of polyamines on de novo shoot morphogenesis from cotyledons of *Brassica campestris* spp. *Perkinensis* (Lour.) Olsson in vitro. **Plant Cell Reports** 13:323-329, 1994.

CLELIA, D. L. P.; ROSA, G. A.; VICTOR, L. V. Possible role of light and polyamines in the onset of somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. **Molecular Biotechnology** 39:215-224, 2008.

COHEN, S.S. A guide to the polyamines. pp. 1-595, **Oxford University Press**, New York, NY, 1998.

EVANS, P. T.; MALMBERG, R. L. Do polyamines have roles in plant development. **Annual Review of Plant Molecular Biology** 40:235-269, 1989.

GALSTON, A. W. Polyamines as modulators of plant development. **Bioscience**. 33:382-388, 1983.

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.

GOW, W. P.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. **Acta Physiologiae Plantarum** 30(4): 507–512, 2008.

HANFREY, C.; SOMMER, S.; MAYER, M.J.; BURTIN, D. & MICHAEL, A.J. Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. **The Plant Journal**, Vol. 27, No. 6, pp 551-560, ISSN 1365-313X, 2001.

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*. **Plant Physiology** 113:424-429, 2001.

HYVONEN, M. T.; UIMARI, A., KEINANEN, T. A.; HEIKKINEN, S.; PELLINEN, R.; WAHLFORS, T. *et al.* Polyamine-regulated unproductive splicing and translation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase. **RNA** 12: 1569–1582, 2006.

KAKKAR, R. K.; RAI, V. K. Plant polyamines in flowering and fruit ripening. **Phytochemistry**. 33:1281-1288, 1993.

KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J. The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng* in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 70:181-188, 2002.

KONG, L.; YEUNG, E. C. Effects of ethylene and ethylene inhibitors on white spruce somatic embryo maturation. **Plant Science**.;104:71-80, 1994.

KUSANO, T.; BERBERICH, T.; TATEDA, C. & TAKAHASHI, Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. **Planta**, Vol. 228, No. 3, pp 367-381, ISSN 0032-0935, 2008.

KUZNETSOV, V.; SHORINA, M.; ARONOVA, E.; STETSENKO, L.; RAKITIN, V.; SHEVYAKOVA, N. I. NaCl- and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. **Plant Science** 172:363–370, 2007.

LANDAU, G.; BERCOVICH, Z.; PARK, M.H.; KAHANA, C. The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation. **The Journal of Biological Chemistry** 285: 12474–12481, 2010.

LI, Z.; BURRIT, D. J. Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. **Plant Growth Regulator** 40:65–74, 2003.

LITZ, R. E. Effect of osmotic stress on embryogenesis in *Carica* suspension culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. 111:969-972. 1986.

MARTIN-TANGUY, J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). **Plant Growth Regulator** 34:135–48, 2001.

MATTOO, A. K.; MINOCHA, S. C.; MINOCHA, R.; HANDA, A. K. Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. **Amino Acids** 38: 405–413, 2010.

MINOCHA, R.; MINOCHA, S. C.; LONG, S. 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, 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**, Vol. 105, No. 1, pp 155-164, ISSN 1399-3054, 1999.

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

MOHAPATRA, S., CHERRY, S., MINOCHA, R., MAJUMDAR, R., THANGAVEL, P., LONG, S. ET AL. The response of high and low polyamineproducing cell lines to aluminum and calcium stress. **Plant Physiology and Biochemistry** 48: 612–620, 2010.

MONTAGUE, M. J.; ARMSTRONG, T. A.; JAWORSKI, E. G. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota* II. Changes in arginine decarboxylase activity. **Plant Physiology** 63:341-345, 1979.

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, Tissue and Organ Culture** 68:225-232, 2002.

PAUL, A.; MITTER, K.; RAYCHAUDHURI, S. S. Effect of polyamines on in vitro somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. **Plant Cell, Tissue Organ Cult** 97:303–311, 2009.

PEREMARTI, A.; BASSIE, L.; CHRISTOU, P.; CAPELL, T. Spermine facilitates recovery from drought but does not confer drought tolerance in transgenic rice plants expressing *Datura stramonium* Sadenosylmethionine decarboxylase. **Plant Molecular Biology** 70: 253–264, 2009.

PUGA-HERMIDA, M.I.; GALLARDO, M.; MATILLA, A.J. The zygotic embryogenesis and ripening of *Brassica rapa* seeds provokes important alterations in the levels of free and conjugated abscisic acid and polyamines. **Physiologia Plantarum**, v. 117, p. 279 – 288, 2003.

QUINET, M., NDAYIRAGIJE, A., LEFEVRE, I., LAMBILLOTTE, B., DUPONT- GILLAIN, C.C. AND LUTTS, S. Putrescine differently influences the effect of salt stress on polyamine metabolism and ethylene synthesis in rice cultivars differing in salt resistance. **Journal of Experimental Botany** 61: 2719–2733, 2010.

SAIPRASAD, G. V. S.; RAGHUVeer, P.; KHETARPAL, S.; CHANDRA, R. Effect of various polyamines on production of

protocorm-like bodies in orchid *Dendrobium* 'Sonia'. **Scientia Horticulturae** 100 (2004), pp. 161–168, 2004.

SAKHANOKHO, H. F.; OZIAS-AKINS, P.; MAY, O. L.; CHEE, P. W. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 81: 91-95, 2005.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; SCHERER, G. F. E.; FLOH, E. I. S. Polyamines and nitric oxide induce morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 90:93–10, 2007.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELLAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH E.I.S. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 53 – 61, 2004.

SANTANEN, A. **Polyamine metabolism during development of somatic and zygotic embryos of *Picea abies* (Norway spruce)**. PhD dissertation Department of Biosciences, University of Helsinki; 2000.

MINOCHA, S.C.; LONG, S. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Vol. 40, No. 6, pp 572-580, ISSN 1054-5476, 2004.

SCHOLTEN, H.J. Effect of polyamines on the growth and development of some horticultural crops in micro propagation. **Science Horticulture**, v. 77, p. 83 – 88, 1998.

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 Science** 160:1229-1235, 2001.

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

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

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, Tissue and Organ Culture** 89:55-62, 2007.

TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; BORRELL, A. & MASGRAU, C. Polyamine metabolism and its regulation. *Physiologia*. **Plantarum**, Vol. 100, No. 3, pp 664-674, ISSN 1399-3054, 1997.

TIBURCIO, A. F.; REY, M.; DÍAZ-SALA, C.; RODÍRGUEZ, R. Endogenous polyamine concentrations in juvenile, adult and in vitro reinvigorated hazel. **Tree Physiology**. 14(2): 191-200, 1994.

VERA-SIRERA, F.; MINQUET, E.G., SINGH, S.K.; LJUNG, K., TUOMINEN, H., BLAZQUEZ, M.A. & CARBONELL, J. Role of polyamines in plant vascular development. **Plant Physiology and Biochemistry**, Vol. 48, No. 7, pp 534-539, ISSN 0981-9428, 2010.

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

WANG, Y.; LUO, J-P.; WU, H-Q.; JIN, H. Conversion of protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense* to shoots: The role of polyamines in relation to the ratio of total cytokinins and indole-3-acetic acid/indole-3-acetic acid. **Journal of Plant Physiology** 166: 2013- 2022, 2009.

WEI, M.; WEI, S-H.; YANG, C-Y. Effect of putrescine on the conversion of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* to shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 102:145-151.

WU, X. B.; WANG, J.; LIU, J. H.; DENG, X. X. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. **Journal Plant Physiology** 166:52-62, 2009.

YADAV J. S.; RAJAM M. V. Spatial distribution and temporal changes of free and bound conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. **Journal of Experimental Botany** 48: 1537–1545; 1997.

4 CAPÍTULO III: QUANTIFICAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA GLOBAL DE ESPS A PARTIR DE BASES FOLIARES DE *C. TIGRINA*

RESUMO - A metilação do DNA é um evento epigenético chave no processo de morfogênese *in vitro*, visto que os processos de competência e determinação estão intimamente relacionados ao controle da expressão gênica. O objetivo do presente trabalho foi quantificar a porcentagem de 5-metilcitosinas (5-mC) em diferentes dias de cultivo de explantes foliares de *Cattleya tigrina* A Rich. Bases foliares foram cultivadas em meio de cultura MS básico modificado (MSBM) para a indução de ESps. Para a quantificação em porcentagem de 5-mC foram utilizadas culturas no tempo, zero, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo. Os resultados obtidos mostram que a hipometilação do DNA foi concomitante com o início da diferenciação celular aos sete dias, e manteve-se constante até o 28º dia de cultivo. Observou-se também neste período um aumento no volume e divisão celular. A demetilação parece ser necessária para o início do processo de diferenciação em ESps em *C. tigrina*.

ABSTRACT - DNA methylation is an epigenetic key event in the *in vitro* morphogenesis process, since the competence and determination process are closely related to the control of gene expression. In the present work, PLB obtained by *in vitro* leaf bases, were used to quantify the percentage of 5-methylcytosine (5mC) to zero, 7, 14, 21, 28 and 35 days of *Cattleya tigrina* A. Rich cultivation. The results show DNA hypomethylation concomitantly with the beginning of cell differentiation at day seven, going until the 28th cultivation day, when it was observed an increase in cell volume. The demethylation appears to be necessary for the initiation of the differentiation process in *C. tigrina* PLB.

4.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Cattleya tigrina*, uma Orchidaceae endêmica da Mata Atlântica com potencial ornamental, motivou estudos relacionados à micropropagação para a produção de mudas com alta qualidade genética.

Na cultura *in vitro*, os tecidos crescem sob condições pouco naturais, sendo submetidos a estresses como ferimentos (tecidos incompletos), fonte de carbono exógena como uma substituta da fotossíntese, altas doses de auxinas e citocininas, e balanço hídrico alterado pela alta umidade em frascos de cultura de tecidos (SMULDERS *et al.*, 2011). Quando as plantas experimentam estes tipos de estresses, elas mostram um grande número de respostas, que podem incluir a variação epigenética (MOLINIER *et al.*, 2006).

Alterações epigenéticas são causadas por mudanças na expressão da informação do DNA, provocadas por alterações no padrão de metilação de bases nitrogenadas ou mudanças nas histonas, ou em ambos, e podem influenciar a transcrição de genes, que muitas vezes podem ser temporárias, e a planta pode reverter para o fenótipo normal, ou de longa duração, que são transferidas durante a propagação sexual (SMULDERS *et al.*, 2011).

A metilação do DNA é uma modificação química que se observa pela ligação de um grupo metil na posição 5' do anel de pirimidina da citosina (a única base que pode ser metilada em plantas), para formar 5-metilcitosina. Essa reação é catalisada pela enzima DNA-metiltransferase (DNMTs) (FINNEGAN & KOVAK, 2000), e alveja os resíduos de citosina nas sequências CpG, CpHpG, e CpHpH onde H pode ser qualquer deoxinucleotídeo. Nas plantas, a metilação do DNA tem sido identificada nas três ilhas de citosina (FENG *et al.*, 2010), e a presença destes grupamentos metil impede a ligação dos fatores de transcrição impossibilitando assim a expressão do gene. Os padrões de metilação são dinâmicos, e a distribuição de 5-metilcitosinas (5mC) ao longo do DNA pode mudar com o estado de desenvolvimento da célula (KOUKALOVA *et al.*, 2005).

A metilação da citosina em plantas superiores é regulada por duas atividades enzimáticas distintas e complementares, chamadas DNA metiltransferases (DNMTs) “de novo” (DRM1/2) e “de manutenção”

(MET1, CMT3), juntamente com DNA demetilases, enzimas de modificação de histonas, fatores de remodelamento da cromatina e RNA de interferência (RNAi) (ZHANG *et al.*, 2010). Metilação de novo é o processo pelo qual os resíduos de citosina não metilados são metilados durante o processo de replicação do DNA, resultando na formação de novos padrões de metilação. Metilação de manutenção é o processo pelo qual os padrões de metilação preexistentes são mantidos após a replicação do DNA (CHEN & LI, 2004).

A mudança dos padrões de metilação de citosina pode ser obtida por demetilações ativas ou passivas. Na demetilação passiva, as citosinas metiladas são substituídas por citosinas não metiladas durante a replicação do DNA. Na forma ativa, o radical metil é removido por DNA glicosilases (DME e ROS1) que são direcionadas para citosinas metiladas mesmo sem replicação do DNA (ZHANG *et al.*, 2010). As alterações de metilação/demetilação ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento da planta, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (RAMCHANDANI *et al.*, 1999), e a demetilação do DNA parece ser um dos passos fundamentais para a ativação da transcrição no genoma de eucariotas (LU *et al.*, 2006).

Essas alterações na metilação podem ser elementos chave do processo de morfogênese *in vitro*, visto que os processos de competência e determinação estão intimamente relacionados ao controle da expressão gênica (FRAGA *et al.*, 2002).

Em um sistema de cultura de tecidos, a diferenciação e desdiferenciação, bem como a divisão celular, são acompanhadas por eventos de metilação e demetilação do DNA genômico. A organogênese *in vitro* é resultado de alterações nos constituintes celulares, tais como proteínas, carboidratos, fitormônios, e poliaminas livres, e a metilação do DNA afeta tais mudanças, pois controla a expressão de muitos genes que são necessários para a síntese ou mobilização desses compostos (ARNHOLDT-SCHMITT *et al.*, 1995).

A instabilidade do genoma está associada à transcrição de elementos móveis de DNA, como transgenes, vírus, transposons e retroelementos, os quais podem ser controlados através da metilação (KIDWELL & LISCH, 2001). Rabinowicz *et al.* (2003) mostraram que em condições normais, os transposons são metilados, enquanto *in vitro*, evidencia-se uma diminuição na metilação global, que estaria intimamente relacionada com a expressão desses elementos de transposição. Assim busca-se controlar as respostas morfo genéticas em

cultura de tecidos vegetais com o objetivo de manter a estabilidade genética das culturas (KAEPPLER *et al.*, 2000).

Os mecanismos que controlam a diferenciação celular durante a morfogênese de estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) ainda não estão claros, contudo, a metilação do DNA é um possível mecanismo para a regulação da expressão gênica. Portanto o presente capítulo teve como objetivo comparar os níveis de metilação global durante a formação de ESPs de *C. tigrina*, usando a metodologia de quantificação da metilação do DNA por meio de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC/UV.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

As fases de multiplicação de plantas e indução de ESPs foram descritas no Capítulo 1. As amostras oriundas do processo de indução foram utilizadas para quantificação da metilação global, no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do Centro de Ciências Agrárias (CCA). As coletas foram realizadas ao zero, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo.

O meio de cultura básico utilizado para indução de ESPs foi constituído pela formulação salina de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificada, com a metade das concentrações salinas e adicionada de Peptona de soja ($0,001 \text{ mg.L}^{-1}$), NaH_2PO_4 (170 mg.L^{-1}) e vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e suplementado com TDZ ($9 \mu\text{M}$), doravante denominado de meio MS básico modificado (MSBM).

4.2.1 Extração de DNA

Seis amostras de cada tempo de coleta foram submetidas à extração de DNA segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Para a maceração do material as amostras foram depositadas em um cadinho de cerâmica ao qual foi adicionado nitrogênio líquido. Após a maceração, as amostras foram transferidas para um microtubo de 2 ml, foram adicionados $700 \mu\text{l}$ de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20mM EDTA; 100mM Tris-HCl, pH 8,0; e 0,2% 2-mercaptoetanol), e incubadas em banho-maria ($60\text{-}65^\circ\text{C}$) por 50 min, sendo agitadas a cada 10 min para o homogeneização. Após a retirada

do banho-maria foram adicionados 600 μl de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA), submetido à agitação por inversão durante 5 min e centrifugação em microcentrífuga (5.000 g durante 10 min). Após esse procedimento, a fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 500 μl de isopropanol gelado para a precipitação do DNA por uma hora a -20°C . Submeteu-se a amostra a nova centrifugação (12.000 g) por 10 min, para a formação do pellet. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes em álcool 70% por um minuto. Após a lavagem, deixou-se o pellet secar por aproximadamente 30 min para a total evaporação do álcool. Uma vez lavado e livre de qualquer resíduo de álcool, o pellet foi resuspenso 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.) que forneceu a concentração de ácido nucléico das amostras.

4.2.2 Digestão de ácidos nucleicos

Os procedimentos de digestão foram baseados no protocolo desenvolvido por Johnston *et al.* (2005). As digestões com RNase realizadas com 100 μl de ácido nucléico ($1\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) em tampão TE. As amostras foram aquecidas a 65°C por 5 min para sua desnaturação e incubadas a 4°C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 10 μl de RNase A ($1\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) e 10 μl de RNase T1 ($20\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) sendo vortexadas e incubadas a 37°C por 17 horas. Após a digestão, 20 μl de acetato de sódio (3M, pH 5,4) foram adicionados para uma concentração final de 0,3 M e os microtubos foram agitados. O DNA e o RNA resistente a RNase foram precipitados com 136 μl de isopropanol gelado (-20°C), agitados e incubados por 30min a -20°C . As amostras foram então centrifugadas a 5.000g por 10 min para formação de um pellet, sendo lavado com etanol 70% (v/v) e novamente centrifugados a 5000g por 5 min. Os pellets foram secos a temperatura ambiente e resuspendidos em 100 μl de H_2O deionizada e autoclavada. A concentração de ácidos nucléicos foi novamente determinada conforme descrito anteriormente e as concentrações das amostras foram ajustadas para $0,25\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ em H_2O .

As digestões de DNA com nuclease P1 e fosfatase alcalina foram realizadas utilizando 25 μg de ácido nucléico em 100 μl de H_2O deionizada, de acordo com o descrito por Johnston *et al.* (2005). Os

ácidos nucleicos foram desnaturados por aquecimento a 100°C por 2 min e mantidos a 4°C por 5 min. Foram adicionados 5 µl de 10 mM ZnSO₄ e 10 µl de nuclease P1 (1.0 U.ml⁻¹ em NaOAc 30 mM (pH 5.4)) seguido da agitação das amostras e incubação para a reação de digestão a 37°C por 17 horas. 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. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 5 min e o sobrenadante foi armazenado a -20°C até a análise por HPLC.

4.2.3 Análise por HPLC/UV

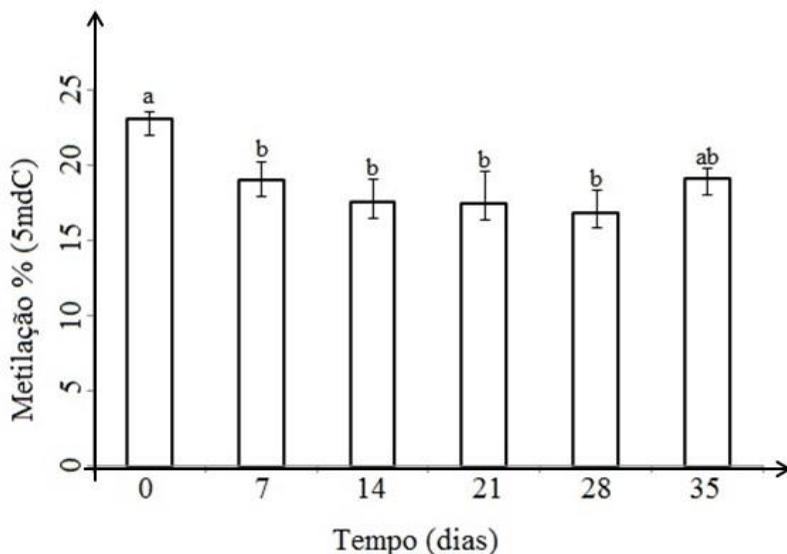
As análises por HPLC/UV foram baseadas no procedimento descrito por Johnston *et al.* (2005). Foi utilizada uma coluna Hyperclone 5 µm C18 (250 × 4.6 mm) (Phenomenex®), pré-coluna (4.0 × 3.0 mm) (Phenomenex®) e detector UV a 280 nm. O programa de eluição por gradiente consistiu de 3 min com 100% de tampão A (0,5% v/v de metanol em tampão KH₂PO₄ 10 mM, pH ajustado para 3,7 com ácido fosfórico), seguido por um gradiente linear 3-20 min com 100% de tampão B (10% v/v de metanol em KH₂PO₄ 10 mM, pH ajustado para 3,7 com ácido fosfórico), seguido por 20-25 min com 100% de tampão B. O fluxo utilizado foi 1 mL.min⁻¹ sendo injetados 20 µl de amostra, com duas replicatas técnicas de cada amostra.

As concentrações de nucleosídeos foram determinadas por comparação com padrões externos de acordo com a área do pico formado. Os padrões utilizados foram dNTPs (dA, dT, dC, 5mdC e dG) submetidos a digestão por duas horas com fosfatase alcalina (10 U.mL⁻¹) e Tris-HCl (0,5 M pH 8,3) a 37°C, visando obter-se os nucleosídeos. Os padrões de nucleosídeos (5-50 mM) foram preparados em H₂O deionizada e armazenados a -20°C. A quantificação da 5-metil-2'-deoxicitina (5mdC) (%) foi calculada de acordo com a concentração de 5mdC dividido pela concentração de 5mdC somada a concentração de deoxicitidina (dC) multiplicado por 100.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas, os tempos de coletas foram considerados tratamentos, os quais apresentavam seis repetições cada. Cada repetição foi representada por uma amostra de 300mg, analisada em duplicata no momento da leitura em espectrofotômetro. As médias das porcentagens de metilação do DNA global foram submetidas à análise da variância (ANOVA), e quando necessário realizou-se comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de significância por meio do Software livre R.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO



A dinâmica da metilação do DNA global de ESPs de *C. tigrina* revelaram diferenças estatísticas entre os estágios de desenvolvimento das estruturas (Figura 8). No momento da inoculação (dia zero), o explante apresentava 23% de metilação global. Aos sete dias (19%), observou-se o início da redução da metilação (hipometilação), que apresentou menor valor no 28º dia de cultivo (16%). Aos 35 dias (19%) verificou-se acréscimo sutil na porcentagem de metilação global, não diferindo estatisticamente do 7º dia de cultivo.

Geralmente a hipometilação coincide com início da diferenciação das células (Figura 2E), e se mantém durante os estágios

que apresentaram aumento no número e volume das ESPs (Figura 2F, 2I, 2K). O reestabelecimento da porcentagem de metilação aos 35 dias de cultivo coincide com uma mudança no padrão morfogenético das estruturas, que já apresentam um alongamento diferenciado (Figura 2N – ver seta).

Transições entre as diferentes fases de desenvolvimento envolvem mudanças no padrão de diferenciação celular, que é geneticamente regulado. A metilação do DNA pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da planta, associado a um controle epigenético dos padrões de desenvolvimento nas células em proliferação (RUIZ-GARCÍA *et al.*, 2005).

Figura 8 - Valores médios de 5-metilcitosina expressos em porcentagem, quantificada por HPLC/UV em relação aos dias de cultivo de basesfoliares de *C. tigrina* em meio de cultura MS modificado (MSBM).

Média de 6 repetições. Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa segundo o teste Tukey (5%). média \pm desvio padrão).

Em *Eleuterococcus senticosus*, foi verificado que os níveis de metilação global foram menores em calos embriogênicos, quando comparados com calos não embriogênicos obtidos a partir de explantes foliares (CHAKRABARTY *et al.*, 2003). Estes autores sugerem que as diferenças na metilação podem ser um reflexo dos diferentes processos de desenvolvimento, quando comparado o padrão de metilação do DNA com os mecanismos de regulação da expressão de genes durante o desenvolvimento do embrião em animais. Neste contexto, esses autores verificaram que após a fertilização, o mecanismo de demetilação conduz uma quase conversão completa de metilcitosina para citosina.

Em plantas, tal como *Silene latifolia*, o processo moderado de hipometilação global durante a germinação e pós-germinação de sementes refletiu uma forma de transição da semente metabolicamente quiescente para o crescimento ativo e o desenvolvimento das plântulas (ZLUVOVA *et al.*, 2001). *In vitro*, a hipometilação em uma população de células específica parece estar associada ao início de um programa de diferenciação, característico de linhas embriogênicas, capazes de regenerar plantas inteiras (NOCEDA *et al.*, 2009).

Em *Pinus nigra*, Noceda *et al.* (2009) também verificaram uma relação inversa entre os níveis de metilação do DNA e o potencial embriogênico. Níveis mais elevados de metilação (30% de 5mdC) corresponderam à linhagem sem capacidade embriogênica enquanto níveis abaixo de 18% de 5mdC, permitiram a formação de estruturas bipolares com potencial embriogênico. Os autores sugerem que a menor porcentagem de metilação nas culturas com potencial embriogênico se deve ao fato de que estas estruturas devem expressar genes relacionados ao desenvolvimento do programa embriogênico inteiro, além de genes de manutenção. Enquanto, as culturas sem capacidade embriogênica teriam os genes relacionados ao programa embriogênico silenciados pela alta porcentagem de metilação. Durante a embriogênese somática de *Picea abies*, Van Zyl *et al.* (2002) observaram que pelo menos 35 genes mudaram sua expressão, dentre estes 22 foram diretamente associados com a formação dos embriões. Isto sugere que a hipometilação do DNA induz a um estado de diferenciação em células somáticas, semelhante ao que ocorre nos embriões zigóticos imaturos (VON ADERKAS & BONGA, 2000).

Na embriogênese somática de *Rosa hybrida*, os padrões de metilação durante a embriogênese somática se mostraram diferentes daqueles observados durante a organogênese de brotos (XU *et al.*, 2004). Os autores mostraram que a demetilação das citosinas ocorreu em uma alta frequência durante a embriogênese somática, e a maioria das alterações nos calos foram passadas para seus regenerantes. No entanto, a maioria das modificações observadas durante a organogênese não foram passadas aos brotos regenerantes, levando os autores a sugerir que as alterações nos padrões de metilação do DNA, especialmente demetilação de citosinas, são relacionadas apenas com a capacidade embriogênica.

No presente trabalho, a hipometilação do DNA global no 28º dia de cultivo revelou uma clara relação com as fases de indução e formação de ESPs, assemelhando-se ao observado durante as fases iniciais da embriogênese zigótica (OKKELS, 1988). Isto está de acordo com vários estudos que sugerem um papel fundamental para a hipometilação do DNA no sentido de incentivar a aquisição de competência embriogênica de células somáticas (MUNKSGAARD *et al.*, 1995; ELHITI *et al.*, 2010).

O uso do regulador de crescimento thidiazuron (TDZ) para indução de ESPs no presente trabalho, pode ter influenciado o processo

de metilação do DNA, visto que, este evento epigenético é muitas vezes induzido por estresse (BOYKO & KOVALCHUK, 2011), um efeito que tem sido atribuído ao TDZ *in vitro* (VON ADERKAS & BONGA, 2000; MAMAGHANI *et al.* 2009). O TDZ é um derivado da feniluréia, que pode atuar como uma citocinina- purina, bem como uma auxina (THOMAS & KATTERMAN, 1986, VISSER *et al.*, 1992) , presumivelmente afetando os níveis endógenos de hormônios como auxina e citocinina (MURTHY *et al.*, 1995, 1998) e promovendo a indução de altas taxas de embriogênese somática em inúmeros explantes (MURTHY *et al.*, 1995). Considerando que o crescimento e o desenvolvimento são regulados por hormônios vegetais específicos, sendo a modulação da metilação do DNA um dos modos de ação hormonal na planta (VANYUSHIN *et al.*, 2004), podemos inferir que, no presente trabalho, o TDZ ativou um gene silenciado (ou um grupo de genes) responsável pelo desenvolvimento de estruturas semelhantes à protocormos, caracterizando um evento epigenético.

A aquisição de pluripotencialidade durante a transição entre as diferentes fases de desenvolvimento das culturas é acompanhada por alterações na metilação do DNA global, modificações de histonas e reorganização de domínios cromossômicos específicos que conduzem a um novo reajuste do programa de expressão dos genes (WILLIAMS *et al.*, 2003, AVIVI *et al.*, 2004). Em grande parte dos estudos com embriogênese somática, quando o processo de diferenciação celular prévio à conversão propriamente dita de embriões se ativa, observa-se um processo de transição similar ao registrado na germinação de sementes, onde os eventos de demetilação superam a metilação (ZLUVOVA *et al.*, 2001; KOORNNEEF *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2006; FAIT *et al.*, 2006; MENG *et al.*, 2012).

No entanto, Fraga *et al.* (2012), observaram que embriões somáticos de *Acca sellowiana* formados em meio de cultura com drogas hipometilantes como a 5-Azacitidina (Azac) apresentaram baixas taxas de conversão, constatando uma influência negativa da hipometilação na capacidade de conversão de embriões somáticos. Muito provavelmente as diferenças no nível de metilação do DNA são resultado dos diferentes tipos de tecidos ou do controle genético de cada espécie, devido às divergências no tamanho do genoma, status hormonal dos explantes e condições de cultivo.

Os resultados apresentados no presente trabalho apontam que durante a formação de ESPs a partir de explantes foliares de *C. tigrina*, os padrões de metilação do DNA (metilação/demetilação) influenciaram o programa de expressão gênica. O estudo demonstrou que a formação de ESPs está associada à hipometilação do DNA global, e que a presença de TDZ no meio de cultura pode estar associada aos fatores que desencadearam a demetilação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNHOLDT-SCHMITT, B.; HERTERICH, S.; NEUMANN, K. Physiological aspects of genome variability in tissue culture. i. growth phase-dependent differential DNA methylation of the carrot genome (*Daucus carota* L.) during primary culture. **TAG** 91:809–815, 1995.

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

BOYKO, A.; KOVALCHUK, I. Genome instability and epigenetic modifications - heritable responses to environmental stress? **Current Opinion in Plant Biology** 14:260–266. doi:10.1016/j.pbi. 2011.03.003, 2011.

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.; LI, E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 60, p. 55–89, 2004.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Vol 19, 1:11-15, 1987.

ELHITI M, TAHIR M, GULDEN RH, KHAMISS K, STASOLLA 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.

FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNIE, A.R.; GALILI, G. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. **Plant Physiology**, v. 142, p. 839-854, 2006.

FENG, S. *et al.* Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 107, 8689–8694, 2010.

FINNEGAN, E.J.; KOVAK, K.A. Plant DNA methyltransferases. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p.189-201, 2000.

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 *Acacia sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. **Plant Cell Reports** 31: 2165–2176, 2012.

FRAGA, M.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J. Genomic DNA methylation- demethylation during aging and revigoration of *Pinus radiata*. **Tree Physiology** 22:813–816, 2002.

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.

KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants, **Plant Molecular Biology** 43:179–188, 2000.

KIDWELL, M.G.; LISCH, D.R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**, v. 55, p.1–24, 2001.

KOORNNEEF, M.; BENTSINK, L.; HILHORST, H. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin.* **Plant Biology**, v. 5, p. 33-36, 2002.

KOUKALOVA, B.; FOJTOVA, M.; LIM, K.Y.: FULNECEK, J.; LEITCH, A.R.; KOVARIK, A. Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations. **Plant Physiology**, v.139, p.275-286, 2005.

LU, G.; WU, X.; CHEN, B.; GAO, G.; XU, K.; LI, X. Detection of DNA methylation changes during seed germination in rapeseed (*Brassica napus*). **Chinese Science Bulletin**, v. 51, p.182-190, 2006.

MAMAGHANI, M. S.; ASSAREH, M. H.; OMIDI, M.; MATINIZADEH, M.; GHAMARI-ZARE, A.; SHAHRZAD, S.; FOROOTAN, M. The effect of thidiazuron level on in vitro regeneration type and peroxidase profile in *Eucalyptus microtheca* F. **Muell. Plant Growth Regulator** 59:199– 205, 2009.

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**, v. 56, ed.2, p.269-275, 2012.

MOLINIER, J.; RIES, G.; ZIPFEL, C.; HOHN, B. Transgeneration memory of stress in plants. **Nature** 442:1046–1049, 2006.

MUNKSGAARD, D.; MATTSSON, O.; OKKELS, F. T. Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of Sadenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. **Physiologia Plantarum** 93, 5–10, 1995.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K.. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** 34:267–275, 1998.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K.. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiology Plant**. 94:268–276, 1995.

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 - Structure and Function** 23: 1285–1293, 2009.

OKKELS, F. T. A theory explaining formation of somatic embryogenic cells by auxin-induced inhibition of DNA methylation. **Physiologia Plantarum** 73, 11^a, 1998.

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 Research** 13:2658–2664, 2003.

RAMCHANDANI, S.; BHATTACHARYA, S.K.; CERVONI, M.; SZYF, M. DNA methylation is a reversible biological signal. **PNAS**, 96:6107–6112, 1999.

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

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

THOMAS, J. C.; KATTERMAN, F. R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology** 81:681–683, 1986.

VAN ZYL, L.; BOZHKOVA, P.; CLAPHAM, D.; SEDEROFF, R.; VON ARNOLD, S. Up, down and up again is a signature global gene expression pattern at the beginning of gymnosperm embryogenesis. **Gene Expression Patterns** 3:83–91, 2002.

VANYUSHIN, B. F.; BAKEEVA, L. E.; ZAMYATNINA, V. A.; ALEKSANDRUSHKINA, N. I. Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. **International Review of Cytology** 233:135–179, 2004.

VISSER, C., J. A. QURESHI, R; GILL; SAXENA, P. K.
Morphoregulatory role of thidiazuron: substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. **Plant Physiology** 99:1704–1707, 1992.

VON ADERKAS, P.; BONGA, J. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiology** 20:921–928, 2000.

WILLIAMS, L.; ZHAO, J.; MOROZOVA, N.; LI, Y.; AVIVI, Y.; GRAFI, G. Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1, and activation of E2F-target genes. **Developmental Dynamics** 228: 113–120, 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.

ZHANG, M.; KIMATU, J. N.; XU, K.; LIU, B. DNA cytosine methylation in plant development. **Journal of Genetics and Genomics, Peiping**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 2010.

ZLUVOVA, J.; JANOUSEK, B; VYSKOT, B. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. **Journal of Experimental Botany**, 365:2265-2273, 2001.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que a ontogênese de ESPs de *C. tigrina* está associada a alterações bioquímicas e eventos epigenéticos como a metilação do DNA. O início das primeiras divisões mitóticas aos sete dias de cultivo é marcado pelo aumento do teor de proteínas totais, putrescina e redução da metilação do DNA em comparação com o explante inicial (Figura 9). Essas alterações configuram um quadro inicial típico de diferenciação celular e formação de tecidos.

Alterações bioquímicas mais acentuadas foram observadas no 14º e 21º dia, com teores de amido, proteínas totais e putrescina em seus valores máximos e gradual redução da metilação do DNA global. Maior proliferação de ESPs, e aumento no volume celular, marcam este período.

Aos 28 e 35 dias de cultivo, observou-se a manutenção dos teores de putrescina e amido, decréscimo nos teores de proteínas totais, e sutil elevação da porcentagem de metilação do DNA global. ESPs mostraram-se mais volumosas, com coloração verde-escura e alongamento diferenciado.

As alterações bioquímicas na ontogênese de ESPs caracterizam uma rota morfogênica muito semelhante à embriogênese somática, embora mantenha *in vitro* o comportamento diferenciado típico das orquídeas. Estudos relacionados à proteômica poderão complementar este trabalho, elucidando os grupos de proteínas sintetizadas em cada estágio de diferenciação das ESPs. Assim como análises transcriptômicas, complementariam as análises de metilação do DNA global.

A elucidação da ontogênese de ESPs faz parte de uma discussão científica global e as distintas respostas morfogenéticas de cada espécie de orquídea quando cultivada *in vitro*, torna ainda mais complexa à conceituação desse processo. O objetivo deste estudo foi o aporte de dados para discussões futuras.

Figura 9 - Resumo esquemático das mudanças bioquímicas durante a indução de ESPs a partir de bases foliares de *C. tigrina* ao zero, 7, 14, 21, 28 e 35 dias. O tempo zero representa o explante foliar. As barras indicam flutuações dos teores de proteínas totais, amido, Put, Spd, Spm, e metilação do DNA global.

Formação de estruturas semelhantes à protocormos em bases foliares de *C.tigrina*

