



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Luiza Giacomolli Polesi

Embriogênese somática de *Guadua chacoensis* (Bambusoideae; Poaceae): abordagens bioquímicas e morfoanatômicas

Florianópolis-SC

2022

Luiza Giacomolli Polesi

Embriogênese somática de *Guadua chacoensis* (Bambusoideae; Poaceae): abordagens bioquímicas e morfoanatômicas

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração de Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Miguel Pedro Guerra, Dr.

Coorientador: Prof. Hugo Pacheco de Freitas Fraga, Dr.

Florianópolis-SC

2022

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

Polesi, Luiza Giacomolli
Embriogênese somática de *Guadua chacoensis*
(Bambusoideae; Poaceae): abordagens bioquímicas e
morfoanatômicas / Luiza Giacomolli Polesi ; orientador,
Miguel Pedro Guerra, coorientador, Hugo Pacheco de
Freitas Fraga, 2022.
58 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Embriogênese
somática. 3. Bambu. 4. Morfoanatomia; Bioquímica. 5.
Criopreservação . I. Guerra, Miguel Pedro. II. Pacheco de
Freitas Fraga, Hugo . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. IV. Título.

Luiza Giacomolli Polesi

Embriogênese somática de *Guadua chacoensis* (Bambusoideae; Poaceae): abordagens bioquímicas e morfoanatômicas

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 16 de agosto de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Vanildo da Silveira, Dr.

Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)

Prof^a. Rosete Pescador, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Valdir Marcos Stefenon, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Ciências atribuído pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Miguel Pedro Guerra, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022

Aos meus pais e irmãos pelo apoio em todos os momentos.
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de realização do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra por todos os conhecimentos e ensinamentos transmitidos, bem como pela orientação, confiança e incentivo ao longo de todo o doutorado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Hugo Pacheco de Freitas Fraga pelos ensinamentos, incentivo, apoio e coorientação ao longo da execução desta tese.

A todos os professores do RGV que fizeram parte da minha formação pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio incondicional, incentivo, carinho e compreensão ao longo da minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) por todos os momentos de descontração, colaboração e convivência.

A todos os amigos, que de perto ou de longe sempre estiveram ao meu lado me incentivando e transmitindo boas vibrações, meu muito obrigada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

A todos meu muito obrigada!

*“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista de seus objetivos, mesmo que eles pareçam impossíveis. A próxima tentativa pode ser a vitoriosa”. **Albert Einstein.***

RESUMO

Os bambus são plantas de múltiplos usos e apresentam importância social, econômica e ambiental. Entretanto, plantas deste grupo taxonômico são consideradas de difícil propagação e o uso de métodos biotecnológicos de cultivo *in vitro* se mostram essenciais para a propagação e conservação dos bambus. Dentre as rotas morfogenéticas *in vitro*, a embriogênese somática (ES) corresponde a menos compreendida e estudada até o momento, como protocolos descritos para apenas aproximadamente 30 espécies das mais de 1600 catalogadas. Para *Guadua chacoensis*, um bambu lignificado pertencente ao gênero de maior importância econômica das Américas, não existem protocolos de ES reportados. Assim, essa tese teve por objetivo descrever e caracterizar o processo de ES e de criopreservação de *G. chacoensis* utilizando abordagens morfoanatômicas e bioquímicas. Os resultados evidenciaram que o uso de explantes pré-tratados com estiolamento (mantidos no escuro), 400 μM de Picloram e originados da região basal resultaram em 87,5% de indução de calos e que as doses de Picloram utilizadas ao longo do processo de ES tem influência direta na geração das respostas, uma vez que a redução e remoção de Picloram permitiu a formação de culturas embriogênicas e maturação, respectivamente. Durante a fase de multiplicação, duas morfologias de culturas foram geradas: compactas e nodulares e friáveis e granulares, sendo as primeiras morfoanatomicamente caracterizadas como culturas embriogênicas (EC), por apresentarem células com citoplasma denso e embriões em estrutura globular e as segundas como culturas não embriogênicas (NEC), por apresentarem células alongadas, vacuoladas e sem formação de estruturas organizadas. Apenas as ECs foram capazes de maturar, entretanto, não foi alcançada a regeneração de plantas no presente trabalho. A caracterização bioquímica de EC e NEC revelou um aumento nos conteúdos de espermidina, arginina, metionina, maltose e manose em EC, sugerindo um possível envolvimento destas moléculas com a resposta embriogênica. A análise de proteômica comparativa de EC versus NEC permitiu a identificação de 855 proteínas, sendo 129 up- e 136 down-reguladas em EC. Os resultados sugerem o envolvimento de algumas classes de proteínas com a resposta embriogênica de *G. chacoensis* incluindo proteínas de resposta a estresse, de detoxicação, ribossomais e translacionais, do metabolismo de carboidratos, de formação de parede e de sinalização celular. EC apresentaram também aumentos na atividade de superóxido dismutase e guaiacol peroxidase, sugerindo que a ativação de mecanismos de defesa contra espécies reativas de oxigênio parece ser fundamental para a manutenção da homeostase celular e geração de resposta embriogênica. As EC se mostraram como uma boa fonte de materiais para o estabelecimento de suspensões celulares e, a partir destas, estabeleceu-se um protocolo de criopreservação, representando uma importante alternativa de conservação *in vitro* para esta espécie de bambu. Por fim, pode-se concluir que esta tese gerou resultados consistentes, descreveu e caracterizou um protocolo de ES e de criopreservação de *G. chacoensis* e explorou o envolvimento de poliaminas, aminoácidos, carboidratos, proteínas e enzimas antioxidantes com a resposta embriogênica, gerando importantes avanços para a cadeia produtiva e conservação de *G. chacoensis*.

Palavras-chave: bambu; morfoanatomia; bioquímica; proteômica; enzimas antioxidantes; criopreservação.

ABSTRACT

Bamboos are multiple-purpose plants that present social, economic, and environmental uses. However, they are considered plants of difficult propagation, and biotechnological approaches are essential for both the propagation and conservation of bamboo. Among the morphogenetic *in vitro* routes, somatic embryogenesis (SE) is considered the least understood and studied until now, presenting protocols for only approximately 30 species from more than 1600 already identified. For *Guadua chacoensis*, a lignified bamboo belonging to one of the genres of great importance in the Americas, to the best of our knowledge, no studies have been reported, emphasizing the importance of further studies. The present thesis aimed to describe and characterize the SE and cryopreservation of *G. chacoensis* through morphoanatomical and biochemical approaches. The results showed that the use of pre-treated etiolated explants (kept in the constant dark), 400 μ M of Picloram, and basal region represents the best combination for callus induction, reaching 87,5% of induction. We observed that the use of different picloram concentrations directly influences SE-generated response, since the reduction and removal of picloram were necessary for embryo formation and maturation, respectively. During the multiplication phase, two cultures' morphology was observed: compact and nodular and friable and soft, whereas the first was morphoanatomically characterized as embryogenic culture (EC), since presents cells with dense cytoplasm and embryos in the globular stage, and the second was identified as non-embryogenic culture (NEC), showing elongated and vacuolated cells without the formation of any structure. Only EC was able to mature, however, we did not achieve plant regeneration in the present study. Biochemical characterization of EC and NEC showed an increase in the content of spermidine, arginine, methionine, maltose, and mannose in EC, suggesting a possible involvement of these molecules with the embryogenic response. Comparative proteomic analysis of EC versus NEC identified 855 proteins, 129 up- and 136 down-regulated in EC. Moreover, our results imply that some classes of proteins seem to be associated with the embryogenic response of *G. chacoensis*, including proteins related to stress response, detoxication, ribosomal and translational process, carbohydrate metabolism, cell wall formation, and signaling transduction. EC presented an increase in the activity of superoxide dismutase and guaiacol peroxidases, suggesting that the activation of the defense response mechanism against reactive oxygen species seems to be essential for keeping cell homeostasis during the generation of an embryogenic response. Cell suspension culture was established by using EC as source material and was used for the establishment of a cryopreservation protocol, representing an important alternative for *in vitro* conservation of this bamboo specie. In summary, this thesis described and characterized SE and cryopreservation protocols and showed the involvement of polyamines, amino acids, carbohydrates, proteins, and antioxidant enzymes with the embryogenic response, generating important advances for the production chain and conservation of *G. chacoensis*.

Keywords: Somatic embryogenesis; bamboo; morphoanatomy; biochemical; proteomics; antioxidant enzymes; cryopreservation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição global dos bambus no hemisfério Oeste - Américas, Eurásia, Austrália e África. 14
- Figura 2. *Guadua chacoensis*. a) destaque para os colmos; b) destaque para a altura da planta; c) distribuição da espécie no Brasil. 15
- Figura 3. Aplicações da embriogênese somática. 16
- Figura 4. Rotas de biossíntese, catabolismo e anabolismo de PAs bem como sua interação com outras rotas metabólicas. 21
- Figura 5. Biossíntese de AA e suas interações com as proteínas em plantas (a) e ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento das plantas (b). 23
- Figura 6. Enzimas antioxidantes agindo na detoxicação de EROs/ROS. Superóxido dismutase (SOD) agem na primeira linha de detoxicação, seguido das enzimas Ascorbato Peroxidase (APX), Catalase (CAT), Guaiacol Peroxidase (GPX) e Glutathione redutase (GR). 25
- Figura 7. Principais classes de proteínas envolvidas com as diferentes etapas da ES. Quadrados verde, azul, laranja e roxo indicam culturas embriogênicas, culturas não embriogênicas, maturação e germinação. Setas para cima indicam up-regulação enquanto setas para baixo indicam down-regulação de proteínas. 27
- Figura 8. Resumo gráfico dos principais resultados obtidos neste trabalho. A indução de calos foi alcançada utilizando explantes pré-tratados com estiolamento, região da base e 400 μM de Picloram. Durante a fase de multiplicação ocorreu a formação de culturas embriogênicas (EC) e não embriogênicas (NEC) e a caracterização bioquímica revelou acúmulos de espermidina, arginina, metionina, manose e maltose em EC. Somente as EC foram capazes de maturar após a remoção do Picloram, adição de carvão ativado e transferência para a luz. 37
- Figura 9. Resumo gráficos demonstrando os principais grupos de proteínas e enzimas antioxidantes envolvidas com a resposta embriogênica de *G. chacoensis*. Culturas embriogênicas (EC) apresentaram acúmulo de proteínas de detoxicação, de resposta a estresse, do metabolismo de carboidratos, de remodelação de parede, de transdução de sinal e ribossomais e translacionais. Da mesma forma, EC apresentaram acúmulo de superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPX) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). 43
- Figura 10. Resumo gráfico do trabalho demonstrando as etapas realizadas no estabelecimento do protocolo de criopreservação, bem como os principais resultados obtidos. 49
- Figura 11. Resumo gráfico de todos os conhecimentos e avanços obtidos com o desenvolvimento desta tese para o bambu *G. chacoensis*. 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ES	Embriogênese somática
<i>G. chacoensis</i>	<i>Guadua chacoensis</i>
EC	Culturas embriogênicas
NEC	Culturas não embriogênicas
TCL	Thin cell layer
PAs	Poliaminas
Put	Putrescina
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
DNA	Ácidos Desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ADC	Arginina descarboxilase
ODC	Ornitina descarboxilase
SAM	S-adenosil-metionina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
NO	Óxido nítrico
AA	Aminoácidos
PEG	Polietilenoglicol
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ELSD	Detector de espalhamento de luz evaporativo
EROs/ROS	Espécies reativas de oxigênio
O ₂ ⁻	Radicais superóxidos
¹ O ₂	Oxigênio singleto
OH	Hidroxila
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
APX	Ascorbato peroxidase
GPX	Guaiacol peroxidase
GR	Glutationa redutase
ANOVA	Análise de variância
SNK	Student-Newman-Keuls

SUMÁRIO

1.	JUSTIFICATIVA E ANTECEDENTES	13
1.1.	BAMBUS: CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E ESPÉCIE DE ESTUDO.....	13
1.2	EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	16
1.2.1	Fatores que afetam a etapa de indução da ES	17
1.3	ASPECTOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS A ES.....	19
1.3.1	Poliaminas	19
1.3.2	Aminoácidos	21
1.3.3	Carboidratos	23
1.3.4	Atividade enzimática	24
1.3.5	Proteômica	26
1.4	CRIOPRESERVAÇÃO.....	27
2.	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3.	CAPÍTULO 1 – SOMATIC EMBRYOGENESIS IN BAMBOOS: ADVANCES AND PROSPECTS	31
4.	CAPÍTULO 2 – MORPHOHISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE <i>Guadua chacoensis</i> (BAMBUSOIDEAE; POACEAE) SOMATIC EMBRYOGENESIS	33
4.1	RESUMO	33
4.2	INTRODUÇÃO.....	33
4.3	METODOLOGIA.....	34
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.5	CONCLUSÃO.....	37
5.	CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DE PROTEÔMICA COMPARATIVA E DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS E NÃO EMBRIOGÊNICAS DE <i>Guadua chacoensis</i>.	39
5.1	RESUMO	39
5.2	INTRODUÇÃO.....	39
5.3	METODOLOGIA.....	40
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.5	CONCLUSÃO.....	43
6.	CAPÍTULO 4 - CRIOPRESERVAÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES DE <i>Guadua chacoensis</i> E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	45
6.1	RESUMO	45
6.2	INTRODUÇÃO.....	46

6.3	METODOLOGIA.....	46
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.5	CONCLUSÃO.....	49
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52

1. JUSTIFICATIVA E ANTECEDENTES

Duas rotas morfogênicas *in vitro* podem ser utilizadas na micropropagação de bambu: a organogênese e a embriogênese somática (ES). A ES representa um método robusto e confiável, que permite a propagação clonal com menores custos, mão-de-obra e tempo, além de representar uma forma de conservação de bambus. Para os bambus que são plantas de difícil propagação e que apresentam produção irregular de sementes, métodos de cultivo *in vitro* representam uma excelente alternativa para a sua propagação em larga escala.

A fim de identificar e auxiliar na superação dos gargalos científicos e tecnológicos da cadeia produtiva de bambus, desde 2013 diferentes estudos e estratégias de micropropagação de espécies de bambus importantes para a região sul foram desenvolvidos no âmbito do projeto intitulado “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil” (Chamada MCTI/ Ação Transversal/ CNPq N.º 66/2013), sob coordenação do Professor Dr. Miguel Pedro Guerra. Diversos trabalhos foram gerados como resultado deste projeto, majoritariamente com protocolos de organogênese. Entretanto, para a ES a necessidade de estudos é iminente, uma vez que poucas são as espécies com protocolos estabelecidos, sendo a maioria dos gêneros *Bambusa*, *Dendrocalamus* e *Phyllostachys* e, ainda, poucos são os estudos relacionando aspectos morfoanatômicos, bioquímicos e moleculares ao processo de ES de bambus.

Assim, a presente tese teve como objetivo descrever e caracterizar os processos de ES e de criopreservação de *Guadua chacoensis* utilizando abordagens morfoanatômicas e bioquímicas.

1.1 BAMBUS: CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E ESPÉCIE DE ESTUDO

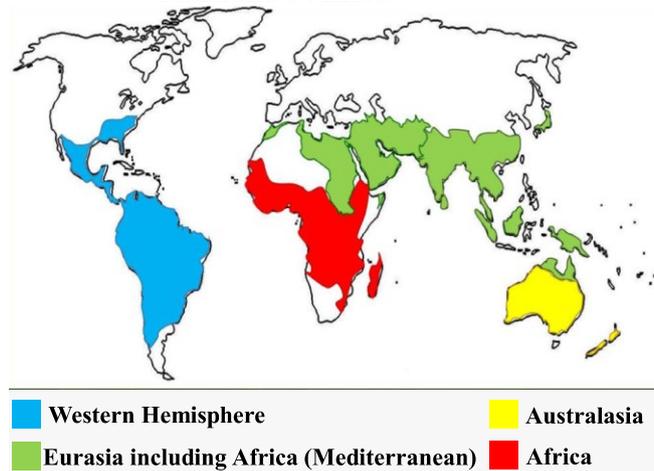
Bambus são plantas extraordinárias conhecidas como o ouro verde da floresta, apresentando-se como uma importante fonte renovável para a produção de papel, combustíveis, indústria têxtil, madeira, madeira compensada, construção civil, artesanato, bem como alimentos (THAPA *et al.*, 2018). Pela sua diversidade de usos os bambus também são plantas de múltiplos usos (CLARK; LONDOÑO; RUIZ-SANCHEZ, 2015), que também pode ser utilizada na mitigação das mudanças climáticas uma vez que são capazes de sequestrar o

carbono atmosférico de forma igual ou superior a taxa observada em árvores de crescimento rápido (LOU *et al.*, 2010).

Os bambus (subfamília Bambusoideae) correspondem ao terceiro maior grupo da família das gramíneas (Poaceae), apresentando cerca de 1670 espécies identificadas no mundo (SORENG *et al.*, 2017). Estas espécies são agrupadas em 3 tribos e 125 gêneros com base em suas características moleculares e morfológicas: Arundinarieae - bambus lignificados temperados (581 espécies; 31 gêneros), Bambuseae - bambus lignificados tropicais (966 espécies; 73 gêneros), e Olyrea - bambus herbáceos (123 espécies; 21 gêneros) (KELCHNER; BPG, 2013; CLARK; LONDOÑO; RUIZ-SANCHEZ, 2015; SORENG *et al.*, 2017).

Eles apresentam distribuição global (Figura 1), com exceção da Antártica e Europa e difundem-se tanto em zonas tropicais como subtropicais, podendo habitar desde áreas de florestas do tipo temperadas decíduas, de planície tropicais, de coníferas até áreas montanhosas e úmidas (AKINLABI; ANANE-FENIN; AKWADA, 2017). A maior biodiversidade de bambus está na Ásia-Pacífico seguido da América do Sul, a qual compreende cerca de 40% das espécies de bambus identificadas no mundo (KELCHNER; BPG, 2013; BASAK *et al.*, 2021).

Figura 1. Distribuição global dos bambus no hemisfério Oeste - Américas, Eurásia, Austrália e África.



Fonte: BASAK *et al.*, (2021).

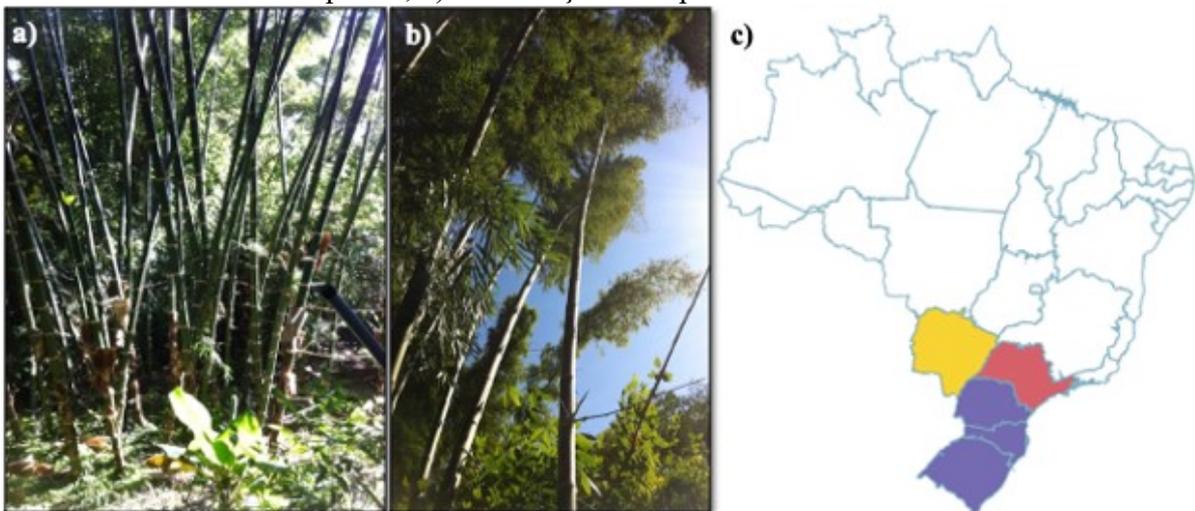
O Brasil é um dos países com maior ocorrência natural de bambus das Américas apresentando cerca de 258 espécies identificadas divididas em 35 gêneros, e destas espécies 165 são endêmicas, bem como 17 gêneros, sugerindo um alto grau de endemismo. Na região Sul são encontradas 63 espécies de bambus, sendo 45 endêmicas, enquanto no estado de Santa

Catarina foram catalogadas um total de 44 espécies, das quais 36 são endêmicas (35 da tribo Bambuseae e 1 da tribo Olyreae) (GRECO; PINTO; TOMBOLATO, 2015).

A tribo Bambuseae compreende os bambus lignificados neotropicais, incluindo as subtribos Arthrostylidiinae, Chusqueinae e Guaduinae, no qual estão inseridos os bambus com ocorrência natural entre o México, América Central e América do Sul (CLARK; LONDOÑO; RUIZ-SANCHES, 2015). Dentre da subtribo Guaduinae, encontram-se o gênero *Guadua*, que corresponde ao gênero com maior importância econômica direta das Américas (CLARK; LONDOÑO; RUIZ-SANCHES, 2015), compreendendo aproximadamente 38 espécies de bambus lignificados os quais podem alcançar 30 metros de altura e 20 centímetros de diâmetro, sendo os maiores bambus da América tropical (AKINLABI; ANANE-FENIN; AKWADA, 2017).

Dentro deste gênero está a espécie alvo desta tese, o *Guadua chacoensis* (Figura 2a, b), uma espécie de bambu naturalmente encontrada na Argentina, Paraguai, Bolívia e Brasil, e com distribuição no Brasil nos 3 estados do Sul: Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, no Sudeste, no estado de São Paulo e no Centro Oeste, no Mato Grosso do Sul (Figura 2c) (LONDOÑO; PETERSON, 1992; SHIRASUNA *et al.*, 2020).

Figura 2. *Guadua chacoensis*. a) destaque para os colmos; b) destaque para a altura da planta; c) distribuição da espécie no Brasil.



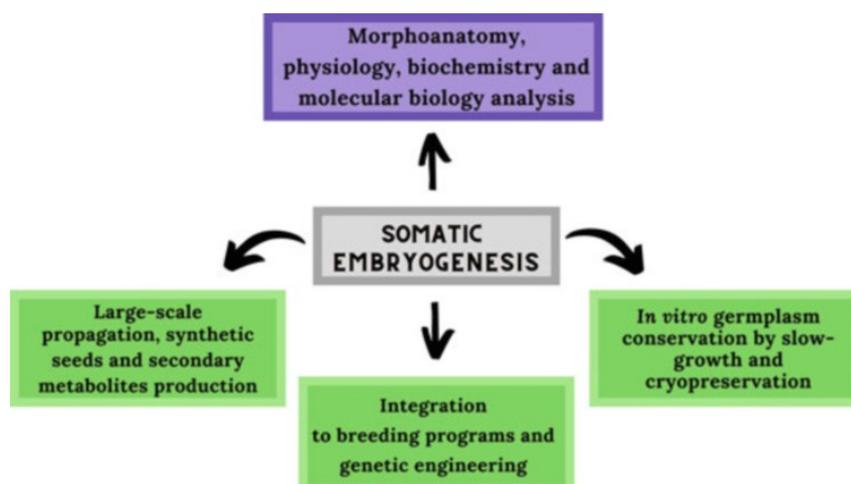
Fonte: autora (a, b) e SHIRASUNA *et al.*, 2020 (c).

1.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática (ES) é resultado de uma complexa reprogramação genética e de sinalização celular (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Neste processo, células mesmo que já diferenciadas, ao receberem os estímulos adequados, tais como adição de reguladores de crescimento ou indução de estresse, se tornam competentes, readquirindo a totipotência e passam então a ter a capacidade de desenvolver embriões somáticos (FÉHER, 2008; WÓJCIK; WÓJCIKOWSA; GAJ, 2020). Embora ela seja conhecida como a verdadeira expressão da totipotência em plantas, é importante enfatizar que as células só são capazes de expressar a totipotência quando recebem os estímulos adequados (FÉHER, 2019).

Esta rota morfo genética se apresenta como uma ferramenta fundamental para a propagação clonal em larga escala, bem como para o melhoramento genético, para a preservação de germoplasma, por meio da criopreservação e para a produção de sementes sintéticas (NIC-CAN *et al.*, 2016) (Figura 3). Além disso, a ES apresenta vantagens em relação a organogênese pois permite a produção de muitos embriões em um espaço reduzido e com menores chances de contaminação dos materiais (JIMÉNEZ, 2001). Do mesmo modo, a ES é uma excelente ferramenta para a realização de estudos nas mais diferentes áreas de conhecimento, uma vez que compreende variações fisiológicas, morfoanatômicas, bioquímicas, genéticas e moleculares (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019) (Figura 3).

Figura 3. Aplicações da embriogênese somática.



Fonte: POLESÍ *et al.* (2021).

Embora já se tenham diversos estudos com a ES, ela ainda corresponde a uma das rotas mais investigadas e menos entendidas até o momento (FEHÉR, 2015). Para os bambus, esta rota continua sendo a menos explorada, apresentando protocolos para menos de 30 espécies de bambus, em sua maioria dos gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus* (POLESI *et al.*, 2021), demonstrando a importância de novos estudos.

A regeneração de plantas por meio de ES envolve múltiplos passos, incluindo: a) indução de calos (rota indireta) ou de culturas embriogênicas (rota direta), no qual o uso de altas concentrações de auxina e de diferentes condições de estresses, incluindo a excisão do explante, estimulam a desdiferenciação, expressão da totipotência e/ou definição do destino celular das culturas; b) proliferação ou multiplicação das culturas embriogênicas, em geral utilizando concentrações reduzidas de auxina; c) maturação dos embriões somáticos, por meio do cultivo em meio de cultura sem adição de fitorreguladores ou suplementado com ABA e potencial osmótico reduzido; d) conversão dos embriões e desenvolvimento das plântulas (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

1.2.1 Fatores que afetam a etapa de indução da ES

Na fase da indução da ES a composição do meio de cultura, os tipos e concentrações de fitorreguladores, o tipo de secção/excisão realizado no explante, bem como outros tipos de estresse são fatores determinantes para a ativação das cascatas de sinalização e de reprogramação genética que levam a resposta embriogênica (MENDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

Quanto a concentração de fitorreguladores no meio de cultura, o uso de uma auxina forte parece estar relacionado com a geração de resposta embriogênica por pelo menos dois motivos: 1) funciona como um estressor; 2) agem alterando os níveis endógenos da auxina ácido 3-indolacético (IAA) (NIC-CAN *et al.* 2016; WÓJCIK; WÓJCIKOWSKA; GAJ, 2020). Altas doses de auxina exógena parecem ser responsáveis pela inativação e degradação do complexo Auxina/Ácido 3-indolacético (Aux/IAA), conhecido como um repressor da biossíntese da auxina, por meio da ligação deste ao complexo SCF e posterior degradação no proteossoma 26S. Com a degradação do inibidor, os fatores de transcrição relacionados com a biossíntese de auxina, conhecido como *Auxin Responsive Factors* (ARFs) se tornam ativos e são

capazes de se ligar a genes-alvo promotores do processo de embriogênese somática (NIC-CAN *et al.* 2016; LI *et al.* 2016; WÓJCIK; WÓJCIKOWSKA; GAJ, 2020).

Além da ativação da biossíntese de auxina, que ocorre pela ativação de genes YUCCA, a expressão de transportadores de auxina, tais como PIN 1, também se mostra essencial para o estabelecimento do gradiente polar de auxina e para a ativação da expressão de Wuschel (WUS) e dos fatores de transcrição relacionados a ele, os WUS-related Homeobox 5 (WOX5) (JIMÉNEZ *et al.* 2001; FEHÉR, 2019; WÓJCIK; WÓJCIKOWSKA; GAJ, 2020). Sabe-se, porém, que após a ativação da biossíntese de auxina endógena, a redução na concentração ou mesmo remoção total da auxina no meio de cultura é fundamental para a posterior formação dos embriões somáticos (FEHÉR, 2019).

Em relação ao uso de excisão do explante, dentre as várias metodologias empregadas se destaca a técnica de TCL (do inglês *thin cell layer*), que corresponde a uma camada fina de tecidos que podem ser oriundas de diferentes órgãos de plantas, incluindo partes florais, rizomas, raízes, caules, regiões apicais, entre outros (VAN, 2003). Seu uso já foi reportado para espécies de bambus dos gêneros *Bambusa* (JULLIEN; TRAN THANH VAN, 1994) e *Dendrocalamus* (NHUT; DA SILVA; VAN LE; 2005), entretanto, nenhum trabalho foi relatado na literatura para bambus do gênero *Guadua*, representando uma possibilidade de estudo inédita com a espécie alvo deste trabalho.

O uso de pré-tratamentos dos explantes com estiolamento (desenvolvimento na ausência de luz) também tem se mostrado como uma boa fonte de estresse, benéfico na resposta embriogênica da Pteridophyta *Cyathea delgadii* (MIKUŁA *et al.*, 2015; GRZYB *et al.*, 2017). Estes autores mostraram que embriões somáticos só foram gerados quando se fez o uso de estiolamento e ainda que esta resposta parece estar relacionada com os conteúdos endógenos de carboidratos e hormônios. Segundo GRZYB *et al.* (2017), explantes estiolados apresentavam menor conteúdo de ABA, hexoses e sacarose, e maiores conteúdos de citocininas e auxinas, sugerindo que este perfil pode ser benéfico na indução de ES. Desta forma, frente as evidências dos benefícios do uso do estiolamento e levando-se em conta que já estávamos realizando estudos relacionando ao uso de estiolamento na organogênese de *G. chacoensis* (POLESI *et al.*, 2019), ficou iminente a possibilidade de se aplicar o estiolamento em colmos pré-estabelecidas *in vitro* e então induzir ES por meio da técnica de TCL.

1.3 ASPECTOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS A ES

A ES é resultado de uma complexa reprogramação genética e de sinalização celular, envolvendo diversas modificações a níveis bioquímicos e moleculares. Através da investigação do conteúdo de hormônios, poliaminas, aminoácidos, carboidratos, atividade de enzimas do sistema antioxidante e proteômica de culturas embriogênicas (EC) e culturas não embriogênicas (NEC) torna-se possível compreender como estas moléculas podem estar relacionadas tanto com a aquisição da competência embriogênica como com as diferentes etapas de formação dos embriões, sendo estes estudos de grande valia para um maior entendimento da rota morfogenética da ES.

1.3.1 Poliaminas

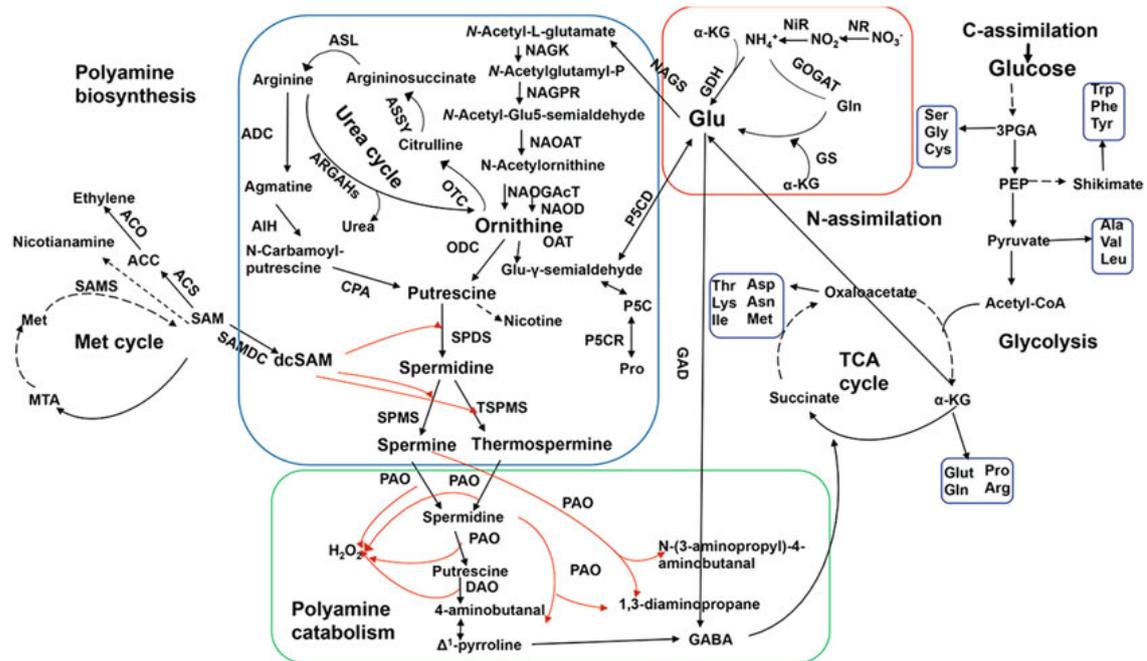
Poliaminas (PAs) são pequenas moléculas alifáticas formadas por dois ou mais grupos de aminas, presentes em todos os organismos vivos, sendo a putrescina (Put), a espermidina (Spd) e espermina (Spm) as três formas de PAs comumente encontradas em plantas (MUSTAFAVI *et al.*, 2018; RAKESH; SUDHEER; NAGELLA, 2021). Elas estão relacionadas com uma variedade de processos biológicos e fisiológicos, uma vez que suas moléculas de natureza policatiônica, são capazes de se ligar a moléculas aniônicas, tais como ácidos nucleicos (DNA e RNA), proteínas, e fosfolipídios de membrana e assim regulam a síntese de proteínas e DNA, expressão gênica, estabilização de membranas, divisão celular, entre outros (CHEN *et al.*, 2019).

A concentração e o tipo de PAs é variável ao longo das diferentes espécies e dos estágios de desenvolvimento, sendo que a quantidade de poliaminas presentes nas células é regulada pela homeostase entre biossíntese, interconversão, catabolismo e interação com outras rotas metabólicas (Figura 4). Sua biossíntese pode ocorrer por meio de duas rotas: a direta, por meio da arginina descarboxilase (ADC) e a indireta por meio da ornitina descarboxilase (ODC). Em ambas as rotas a Put (diamina) corresponde a primeira poliamina formada, e esta serve como precursor para a formação de Spd (triamina) e Spm (tetraamina). A formação de Spd ocorre por meio da adição de um grupamento amino - produzido pela descarboxilação da S-adenosil-metionina (SAM) pela S-adenosil-metionina descarboxilase - a Put por meio da ação de espermidina sintase, e Spm é gerada pela adição subsequente de uma amina a Spd pela

espermidina sintase (MUSTAFAVI *et al.*, 2018). O catabolismo de poliaminas ocorre por meio da atividade enzimática de aminas oxidases e gera como produtos Ácido gama-aminobutírico (GABA), Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO). Além disso, a rota de biossíntese de PAs parece estar diretamente correlacionada com outras rotas metabólicas, incluindo: a) aminoácidos, uma vez que a arginina, ornitina e metionina são precursores da sua biossíntese e indiretamente na síntese de prolina e glutamina; b) hormônios, interagindo na rota de biossíntese do etileno; c) ciclo de ureia, entre outros (WUDDINEH; MINOCHA; MINOCHA, 2018).

Estudos anteriores de quantificação de PAs ao longo do processo de ES tem demonstrado o envolvimento destas moléculas durante a resposta embriogênica. Enquanto a Put parece estar relacionada com as etapas iniciais de divisão celular, a Spd e Spm são geralmente associadas com o crescimento dos embriões e germinação (RAKESH; SUDHEER; NAGELLA, 2021). Entretanto, o balanço entre os níveis de PAs é bastante variável em diferentes espécies, sendo encontrado, por exemplo, aumento dos níveis de Spm associados com a competência embriogênica de cana-de-açúcar (SILVEIRA *et al.*, 2013), enquanto para a Pupunha a resposta embriogênica está associada com a redução nos níveis de PAs (NASCIMENTO-GAVIOLI *et al.*, 2017). Ademais, estudos tem reportado que a razão de Put / Spd+Spm também parece estar relacionado com a resposta embriogênica (NASCIMENTO-GAVIOLI *et al.*, 2017). A presença de diferentes respostas nos níveis de poliaminas em diferentes espécies demonstram a importância da quantificação dos conteúdos endógenos de poliaminas no processo de ES de *G. chacoensis*.

Figura 4. Rotas de biossíntese, catabolismo e anabolismo de PAs bem como sua interação com outras rotas metabólicas.



Fonte: WUDDINEH; MINOCHA; MINOCHA (2018).

1.3.2 Aminoácidos

Os aminoácidos (AA) correspondem a uma categoria de moléculas fundamentais para as células que atuam tanto na biossíntese de proteínas como na síntese de diferentes componentes do metabolismo primário e secundário essenciais para o crescimento das plantas (GALILI; AMIR; GALILI, 2008; HILDEBRANDT *et al.*, 2015).

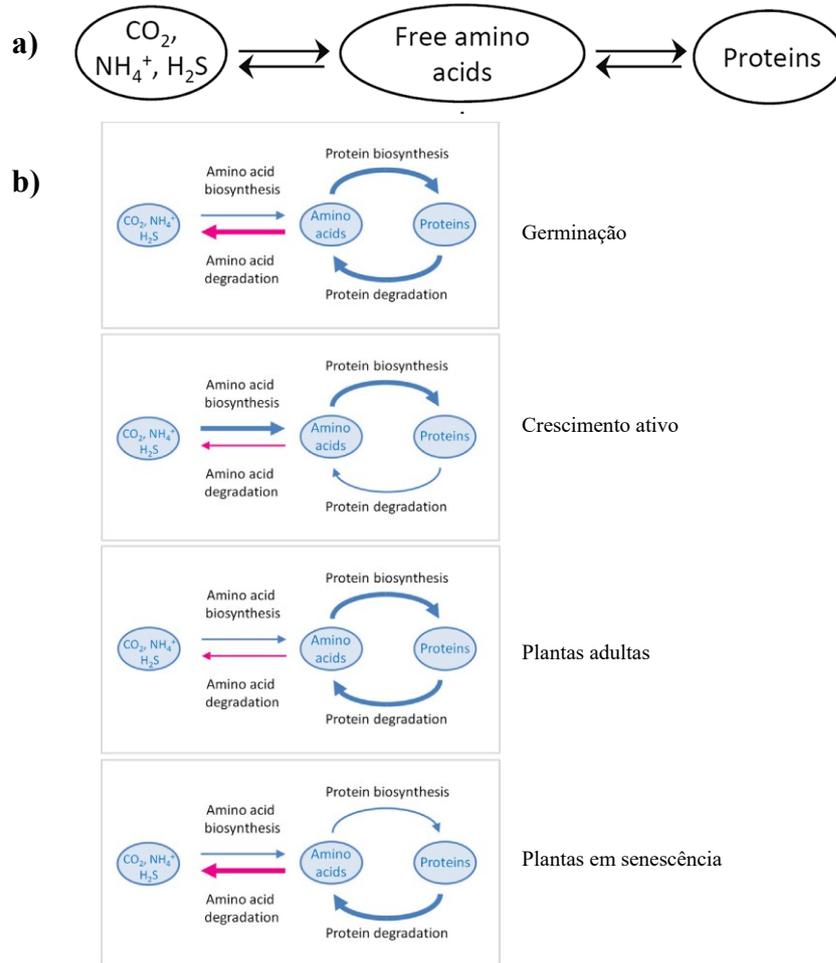
A biossíntese dos AA em plantas parece ser dependente da disponibilidade de nitrogênio (N), carbono inorgânico (C) e enxofre, sendo que a quantidade de AA livres disponível é diretamente influenciada pelo biossíntese de proteínas (Figura 5a) (HILDEBRANDT, 2018). Ademais, a abundância de AA e proteínas parece variar de acordo com as diferentes etapas de desenvolvimento das plantas (Figura 5b). Durante a germinação, proteínas de reserva são degradadas em AA que são utilizadas para a síntese de novas proteínas. Já em células em crescimento ativo espera-se um aumento da biossíntese de AA e de proteínas e uma redução da degradação destes. Em células adultas espera-se uma homeostase entre a biossíntese e degradação de AA e proteínas e, inversamente, em células sob condições extremas

de estresse ou ainda em estágio de senescência observa-se um aumento na degradação de proteínas e de AA (HILDEBRANDT *et al.*, 2015) (Figura 5b).

Aspartato, asparagina, glutamina e glutamato são considerados AA centrais, atuando como precursores na biossíntese dos demais, bem como no transporte de N entre fonte e dreno, no balanço de N em relação ao C e na produção de metabólitos correlacionados ao estresse, tais como prolina, poliaminas e ácido gama-aminobutírico (GABA) (GALILI; AMIR; GALILI, 2008). Outros AA, tais como a prolina, triptofano, metionina e arginina parecem estar mais relacionados com a resposta a condições de estresse, servindo de precursor para a síntese de hormônios e metabólitos secundários (HILDEBRANDT *et al.*, 2015).

Sabe-se que a disponibilidade de AA varia de acordo com o estágio de desenvolvimento e condição fisiológica das células e ainda que os AA estão diretamente correlacionados com a biossíntese de outras importantes moléculas e de proteínas. Frente a isso, acredita-se que a quantificação de AA se apresenta como uma importante ferramenta que pode auxiliar no entendimento do processo de ES.

Figura 5. Biossíntese de AA e suas interações com as proteínas em plantas (a) e ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento das plantas (b).



Fonte: adaptado de HILDEBRANDT (2018) (a) e HILDEBRANDT *et al.* (2015) (b).

1.3.3 Carboidratos

Os carboidratos ou açúcares, constituem moléculas fundamentais para as plantas no cultivo *in vitro*, sendo fonte de energia e de esqueletos carbônicos, além de agirem como moléculas sinalizadoras na expressão de diversos genes, mediam interações com diversos hormônios e estarem associados com respostas a estresse e potencial osmótico (LIPAVSKÁ; KONRÁDOVA, 2004).

A sacarose corresponde a principal fonte de carboidrato utilizada no cultivo *in vitro*, entretanto, a adição de fontes alternativas, tais como maltose, manose, frutose e glucose, associados ou não ao uso de agentes osmorreguladores tais como o PEG tem se mostrado

benéficos em determinadas etapas do ES, especialmente na maturação (LIPAVSKÁ; KONRÁDOVA, 2004).

Estudos anteriores têm sugerido que a razão entre o conteúdo de sacarose em relação aos açúcares do tipo hexoses, incluindo manose, frutose, glucose e galactose, influenciam o tipo de resposta gerada ao longo do processo de ES. A divisão celular e diferenciação parecem ser beneficiadas na presença de um alto conteúdo de hexoses em relação a sacarose, enquanto um aumento de sacarose parece favorecer o armazenamento de carboidratos (BLANC *et al.*, 2002). Entretanto, sabe-se que os teores de carboidratos podem variar ao longo das diferentes fases da ES e de acordo com os tipos de explantes e tratamentos utilizados.

GRZYB *et al.* (2017) demonstraram, por exemplo, que explantes previamente estiolados apresentavam menores níveis de hexoses e sacarose, e que aumentos drásticos foram observados nos níveis de sacarose durante a fase de aquisição de competência embriogênica de *C. delgadii*. Os autores ainda propuseram que este aumento pode ser entendido como um sinal prévio à formação de embriões somáticos.

A quantificação de carboidratos solúveis pode ser realizada por meio de do uso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com o uso do detector de espalhamento de luz evaporativo (ELSD), sendo este um método eficiente que permite a quantificação de até oito carboidratos diferentes: ribose, arabinose, xilose, frutose, manose, glucose, sacarose e maltose.

1.3.4 Atividade enzimática

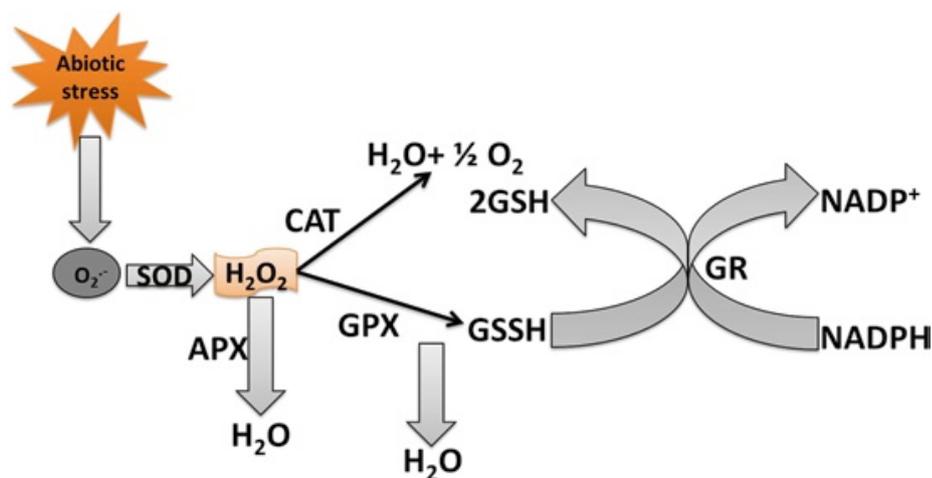
Espécies reativas de oxigênio (EROs/ROS) tais como radicais superóxidos (O_2^-), oxigênio singlete (1O_2), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem ser produzidas espontaneamente como consequência do metabolismo oxidativo dos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, membrana plasmática, retículo endoplasmático, apoplasto ou ainda em respostas a estresse biótico e abiótico (MALIK *et al.*, 2014).

Quando em concentrações adequadas as EROs/ROS atuam como moléculas sinalizadoras, entretanto, quando em excesso podem se tornar tóxicos, levar ao estresse oxidativo e provocar a degradação dos ácidos nucleicos – DNA e RNA, bem como oxidação de proteínas e lipídios (APEL e HIRT, 2004).

Para manter um balanço adequado entre a quantidade de EROs/ROS disponível, as células possuem mecanismos conhecidos como sequestradores de ROS, que podem ser do tipo enzimático e não enzimáticos. Entre os enzimáticos destaca-se a atividade de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR) and guaiacol peroxidase (GPX) (APEL e HIRT, 2004; MALIK *et al.*, 2014).

A ação das enzimas antioxidantes está ilustrada na figura 6. SOD pode ser considerada como o primeiro mecanismo de defesa das EROs/ROS, por ser a responsável por converter o O_2^- em H_2O_2 . A detoxicação subsequente deste H_2O_2 é então realizado pela CAT, APX, GR e GPX (APEL e HIRT, 2004).

Figura 6. Enzimas antioxidantes agindo na detoxicação de EROs/ROS. Superóxido dismutase (SOD) agem na primeira linha de detoxicação, seguido das enzimas Ascorbato Peroxidase (APX), Catalase (CAT), Guaiacol Peroxidase (GPX) e Glutaciona redutase (GR).



Fonte: Malik *et al.*, 2014.

Uma variedade de estudos vem sendo realizados visando compreender a influência das EROs/ROS, bem como a atuação das enzimas antioxidantes no processo de ES. Sabe-se, por exemplo, que a geração de EROs/ROS, tais como H_2O_2 pode ser benéfico durante a resposta embriogênica, agindo como sinalizador secundário e ainda que um aumento na atividade de enzimas tais como SOD, CAT e APX podem estar relacionados com a diferenciação e formação de embriões (ZHANG *et al.*, 2010). Entretanto, pouco se sabe a respeito de como as células

mantêm a homeostase entre a produção de ROS e ativação de mecanismos de defesa durante a ES, evidenciando a necessidade de estudos.

1.3.5 Proteômica

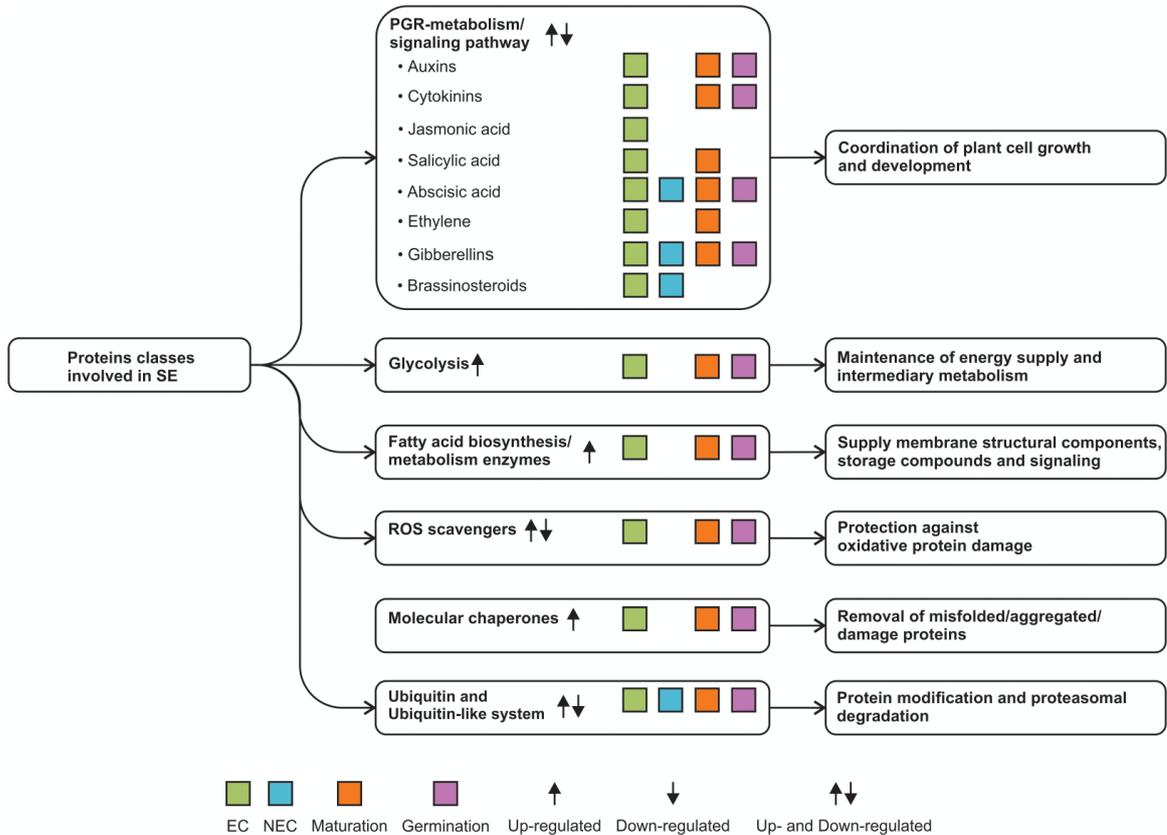
Entende-se por proteômica o estudo do total de proteínas presentes em um dado sistema *i.e.*, células, tecido, órgão, genoma, entre outros, em um determinado estágio de desenvolvimento e condição (JORRIN-NOVO, 2013; JORRIN-NOVO, 2021). Espera-se por meio das análises de proteômica compreender como as proteínas são produzidas pelas células, quais as interações que ocorrem entre elas e com outras moléculas, como elas agem em um determinado estágio de crescimento e desenvolvimento das plantas e ainda como elas interagem quando estão sob condições de estresse bióticos e abióticos (JORRIN-NOVO, 2013).

Num conceito de biologia de sistemas, os estudos de proteômica tem se mostrado fundamentais para o entendimento dos processos como um todo, uma vez que as proteínas representam a parte funcional de um genoma (DNA-RNA-Proteína) (WRINGHT *et al.* 2012; THAPA *et al.*, 2018). Entretanto, vale salientar que o proteoma das células é bastante dinâmico, e as análises de proteômica refletem o perfil de proteínas daquele determinado momento, sendo equivalente a uma foto do que está acontecendo (GUPTA *et al.*, 2015).

Análises proteômicas ao longo do processo de ES tem recebido atenção nos últimos anos, e algumas classes de proteínas são atualmente sugeridas como possíveis marcadores do processo de ES (Figura 7), incluindo: i) proteínas relacionadas com a rotas de sinalização de hormônios; ii) proteínas do metabolismo energético e de carboidratos; iii) proteínas relacionadas ao transporte celular e formação de parede celular; iv) proteínas de resposta a estresse e detoxicação celular; v) proteínas de choque térmico – heat shock proteins; vi) proteínas de regulação, tais como as ubiquitinas, vii) proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios, entre outros (AGUILAR-HERNÁNDEZ; LOYOLA-VARGAS, 2018; HERINGER; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2018).

Frente as vantagens que a proteômica oferece, a análise de proteômica entre EC e NEC pode ser de grande valia na elucidação das alterações em nível de proteínas relacionadas com a competência embriogênica de *G. chacoensis*.

Figura 7. Principais classes de proteínas envolvidas com as diferentes etapas da ES. Quadrados verde, azul, laranja e roxo indicam culturas embriogênicas, culturas não embriogênicas, maturação e germinação. Setas para cima indicam up-regulação enquanto setas para baixo indicam down-regulação de proteínas.



Fonte: AGUILAR-HERNÁNDEZ; LOYOLA-VARGAS (2018).

1.4 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação, ou conservação de materiais biológicos em temperaturas ultrabaixas (-196°C), normalmente acondicionado em nitrogênio líquido, apresenta como vantagens a conservação do material em espaços reduzidos, protegidos de contaminações e com necessidade de manutenção mínima (ENGELMANN, 2004). Esta técnica pode auxiliar na manutenção de calos embriogênicos de forma segura e por períodos mais longos. Isso porque os calos embriogênicos requerem subcultivos frequentes para evitar perda de potencial embriogênicos e capacidade de proliferação, o que torna a manutenção cara e ainda aumenta os riscos de contaminação e perda de material devido ao excesso de manipulação (LAMBARDI; OZUDOGRU; BENELLI; 2008).

A criopreservação corresponde a uma excelente alternativa para a conservação de materiais vegetais de interesse por longos períodos pois acredita-se que sob estas condições os processos fisiológicos, bioquímicos e metabólicos são paralisados e ainda que se tem uma manutenção da estabilidade genética (OCHATT *et al.*, 2021; PANIS; LAMBARDI, 2006). Entretanto, o sucesso de um protocolo de criopreservação está diretamente relacionado com a não formação de cristais de gelo intracelulares, uma vez que estes podem levar à ruptura das membranas e colapso celular (HERINGER *et al.*, 2013).

Diferentes metodologias vêm sendo utilizadas visando criopreservar culturas *in vitro*. Dentre estas, destaca-se o protocolo proposto por MUSTAFA *et al.* (2011) de congelamento em dois passos que utiliza soluções crioprotetoras de baixa molaridade, que são menos tóxicas para as células, reduzindo as chances de colapso celular, e utiliza o crio container Mr. Frosty (Nalgene®) para realizar o congelamento lento das culturas, sendo a eficiência deste protocolo anteriormente relatada durante a criopreservação de suspensões celulares de *Araucaria angustifolia* (FRAGA *et al.*, 2015), por exemplo.

Uma vez que poucos são os trabalhos relatando o uso de criopreservação em bambu e frente as necessidades de se encontrar formas de conservação de germoplasma desta espécie, o estabelecimento de protocolos de criopreservação se mostra essencial.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e elucidar as alterações morfoanatômicas e bioquímicas relacionadas com a embriogênese somática e criopreservação de *Guadua chacoensis* (Bambusoideae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar durante a indução da embriogênese somática a influência do uso de diferentes doses da auxina Picloram e de regiões do explantes, pré-tratados ou não com estiolamento, na aquisição de competência embriogênica.
- Caracterizar morfoanatomicamente as etapas de indução, multiplicação e maturação da embriogênese somática.
- Quantificar e analisar o conteúdo endógeno de poliaminas, aminoácidos, carboidratos e atividade enzimática de culturas embriogênicas e não embriogênicas.
- Compreender o papel regulatório de proteínas no processo de embriogênese somática de *G. chacoensis* por meio da análise de proteômica comparativa de culturas embriogênicas e não embriogênicas.
- Desenvolver um protocolo eficiente de criopreservação de *G. chacoensis* e avaliar a atividades de enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo.

3. CAPÍTULO 1 – SOMATIC EMBRYOGENESIS IN BAMBOOS: ADVANCES AND PROSPECTS ¹

Embriogênese somática em bambus: avanços e perspectivas

Os bambus correspondem a um dos maiores grupos das Poaceae, com mais de 1600 espécies distribuídas no mundo e apresentam uma infinidade de uso. Para os bambus, a micropropagação por meio de Embriogênese Somática (ES) vem sendo bastante negligenciada, devido a sua complexidade, apresentando protocolos estabelecidos para apenas cerca de 30 espécies ao longo de 38 anos de estudos, desde o estabelecimento do primeiro protocolo em 1982. Além disso, boa parte destes trabalhos tem se concentrado em apenas dois gêneros, *Bambusa* e *Dendrocalamus*, que juntos somam aproximadamente 65% dos estudos de ES em bambus. Frente a isso, este capítulo de revisão tem como objetivo apresentar e discutir os principais avanços, dificuldades e oportunidades da ES em bambus explorando a linha do tempo, abordagens morfoanatômicas, abordagens bioquímicas, abordagens moleculares e estratégias de conservação *in vitro*. Dentre os principais avanços obtidos destacam-se o estabelecimento de suspensão celulares, o isolamento de protoplastos, estudos de análise de fidelidade genética e de transformação genética associados a ES, obtenção de estratégias de conservação tais como o uso de crescimento lento e a produção de sementes sintéticas, caracterização do perfil de proteínas, isoenzimas e aminoácidos. Entre as principais limitações destacam-se: 1) a necessidade do estabelecimento de protocolos mais eficientes, com maiores taxas de regeneração de plantas; 2) a necessidade de aumentar o número de protocolos disponíveis para espécies relevantes de bambus; 3) a limitação de informações a respeito da caracterização morfoanatômica da ES em bambus, bem como a inexistência de um trabalho que mostre todos os estágios de desenvolvimento (globular, coleoptilar, estágio juvenil, maduro); 4) a necessidade de novos estudos caracterizando a ES por meio das técnicas ômicas – proteômica, metabolômica, transcriptômica; e 5) necessidade do estabelecimentos de protocolos de criopreservação. Os bambus apresentam diversas peculiaridades e complexidades e acredita-se que a elucidação dos mecanismos envolvidos com a ES de bambus podem trazer grandes ganhos tanto para os estudos fundamentais como para a cadeia produtiva de bambus.

Palavras-chave: Biotecnologia de bambus; morfoanatomia; bioquímica; fidelidade genética

¹ Capítulo de revisão publicado no livro *Biotechnological Advances in Bamboo*. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-1310-4_4

4. CAPÍTULO 2 – MORPHOHISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE *Guadua chacoensis* (BAMBUSOIDEAE; POACEAE) SOMATIC EMBRYOGENESIS²

Aspectos morfohistológicos e bioquímicos da embriogênese somática de Guadua chacoensis (Bambusoideae; Poaceae)

4.1 RESUMO

Neste trabalho fez-se a descrição e caracterização das etapas de indução, multiplicação e maturação da embriogênese somática (ES) de *Guadua chacoensis* utilizando abordagens morfoanatômicas e bioquímicas. Os resultados evidenciaram que o uso de 400 µM de Picloram, explantes pré-tratados com estiolamento e região da base do colmo resultaram em 87,5% de indução de calos, representando a melhor combinação. Durante a multiplicação foi possível identificar a formação de culturas embriogênicas (EC) e não embriogênicas (NEC), sendo que somente as EC foram capazes de maturar quando em meio de cultura livre de Picloram e com adição de carvão ativado. A caracterização bioquímica revelou que EC apresentam maiores conteúdos de espermidina, arginina, metionina, maltose e manose em relação as NEC, sugerindo que estas moléculas podem ter atuação importante durante a ES de *G. chacoensis*. Este trabalho representa um avanço para a ES de bambus, bem como para a propagação e conservação, podendo servir de modelo para trabalhos futuros em bambus e monocotiledôneas em geral.

Palavras-chave: competência embriogênica; embrião somático; Picloram.

4.2 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática (ES) é conhecida como a verdadeira expressão da totipotência em plantas (FEHÉR, 2019). Neste processo, células já diferenciadas readquirindo a totipotência e passam então a ter a capacidade de desenvolver embriões somáticos (NIC-CAN *et al.*, 2016; WÓJCIK *et al.*, 2020). Entretanto, esta rota morfogenética de desenvolvimento corresponde a menos estudada para bambus, sendo encontrados protocolos para apenas aproximadamente 30 espécies entre as mais de 1600 identificadas no mundo (POLESI *et al.*,

² Artigo publicado no periódico Plant Cell, Tissues and Organ Culture (PCTOC).
doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02199-9>

2021). Para a espécie de estudo do presente trabalho, *Guadua chacoensis*, um bambu lignificado da tribo Bambusoideae, nenhum estudo foi reportado até o momento.

O processo de ES envolve múltiplas etapas incluindo indução, multiplicação, maturação e conversão de plântulas (VON ARNOLD *et al.*, 2002). A etapa de indução geralmente envolve o uso de condições de estresse e suplementação de auxina no meio de cultura (WÓJCIK *et al.*, 2020). Acredita-se que o uso de condições de estresse é necessário para a reprogramação celular e das rotas de transdução de sinal para a geração da resposta embriogênica (NIC-CAN *et al.*, 2016). Ademais, o tipo de explante e de excisão utilizados também influenciam diretamente a indução de ES, sendo que estudos tem demonstrado que o uso de pré-tratamento dos explantes com estiolamento (MIKUŁA *et al.*, 2015; GRZYB *et al.*, 2017), bem como da técnica de excisão de camada fina (do inglês *thin cell layer* – TCL) (JULLIEN AND TRAN THANH VAN 1994) tem se mostrado benéfico na aquisição de competência embriogênica.

ES envolve uma série de mudanças em nível fisiológico, bioquímicos e moleculares, representando um excelente modelo de estudos (NIC-CAN *et al.*, 2016; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Estudos morfohistológicos podem auxiliar no maior entendimento das alterações morfológicas e celulares relacionadas ao desenvolvimento embriogênico (POLESI *et al.*, 2021). A caracterização bioquímica de culturas embriogênicas (EC) e culturas não embriogênicas (NEC) por meio da quantificação do conteúdo de poliaminas, aminoácidos e carboidratos podem auxiliar na identificação de possíveis marcadores de resposta embriogênica, bem como demonstrar o envolvimento destas moléculas com a rota de ES (NASCIMENTO-GAVIOLI *et al.*, 2017).

Aspectos gerais e específicos da ES em bambus foram revisados por Polesi *et al.*, (2021). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de ES para o bambu *G. chacoensis*, bem como descrever e caracterizar a resposta embriogênica por meio de análises morfoanatômicas e bioquímicas.

4.3 METODOLOGIA

Colmos de *G. chacoensis* previamente estabelecidos em *in vitro* foram submetidos ao pré-tratamento em diferentes condições de luz (luz ou escuro total – estiolamento) conforme descrito por POLESI *et al.*, 2019, com modificações. Em seguida, estes explantes foram utilizados para a indução da ES. Primeiramente testou-se o uso de TCL da região basal dos colmos (3-5 mm) e oito concentrações diferentes de Picloram: (1) 0 μM ; (2) 100 μM ; (3) 200

μM ; (4) 300 μM ; (5) 400 μM ; (6) 500 μM ; (7) 600 μM ; (8) 700 μM . O meio de indução era composto por sais MS suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}), vitaminas de Morel (2 mL.L^{-1}), glutamina (1 g.L^{-1}), carvão ativado (1,5 g.L^{-1}) e phytigel (2 g.L^{-1}). Os explantes foram seccionados por TCL longitudinal e inoculados em placas de petri contendo 25 mL do meio e mantidos no escuro, em BOD a 22 ± 2 °C. Avaliou-se a taxa de indução de calos, de oxidação e de explantes sem resposta aos 30 e 60 dias após a inoculação. Num segundo experimento avaliou-se o uso de diferentes regiões do colmo de *G. chacoensis* para a indução da ES: base (3-5 mm do primeiro entrenó), meio (3-5 mm do segundo entrenó), topo (3-5 mm do último entrenó). Os procedimentos de excisão e o meio de cultura foram os mesmos que descritos acima, exceto que neste caso experimento a concentração de Picloram foi fixada em 400 μM . Avaliou-se a taxa de indução de calos, de oxidação e de explantes sem resposta aos 30 e 60 dias e fez-se a coleta de materiais aos 0, 3, 6, 12, e 15 dias após a inoculação a fim de realizar a caracterização ontológica de formação dos calos. Ambos os experimentos foram realizados em sistema fatorial inteiramente casualizado, utilizando 4 repetições com unidade experimental de 10 explantes por placa. Os dados foram analisados utilizando ANOVA seguido de teste de separação de médias Student-Newman-Keuls (SNK) a 5%.

Os calos obtidos nas fases de indução foram então transferidos a multiplicação. Nesta etapa o meio de cultura era composto por MS suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}), vitaminas de Morel (2 mL.L^{-1}), glutamina (1 g.L^{-1}), phytigel (2 g.L^{-1}) e as concentração de Picloram foram reduzidas para 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 μM . Os materiais foram subcultivados a cada 45 dias. Durante a fase de multiplicação os calos foram categorizados em dois grupos de acordo com a morfologia: 1) embriogênicos: compacto, nodular e com coloração amarelada; 2) não embriogênicos: friável e macios com coloração amarelo esbranquiçado, e materiais foram coletados para microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de luz. Além disso, ECs e NECs foram coletadas para as análises bioquímica de poliaminas (200 mg), aminoácidos (200 mg) e carboidratos (300 mg), e os dados obtidos foram analisados utilizando Student's t-test a 5% de significância.

Culturas embriogênicas obtidas no tratamento de 20 μM foram transferidas para a etapa de maturação, na qual utilizou-se o meio de cultura MS suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}), vitaminas de Morel (2 mL.L^{-1}), glutamina (1 g.L^{-1}), carvão ativado (1,5 g.L^{-1}) e phytigel (2 g.L^{-1}). Os materiais foram inoculados em frascos do tipo microbox, que permite a troca gasosa, e mantidos sob luz LED branca, com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro, a 25 ± 2 °C por 45 dias. Após este período culturas foram coletadas para a caracterização morfohistológica.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de indução de ES revelaram que explantes da base e submetidos ao estiolamento apresentaram maior taxa de indução de calos (87,5%) comparado com os explantes pré-tratados com luz (55%). Conforme evidenciado em estudos anteriores, o uso de estiolamento parece ser benéfico para a reprogramação celular e aquisição da competência embriogênica (MIKUŁA *et al.*, 2015; GRZYB *et al.*, 2017). Ademais, no presente estudo, o uso de estiolamento juntamente com altas doses de Picloram e excisão por TCL parece funcionar como fonte de estresse que levam a resposta embriogênica.

Os estudos de ontogenia revelaram que os calos possuem origem perivascular (Figura 8), ou seja, que se formam a partir dos feixes vasculares do explante inicial, estando de acordo com o reportado em estudos anteriores em bambus (JULLIEN; TRAN THANH VAN, 1994; GODBOLE *et al.*, 2002) e palmeiras (STEINMACHER *et al.*, 2007; de CARVALHO SILVA *et al.*, 2014). A caracterização morfohistológica revelou a formação de calos primários 30 dias e de proembriões aos 60 dias após a inoculação nos calos obtidos a partir de explantes estiolados, indicando um rápido desenvolvimento.

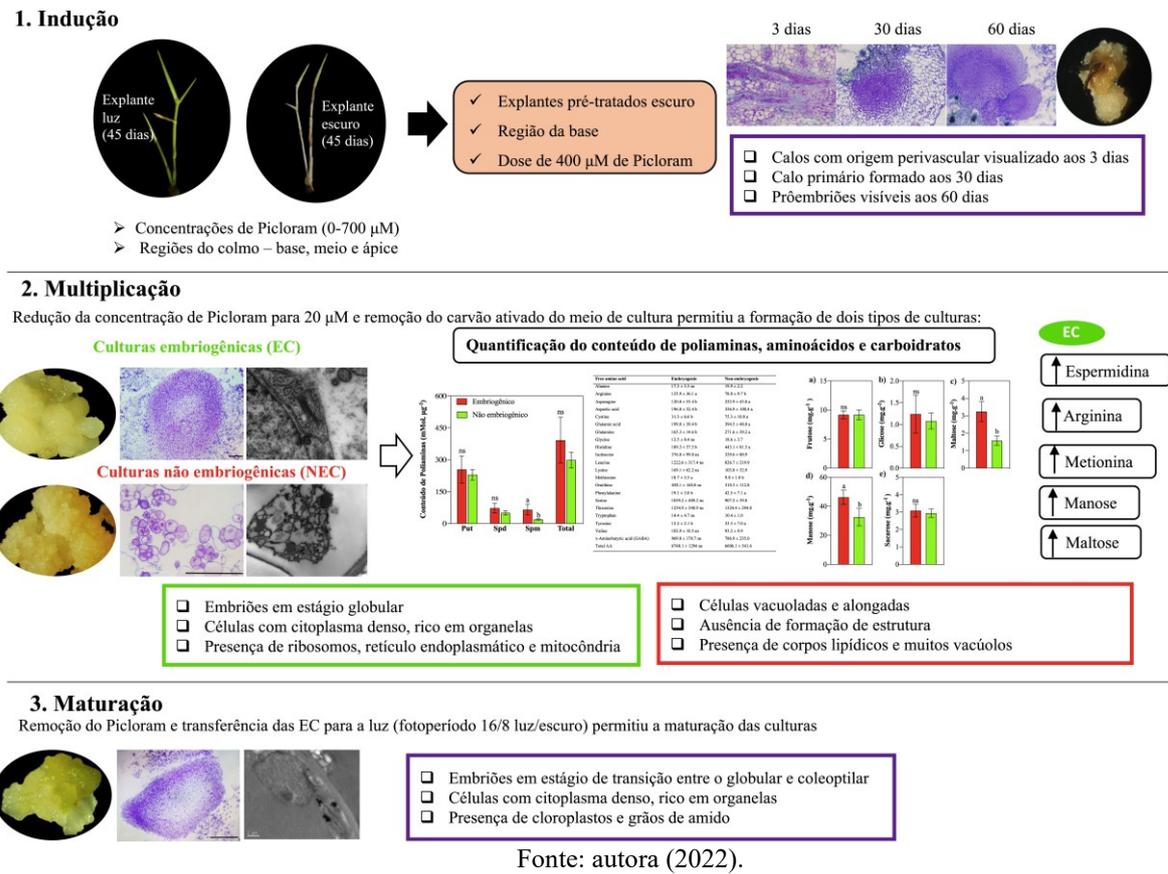
Durante a fase de multiplicação observou-se a formação de EC e NEC após a redução da concentração de Picloram (Figura 8). Sabe-se que altas doses de auxina são essenciais durante a indução da ES, mas que uma vez que estímulo para a reprogramação genética das células seja gerado, a redução ou mesmo remoção é necessária para a expressão da ES (JIMÉNEZ, 2001; FEHÉR, 2019). A caracterização histológica (Figura 8) revelou que EC possuíam embriões em estágio globular de desenvolvimento, apresentando células com citoplasma denso, rico em organelas e com presença de ribossomos, retículo endoplasmático e mitocôndrias. Por outro lado, NEC apresentavam células alongadas e vacuoladas, sem formação de estruturas e com presença de corpos lipídicos e muitos vacúolos. Estes resultados indicaram que a categorização das culturas em EC e NEC no presente estudo estavam de acordo com o reportado na literatura (SILVEIRA *et al.*, 2013; de ARAÚJO SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019).

EC foram capazes de maturar quando transferidas para meio de cultura livre de Picloram e com adição de carvão ativado. Histologicamente estas culturas encontravam-se no estágio transicional entre o globular e o coleoptilar, apresentando citoplasma denso, rico em organelas e com presença de grãos de amido e cloroplastos (Figura 8). Entretanto, assim como reportado previamente em outros trabalhos com bambus (JULLIEN AND TRAN THANH

VAN, 1994; MARULANDA *et al.*, 2005; KOMATSU *et al.*, 2011), a conversão e regeneração de plantas não foram alcançados neste trabalho, evidenciando a necessidade de novos estudos.

A caracterização bioquímica revelou que EC apresentaram maiores conteúdos de espermidina, arginina, metionina, maltose e manose em relação a NEC (Figura 8), sugerindo que a resposta embriogênica é resultado de uma complexa interação entre poliaminas, aminoácidos e carboidratos e que estas moléculas podem ter atuação importante na ES de *G. chacoensis*.

Figura 8. Resumo gráfico dos principais resultados obtidos neste trabalho. A indução de calos foi alcançada utilizando explantes pré-tratados com estiolamento, região da base e 400 µM de Picloram. Durante a fase de multiplicação ocorreu a formação de culturas embriogênicas (EC) e não embriogênicas (NEC) e a caracterização bioquímica revelou acúmulos de espermidina, arginina, metionina, manose e maltose em EC. Somente as EC foram capazes de maturar após a remoção do Picloram, adição de carvão ativado e transferência para a luz.



5. CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DE PROTEÔMICA COMPARATIVA E DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS E NÃO EMBRIOGÊNICAS DE *Guadua chacoensis*.

5.1 RESUMO

Este trabalho teve por objetivo identificar possíveis proteínas marcadores da resposta embriogênica em *G. chacoensis*, por meio da análise de proteômica comparativa de culturas embriogênicas (EC) e culturas não-embriogênicas (NEC), bem como caracterizar o metabolismo oxidativo destas culturas por meio da quantificação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e dos conteúdos de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA). Como resultados foram identificadas um total de 855 proteínas, das quais 37 foram expressas unicamente nas EC e 22 nas NEC. Ademais, 265 proteínas apresentaram regulação diferencial em EC em relação a NEC, sendo 129 up-reguladas e 136 down-reguladas. EC apresentaram acúmulo de proteínas relacionadas com a resposta a estresse, detoxicação celular, translacionais e ribossomais, do metabolismo de carboidratos, formação de parede e transdução de sinal e exibiram maior atividade das enzimas SOD e GPX e maior conteúdo de H₂O₂. Estes resultados sugerem que a resposta embriogênica de *G. chacoensis* parece estar relacionada com uma complexa regulação do estresse para que ocorra inicialmente a reprogramação das células e aquisição de competência embriogênica, e que uma vez que esta é adquirida, as proteínas de sinalização, ribossomais e translacionais, do metabolismo de carboidratos e de formação de parede asseguram o desenvolvimento do embrião. Por fim, este trabalho trouxe evidências do envolvimento de alguns grupos de proteínas e de enzimas antioxidantes com a geração de resposta embriogênica em *G. chacoensis*.

Palavras-chave: bambu; embriogênese somática; estresse; espécies reativas de oxigênio.

5.2 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática (ES) demonstra a capacidade das células de readquirirem totipotência e passarem a formar embriões somáticos (FEHÉR, 2008). Este processo envolve diversas alterações em nível genético e epigenético, sendo que os estudos de proteômica têm ganhado bastante atenção nos últimos anos e têm contribuído com avanços no entendimento de

fatores fisiológicos e moleculares que controlam a ES (AGUILAR-HERNÁNDEZ e LOYOLA-VARGAS 2018; HERINGER *et al.*, 2018).

Entende-se por proteômica a ciência que estuda o total de proteínas presente em um dado sistema biológico, incluindo células, tecidos, órgãos, genomas e outros (JORRIN-NOVO, 2014; JORRIN-NOVO, 2021). Entretanto, para bambus, que apresentam uma diversidade de usos (CLARK; LONDOÑO; RUIZ-SANCHEZ, 2015) e correspondem a um dos maiores grupos da família das gramíneas (Poaceae), subfamília Bambusoideae (LONDOÑO *et al.*, 1992), não existem estudos reportados de proteômica associado ao ES, demonstrando a importância de novos estudos (POLESI *et al.*, 2021).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é considerada como um importante estímulo durante a geração da resposta embriogênica (ELHITI e STASOLLA 2015). Entretanto, um balanço entre a produção e sequestro destas EROs – que é realizado por enzimas antioxidantes tais como Superóxido dismutase (SOD), Guaiacol peroxidase (GPX), Ascorbato peroxidase (APX) e Catalase (CAT), é essencial para a manutenção da homeostase celular durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, uma vez que quando em excesso as EROs se tornam tóxicas as células (MALIK *et al.*, 2014).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar proteínas marcadores da resposta embriogênica de *G. chacoensis*, bem como caracterizar o metabolismo oxidativo de culturas embriogênicas.

5.3 METODOLOGIA

Culturas embriogênicas (EC) e não embriogênicas (NEC) de *G. chacoensis* previamente obtidas conforme descrito por GIACOMOLLI POLESI *et al.* (2022) foram utilizadas como material vegetal no presente trabalho.

Para a análise de proteômica, 3 amostras biológicas de 300 mg de material vegetal fresco de EC e NEC foram submetidos ao processo de extração, seguida de precipitação e digestão de proteínas (REIS *et al.*, 2021). As proteínas foram quantificadas por meio de espectrometria de massas acoplado a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). Os dados foram processados utilizando softwares (DISTLER *et al.*, 2014; DISTLER *et al.*, 2016) e em seguida comparados ao banco de dados de proteínas disponível para a espécie de bambu *Guadua angustifolia*, que pode ser acessado em <https://www.genobank.org/bamboo#2> (GUO *et al.*, 2019). Após este processamento, apenas as proteínas presentes ou ausentes (no caso de proteínas únicas) nas três amostras biológicas foram consideradas para a análise de acúmulo

diferencial. Os dados foram analisados utilizando teste T ao nível de significância de 5% e foram consideradas como up-reguladas as proteínas que apresentaram valor de $p < 0.05$ e Log2 maior que 1.0, e down-reguladas as proteínas que apresentaram $p < 0.05$ e Log2 menor que -1.0. As proteínas que apresentaram regulação diferencial foram submetidas a análises multivariadas utilizando a plataforma MetaboAnalyst (PANG *et al.*, 2021), sendo realizadas as análises de componente principal (PCA) para identificar a separação dos grupos, seguida de análise de influência de projeção (VIP score) e construção de HeatMap.

Para a quantificação da atividade de enzimas antioxidantes, 4 repetições de 200 mg de material fresca de EC e NEC foram submetidas ao processo de extração de enzimas, utilizando tampão fosfato de potássio (pH 7.0) na proporção 1:5, peso: volume. Em seguida, a atividade das enzimas SOD, GPX, APX e CAT foram determinadas utilizando parâmetros de reação previamente estipulados, com alterações (RAO *et al.*, 1996). O conteúdo de proteínas foi determinado utilizando o método de Bradford (BRADFORD 1976). Os dados obtidos foram analisados utilizando teste T ($p \leq 0,05$).

Para a quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malonaldeído (MDA), 4 repetições de 200 mg de material fresca de EC e NEC foram submetidas ao processo de extração utilizando 0,1% de ácido tricloroacético (TCA) (peso: volume) na proporção 1:5, peso: volume, de acordo com metodologia proposta por Velikova e colaboradores (2000), com modificações. Para a determinação do conteúdo de H_2O_2 a reação foi composta pelo extrato, tampão fosfato de potássio (pH 7.0) e iodeto de potássio, e a concentração foi determinada por meio de leitura em espectrômetro em 350 nm, utilizando curva padrão de H_2O_2 . Para a determinação do conteúdo de MDA a reação foi composta por extrato e tampão contendo 20% de ácido tricloroacético (TCA) e 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA) e a concentração foi determinada por meio de leitura em espectrômetro em 532 nm ajustado para 600 nm, utilizando coeficiente de extinção molar (155 mM cm^{-1}). Os dados obtidos foram analisados utilizando teste T ($p \leq 0,05$).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de proteômica comparativa permitiu a identificação de um total de 855 proteínas, sendo que destas 265 apresentaram regulação diferencial, das quais 129 foram up-reguladas e 136 down-reguladas (Figura 9). Além disso, 37 proteínas foram identificadas como únicas em EC e 22 em NEC. Dentro do grupo das proteínas únicas de EC destacou-se a presença

dos seguintes grupos de proteínas: resposta a detoxicação – isoformas de Peroxidases, resposta a estresse – proteínas de choque térmico, ribossomais, fatores de alongamento, metabolismo de carboidratos – rota de glicólise, formação de parede celular – arabinogalactanas e poligalacturonase, e de sinalização (Figura 9). Já no grupo das únicas de NEC destacou-se a presença de proteínas relacionadas com os processo de proteólise, resposta a detoxicação – isoformas de peroxidases, e metabolismo de carboidratos – rota pentose fosfato.

A presença de proteínas da rota de glicólise, onde os carboidratos são convertidos em metabólitos intermediários e ATP, sugere que EC utilizam a rota glicolítica dos carboidratos como fonte de energia para assegurar o crescimento e desenvolvimento (AGUILAR-HERNÁNDEZ e LOYOLA-VARGAS 2018). Da mesma forma, a presença de proteínas relacionadas com a remodelação da parede celular somente em EC indica que a resposta embriogênica parece estar associada com a remodelação da parede celular.

A análise de PCA demonstrou uma separação clara entre as proteínas identificadas no grupo de EC e NEC e explicou aproximadamente 97% das variações existentes. Já a análise de VIP score e HeatMap demonstraram que dentro do grupo das up-reguladas se destacavam as seguintes proteínas: chitinase, xilanase, peptidil-prolil cis trans isomerases e fatores de alongamento, enquanto dentre as down-reguladas se destacavam as proteínas relacionadas ao metabolismo de serina, lipídeos e rota da pentose fosfato, bem como diferentes isoformas de proteases e proteinases.

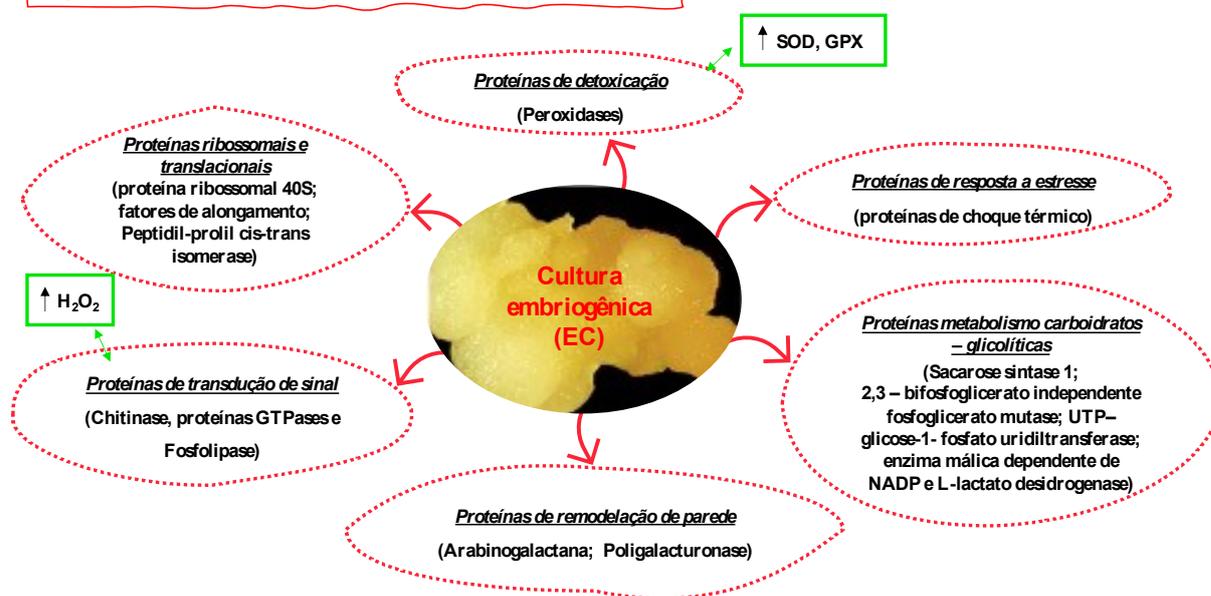
A presença de proteínas ribossomais, translacionais e fatores de alongamento como up-reguladas ou únicas das EC, conforme demonstrado neste trabalho (Figura 9), sugere que a formação de embriões requer uma intensa atividade metabólica que assegure a síntese de novas proteínas. De fato, a predominância de proteínas ribossomais já foi reportado durante estudos de proteômica de outras espécies, tais como cana-de-açúcar (HERINGER *et al.*, 2015) e milho (LIU *et al.*, 2018), corroborando com nossas observações. Por outro lado, em NEC, observou-se a presença de muitas proteínas relacionadas com o processo de proteólise, responsável pela degradação e reciclagem de proteínas, evidenciando uma constante reciclagem de proteínas nestas culturas.

Os resultados deste trabalho também sugerem que a geração de resposta embriogênica parece estar associada com a ativação de rotas de transdução de sinal, uma vez que proteínas com função de sinalização, tais como Chitinase, proteínas G e fosfolipases foram encontradas como únicas de EC.

A análise do metabolismo oxidativo revelou que EC apresentaram maior atividade das enzimas SOD e GPX, bem como maior conteúdo de H_2O_2 (Figura 9), quando comparado a NEC, sugerindo uma possível atuação de enzimas antioxidantes durante a resposta embriogênica. Adicionalmente, uma variedade de isoformas de peroxidases também foram identificadas neste trabalho, bem como o acúmulo de proteínas de resposta a estresse, tais como as proteínas de choque térmico em EC. Estes resultados sugerem que as proteínas de resposta a estresse, juntamente com as enzimas antioxidantes parecem agir em conjunto no controle do estresse, permitindo a geração da resposta embriogênica em EC de *G. chacoensis*.

Figura 9. Resumo gráficos demonstrando os principais grupos de proteínas e enzimas antioxidantes envolvidas com a resposta embriogênica de *G. chacoensis*. Culturas embriogênicas (EC) apresentaram acúmulo de proteínas de detoxicação, de resposta a estresse, do metabolismo de carboidratos, de remodelação de parede, de transdução de sinal e ribossomais e translacionais. Da mesma forma, EC apresentaram acúmulo de superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPX) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Total: 855 proteínas identificadas
265 regulação diferencial: 129 up-reguladas; 136 down-reguladas
37 proteínas únicas de EC; 22 proteínas únicas NEC



Fonte: autora (2022).

5.5 CONCLUSÃO

Este trabalho corresponde ao primeiro estudo utilizando análise de proteômica durante a ES de bambus e permitiu a identificação de proteínas marcadoras da resposta embriogênica em *G. chacoensis*. Ademais, a caracterização do metabolismo oxidativo demonstrou que a ativação de enzimas antioxidantes parece ser fundamental para a geração da resposta embriogênica.

6. CAPÍTULO 4 - CRIOPRESERVAÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES DE *Guadua chacoensis* E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

6.1 RESUMO

A criopreservação de materiais biológicos em temperaturas ultrabaixas (-196°C) corresponde a uma ferramenta de grande valia da cultura de tecidos, uma vez que permite a conservação de germoplasma por tempo indeterminado em espaço reduzido e que exigem manutenção mínima. Entretanto, ao nosso saber, não existem estudos de criopreservação reportados para suspensões celulares de bambus. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de criopreservação utilizando suspensões celulares de *G. chacoensis* e quantificar o conteúdo de Malonaldeído (MDA) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), bem como avaliar a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo - Guaiacol Peroxidase (GPX), Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido dismutase (SOD) em diferentes etapas da criopreservação. Estudou-se a dinâmica de crescimento das suspensões celulares, seguido de um teste de fitotoxicidade para avaliar a capacidade das culturas em tolerar o uso de soluções crioprotetoras e então procedeu-se a criopreservação. A dinâmica de crescimento demonstrou que as culturas se encontravam na fase exponencial entre os dias 35-42, sendo definido o 39º dia após o subcultivo como ótimo para utilização destas culturas na criopreservação. Quanto a fitotoxicidade, as suspensões celulares de *G. chacoensis* toleraram a incubação em solução crioprotetora (2M de sacarose e 1M de glicerol, 1 M de dimetilsulfóxido (DMSO), 1% prolina (peso/volume)) por até 120 minutos (min), sendo 240 min fitotóxico. Aos 60 dias após a criopreservação, 100% das culturas foram regeneradas e observou-se um incremento de massa de 10%, indicando sucesso no estabelecimento do protocolo de criopreservação. A análise do metabolismo oxidativo revelou que a ativação de enzimas antioxidantes parece ter sido fundamental para assegurar a homeostase celular durante a criopreservação e desta forma evitar a perda de viabilidade das culturas. Foi possível estabelecer um protocolo eficiente de criopreservação para suspensões celulares de *G. chacoensis*, sendo esta uma importante alternativa de conservação *in vitro*.

Palavras chaves: bambu; conservação *in vitro*; criopreservação; suspensão celular; enzimas antioxidantes.

6.2 INTRODUÇÃO

A criopreservação de materiais biológicos em temperaturas ultrabaixas (-196°C), normalmente acondicionado em nitrogênio líquido, apresenta como vantagens a conservação do material em espaços reduzidos, protegidos de contaminações e com necessidade de manutenção mínima (ENGELMANN, 2004). Essa técnica tem se mostrado de grande valia para a conservação de germoplasma de plantas. Contudo, poucos são os trabalhos reportando a criopreservação de culturas embriogênicas de bambus, demonstrando a urgência de estudos.

Sabe-se que o sucesso de um protocolo de criopreservação está diretamente relacionado com a não formação de cristais de gelo intracelulares, uma vez que estes podem levar à ruptura das membranas e colapso celular (HERINGER *et al.*, 2013). Por este motivo, boa parte das metodologias de criopreservação utilizam soluções crioprotetoras para contornar este problema, sendo que estas soluções podem ser do tipo permeáveis as células, tais como dimetil sulfoxido (DMSO), glicerol e prolina, ou impermeáveis tais como polietilenoglicol e açúcares (PANIS; LAMBARDI, 2006).

A criopreservação é reconhecida por ser um processo que gera estresse e diversos são os passos ao longo de um protocolo de criopreservação que podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs/ROS) (REN; WANG; WHANG, 2021). Ademais, o estresse oxidativo das células, causado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs/ROS) tem sido reportado como um dos fatores que reduzem a habilidade das células de sobreviverem a criopreservação, levando tanto a reduções como até mesmo a perda total de viabilidade (REN; WANG; WHANG, 2021). Contudo, as plantas possuem diversos mecanismos para se proteger e manter a homeostase celular, incluindo a ação de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) (APEL e HIRT, 2004).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de criopreservação a partir de suspensões celular para o bambu *G. chacoensis*, bem como avaliar a atividades de enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo.

6.3 METODOLOGIA

Suspensões celulares de *G. chacoensis* foram estabelecidas a partir da inoculação de 300 mg de culturas embriogênicas previamente obtidas (GIACOMOLLI POLESINI *et al.*, 2022) em erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura MS suplementado com 30g.L⁻¹ de sacarose,

2mL.L⁻¹ de vitaminas de Morel, 1g.L⁻¹ de glutamina, e 10 µM Picloram e mantidos em shakers, no escuro, sob agitação (95 rpm). A fim de se avaliar a dinâmica de crescimento das culturas, medidas destrutivas (massa fresca) e não-destrutivas (medida em centímetros do volume após a sedimentação) foram realizadas a cada 7 dias até o dia 54 de cultivo. Os dados foram avaliados quanto ao incremento de massa em relação ao inicial utilizando a seguinte fórmula: peso no dia x / peso inicial.

Previamente a criopreservação foi realizado um teste de fitotoxicidade para avaliar a tolerância das culturas ao uso da solução crioprotetora (2M de sacarose e 1M de glicerol, 1 M de dimetilsulfóxido (DMSO), 1% prolina (peso/volume)), sendo testados 5 tempos de incubação: 0, 30, 60, 120 e 240 minutos. Os procedimentos foram realizados de acordo com o proposto por FRAGA *et al.* (2015), sendo utilizadas 4 repetições para cada tempo de incubação, totalizando 20 erlenmeyers com aproximadamente 1 g de cultura cada. Para determinar a fitotoxicidade da solução fez-se a pesagem das colônias no momento da transferência para o meio semissólido, e ao final do cultivo aos 30 dias e avaliou-se a taxa de incremento de massa, utilizando-se a seguinte fórmula: peso no dia 30 / peso inicial.

Uma vez estabelecidas os melhores tempos de incubação, as suspensões celulares de *G. chacoensis* foram submetidas ao protocolo completo proposto por MUSTAFA *et al.*, 2011 e FRAGA *et al.* (2015) incluindo as seguintes etapas: 1) pré-tratamento por 48 horas em solução composta por meio MS básico com adição de 180 g. L⁻¹ de manitol; 2) incubação na solução crioprotetora por 0, 60 ou 120 minutos; 3) congelamento lento com acondicionamento das culturas por 4 horas em ultra freezer (-80°C) utilizando o crio container Mr.Frosty (Nalgene®); 4) imersão em nitrogênio líquido; 5) descongelamento rápido; 6) lavagem com solução de pré-tratamento; 7) avaliação do recrescimento após 60 dias.

Visando obter um maior entendimento do estresse oxidativo gerado as culturas ao longo do protocolo de criopreservação, realizou-se a quantificação do conteúdo de H₂O₂ e MDA e das demais enzimas relacionadas com o metabolismo oxidativo incluindo GPX, CAT, APX e SOD, em quatro pontos do protocolo: 1) controle, que corresponde ao material em suspensão celular que não foi criopreservados; 2) após a incubação em solução crioprotetora por 60 e 120 minutos; 3) após o descongelamento; 4) 60 dias após o recrescimento. Além disso, avaliou-se a viabilidade das culturas utilizando o método da fluorescência de FDA (diacetato de fluoresceína) nos mesmos pontos de coleta descritos acima.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dinâmica de crescimento revelou que as culturas se apresentam na fase inicial de crescimento entre os dias 0-28 de cultivo, seguida da fase exponencial entre os dias 35-42 e então passam para a fase de desaceleração de crescimento entre os dias 42-54 (Figura 10). Estes resultados indicam que o melhor período para a criopreservação ocorre entre os dias 35-45 de cultivo, uma vez que culturas em fase de crescimento exponencial são mais tolerantes a formação de cristais de gelo que podem levar à ruptura das membranas e colapso celular (MUSTAFA *et al.*, 2011).

Os resultados mostraram que a incubação das culturas em solução crioprotetora por 240 min foi fitotóxico, com crescimento praticamente nulo (Figura 10). Os tempos de 30 e 60 min de incubação resultaram em um incremento de massa similar ao controle, enquanto o tempo de 120 min resultou em valores estatisticamente inferior aos observados para o controle. Em função dos tóxicos efeitos que o uso de soluções crioprotetoras podem causar nas células, a otimização do tempo de incubação é de grande importância (LAMBARDI, 2008) e no presente estudo os melhores tempos são os de 60 e 120 min para o estabelecimento do protocolo de criopreservação em *G. chacoensis*.

Os resultados de recrescimento revelaram que independente do tempo de incubação utilizado – 60 ou 120 min, as culturas apresentaram 100% de sobrevivência após a criopreservação e que houve um incremento de massa fresca de cerca de 10% após 60 dias de recrescimento, sugerindo sucesso no estabelecimento deste protocolo. Valores similares de sobrevivência foram reportados para culturas embriogênicas de *Araucaria* submetidas a este protocolo de criopreservação (FRAGA *et al.*, 2015).

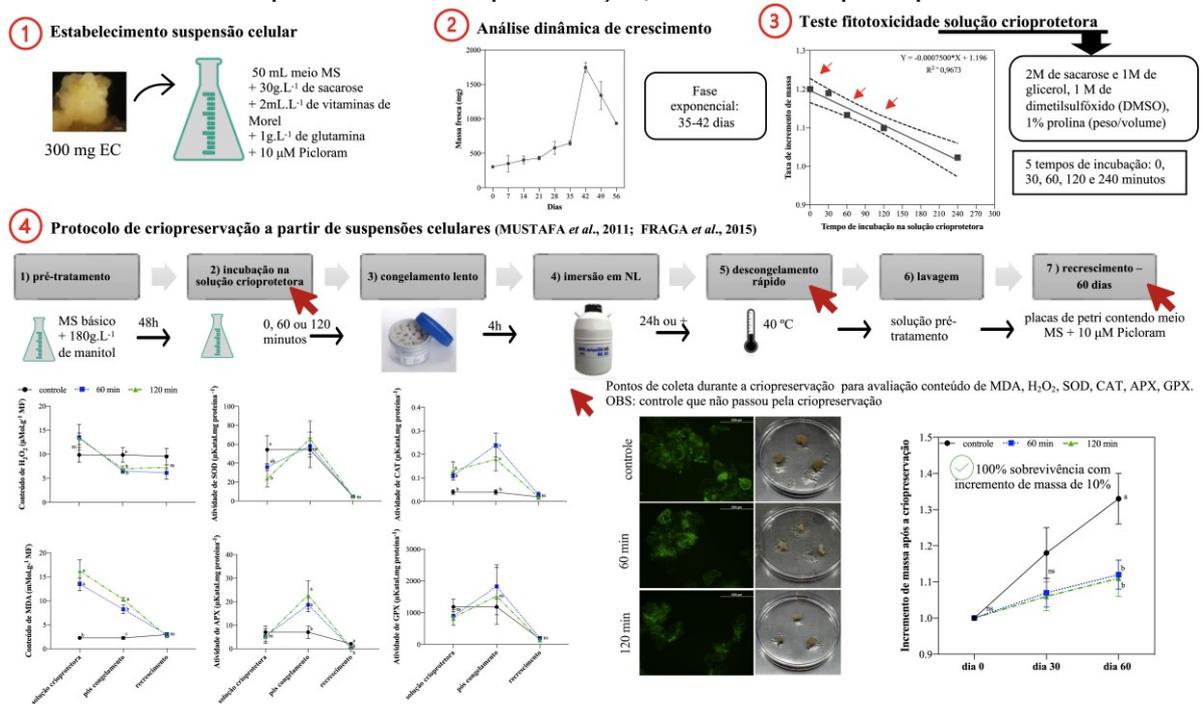
A incubação das culturas em solução crioprotetora aumentou o conteúdo de MDA em relação ao controle, em ambos os tempos utilizados – 60 e 120 min (Figura 10), sugerindo que o uso de soluções crioprotetoras parece causar um estresse nas culturas levando a peroxidação lipídica. Aumentos de MDA são comumente associados com produção excessiva de EROs/ROS em resposta a condições de estresse e corresponde a um dos principais fatores associados a perda de viabilidade de culturas (CHEN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Entretanto, aumento na atividade de CAT foram observados nesta mesma etapa (Figura 10), sugerindo uma ativação do mecanismo de defesa enzimática contra EROs/ROS.

Na etapa de pós congelamento, observou-se um aumento ainda maior na atividade de CAT, em ambos os tempos de incubação, juntamente com um pico na atividade de APX (Figura

10). Neste mesmo momento, houve uma redução de 40% no conteúdo de MDA e 50% nos níveis de H_2O_2 quando comparado a etapa anterior. CAT e APX são importantes enzimas responsáveis pela detoxicação de H_2O_2 e o aumento na atividade delas associado a queda nos conteúdos de H_2O_2 e MDA comparados as etapas anteriores no presente estudo sugerem que a ativação destas enzimas antioxidantes parece ser crucial para o reestabelecimento da homeostase celular das culturas criopreservadas de *G. chacoensis*.

Na etapa de recrescimento não foi observada diferença significativa nos conteúdos de MDA e H_2O_2 nem na atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GPX entre os tempos de incubação de 60 e 120 min em relação ao controle (Figura 10), sugerindo uma homeostase do metabolismo oxidativo das culturas de *G. chacoensis* regeneradas após a criopreservação.

Figura 10. Resumo gráfico do trabalho demonstrando as etapas realizadas no estabelecimento do protocolo de criopreservação, bem como os principais resultados obtidos.



Fonte: autora (2022).

6.5 CONCLUSÃO

Este trabalho descreveu pela primeira vez um protocolo eficiente de criopreservação a partir de suspensões celulares de *G. chacoensis* que pode auxiliar na conservação *in vitro* desta espécie de bambu. Além disso, os tempos de incubação de 60 e 120 min apresentaram o mesmo incremento de massa e sobrevivência. Por fim, sugere-se que a tolerância das culturas ao protocolo de criopreservação parece estar associada com a ativação de enzimas antioxidantes que asseguram a homeostase celular e viabilidade das culturas criopreservadas.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A proposta desta tese surgiu a partir da necessidade de se compreender um pouco mais a respeito da propagação *in vitro* de bambus por meio da rota de ES, uma vez que poucas eram as informações e conhecimentos disponíveis. De fato, a escrita de uma capítulo de revisão sobre a ES de bambus nos evidenciou que existiam muitos gargalos no entendimento de aspectos morfoanatômicos, bioquímicos, moleculares e no estabelecimento de estratégias de conservação associados a ES em bambus, sendo que muitos destes foram explorados durante o desenvolvimento da presente tese.

Esta tese reportou pela primeira vez o estabelecimento de um protocolo de ES para o bambu *G. chacoensis* (Figura 11), bem como uma caracterização morfoanatômica detalhada, utilizando técnicas de microscopia de luz e eletrônica, dos eventos desde a formação inicial dos calos até a maturação das culturas embriogênicas, representando um grande avanço na fronteira do conhecimento da ES bambus. Os resultados deste trabalho também evidenciaram que a rota morfogenética da ES pode ser uma importante alternativa para a propagação em massa e conservação *in vitro* de bambus.

A caracterização bioquímica de EC e NECs realizada neste tese indicou que a resposta embriogênica de *G. chacoensis* parece estar relacionada com a atuação de poliaminas, aminoácidos, carboidratos e enzimas antioxidantes (Figura 11), e que o entendimento das interações existentes entre elas permite uma melhor manipulação das condições de cultivo. Esta caracterização também representou um avanço significativo para os estudos de bambu, pois todas as abordagens utilizadas nesta tese ainda não haviam sido empregadas na ES, podem desta assim auxiliar tanto no entendimento desta rota bem como servir de modelo para estudos em outras espécies de bambu.

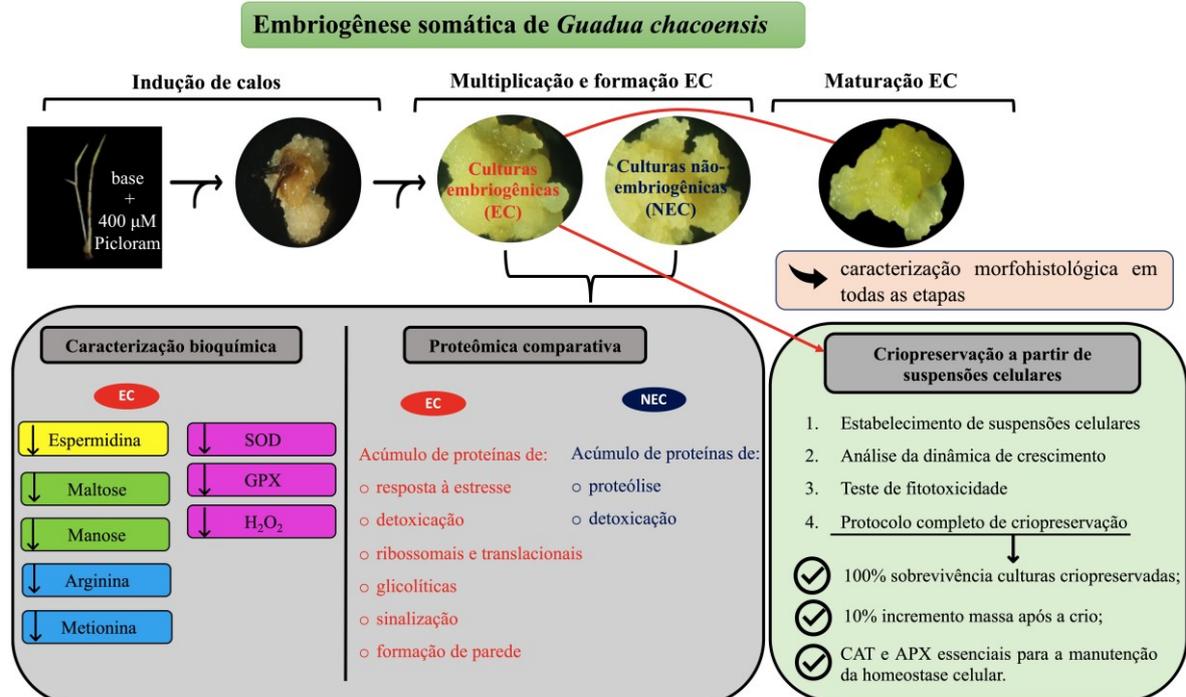
Esta tese demonstrou pela primeira vez um estudo de proteômica durante a ES de bambus, representando um avanço significativo que abre portas para novos trabalhos e descobertas. Nossos resultados da análise de proteômica comparativa revelaram que o acúmulo de diferentes grupos de proteínas, incluindo as de resposta a estresse, de detoxicação de EROs/ROS, de regulação ribossomal e translacional, do metabolismo de carboidratos, de formação de parede e de sinalização celular, parecem estar diretamente associados com a aquisição de competência embriogênica em *G. chacoensis* (Figura 11).

O estabelecimento de um protocolo de criopreservação a partir de suspensões celulares para *G. chacoensis* representa um grande avanço para a conservação de germoplasma *in vitro*, sendo também um trabalho inédito para bambus. Este protocolo demonstrou que a atuação de enzimas antioxidantes parece ser fundamental para assegurar a manutenção da viabilidade das culturas (Figura 11).

Como perspectivas, destaca-se a necessidade de realizar novos estudos visando otimizar a etapa de maturação das culturas, bem como a conversão e regeneração de plantas. Ademais, fica iminente a possibilidade de estabelecimento de um protocolo de criopreservação a partir de embriões somáticos, onde técnicas tais como vitrificação por gota, encapsulamento e encapsulamento seguido de vitrificação por gota podem ser testados para esta espécie de bambu, uma vez que poucos são os trabalhos de criopreservação a partir de embriões reportados para bambus.

Por fim, esta tese gerou resultados consistentes que podem auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos com a resposta embriogênica em *G. chacoensis* bem como na conservação de germoplasma de bambus, resultando em ganhos tanto para a realização de novos estudos, o qual pode servir de modelo, como para a cadeia produtiva de bambus.

Figura 11. Resumo gráfico de todos os conhecimentos e avanços obtidos com o desenvolvimento desta tese para o bambu *G. chacoensis*.



Fonte: autora (2022).

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-HERNÁNDEZ, Victor; LOYOLA-VARGAS, Víctor M. Advanced proteomic approaches to elucidate somatic embryogenesis. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1658, 2018.
- AKINLABI, Esther Titilayo; ANANE-FENIN, Kwame; AKWADA, Damenortey Richard. Bamboo Taxonomy and Distribution Across the Globe. In: **Bamboo**. Springer, Cham, 2017. p. 1-37, 2017.
- APEL, Klaus; HIRT, Heribert. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Reviews in Plant Biology**, v. 55, p.373-399, 2004.
- BASAK, Mridushree et al. Genomic insights into growth and development of bamboos: what have we learnt and what more to discover?. **Trees**, v. 35, n. 6, p. 1771-1791, 2021.
- BLANC, Géraldine et al. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 373, p. 1453-1462, 2002.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CHEN, Guan-qun et al. Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings. **Cryobiology**, v. 70, n. 1, p. 38-47, 2015
- CHEN, Dandan et al. Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1945, 2019.
- CLARK, L. G.; LONDOÑO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. Bamboo Taxonomy and Habitat. In: **Bamboo, Tropical Forest**. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland, p.356, 2015.
- DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, Inaê M. et al. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia plantarum**, v. 168, n. 4, p. 845-875, 2020.
- DE CARVALHO SILVA, Rafael; LUIS, Zanderluce Gomes; SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny Everson. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant growth regulation**, v. 72, n. 1, p. 67-80, 2014.
- DISTLER, Ute et al. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. **Nature methods**, v. 11, n. 2, p. 167-170, 2014.
- DISTLER, Ute et al. Label-free quantification in ion mobility–enhanced data-independent acquisition proteomics. **Nature protocols**, v. 11, n. 4, p. 795-812, 2016.

ELHITI, Mohamed; STASOLLA, Claudio. ROS signalling in plant embryogenesis. In: **Reactive oxygen and nitrogen species signaling and communication in plants**. Springer, Cham, 2015. p. 197-214.

ENGELMANN, Florent. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.

FEHÉR, Attila. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 536, 2019.

FEHÉR, Attila. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

FEHÉR, Attila. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 52, n. 1, p. 53-56, 2008

GALILI, Shmuel; AMIR, Rachel; GALILI, Gad. Genetic engineering of amino acid metabolism in plants. **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 49-80, 2008.

FRAGA, Hugo PF et al. High-efficiency cryopreservation of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures: ultrastructural characterization and morpho-physiological features. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 124, n. 2, p. 307-318, 2016.

GODBOLE, Savita et al. Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. **Current science**, p. 885-889, 2002.

GRECO, TM; PINTO, MM; TOMBOLATO, AFC. Diversity of Bamboo in Brazil. **journal of Tropical and Subtropical Botany**, v. 23, n. 1, p. 1–16, 2015.

GRZYB, Małgorzata et al. The content of endogenous hormones and sugars in the process of early somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 129, n. 3, p. 387-397, 2017.

GUO, Zhen-Hua et al. Genome sequences provide insights into the reticulate origin and unique traits of woody bamboos. **Molecular plant**, v. 12, n. 10, p. 1353-1365, 2019.

GUPTA, Deepti Bhushan; SHEKHAR, Shubhendu; AGRAWAL, Lalit. Plant proteomics: technologies and applications. In: **PlantOmics: the omics of plant science**. Springer, New Delhi, 2015. p. 213-256.

HERINGER, Angelo S. et al. Global DNA methylation profiles of somatic embryos of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) are influenced by cryoprotectants and droplet-vitrification

cryopreservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 114, n. 3, p. 365-372, 2013.

HERINGER, Angelo Schuabb et al. Label-free quantitative proteomics of embryogenic and non-embryogenic callus during sugarcane somatic embryogenesis. **PLoS one**, v. 10, n. 6, p. e0127803, 2015.

HERINGER, Angelo Schuabb; SANTA-CATARINA, Claudete; SILVEIRA, Vanildo. Insights from proteomic studies into plant somatic embryogenesis. **Proteomics**, v. 18, n. 5-6, p. 1700265, 2018.

HILDEBRANDT, Tatjana M. et al. Amino acid catabolism in plants. **Molecular plant**, v. 8, n. 11, p. 1563-1579, 2015.

HILDEBRANDT, Tatjana M. Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during Arabidopsis abiotic stress response. **Plant molecular biology**, v. 98, n. 1, p. 121-135, 2018.

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

JORRIN NOVO, J. V. Proteomics and plant biology: contributions to date and a look towards the next decade. **Expert Review of Proteomics**, v. 18, n. 2, p. 93-103, 2021.

JORRIN-NOVO, Jesus V. Plant proteomics methods and protocols. In: **Plant proteomics**. Humana Press, Totowa, NJ, 2014. p. 3-13.

JULLIEN F; Tran Thanh VAN K. Micropropagation and embryoid formation from young leaves of *Bambusa glaucescens* “Golden Goddess”. **Plant Science**. v.98, p.199-207, 1994

KELCHNER, Scot A; GROUP, Bamboo Phylogeny. Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 67, n. 2, p. 404-413, 2013.

KOMATSU, Yurika H. et al. In vitro morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forestry Research**, v. 22, n. 2, p. 209-215, 2011.

LAMBARDI, Maurizio; OZUDOGRU, E. Aylin; BENELLI, Carla. Cryopreservation of embryogenic cultures. In: **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, New York, NY, p. 177-210, 2008.

LI, Si-Bei et al. A review of auxin response factors (ARFs) in plants. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 47, 2016.

LIPAVSKÁ, Helena; KONRÁDOVÁ, Hana. Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 1, p. 23-30, 2004.

LIU, Beibei et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli derived from a maize (*Zea mays* L.) inbred line Y423. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, p. 4004, 2018.

LONDOÑO, Ximena; PETERSON, Paul M. *Guadua chacoensis* (Poaceae: Bambuseae), its taxonomic identity, morphology, and affinities. **Novon**, p. 41-47, 1992.

LOU, YiPing et al. Bamboo and climate change mitigation. **Technical Report-International Network for Bamboo and Rattan (INBAR)**, n. 32, 2010.

MALIK, Bisma et al. Plant signaling: response to reactive oxygen species. In **Plant signaling: Understanding the molecular crosstalk**. Springer, New Delhi, p.1-38, 2014.

MARULANDA, Marta L.; GUTIÉRREZ, Luis G.; DEL PILAR MÁRQUEZ, María. Micropropagación de *Guadua Angustifolia* Kunth. **Actualidades Biológicas**, v. 27, n. 82, p. 5-15, 2005.

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, Hugo A. et al. Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. **Frontiers in plant science**, v. 10, 2019.

MIKULA, Anna et al. An unique system of somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb.: the importance of explant type, and physical and chemical factors. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, n. 3, p. 467-478, 2015

MUSTAFA, Natali R. et al. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. **Nature protocols**, v. 6, n. 6, p. 715, 2011.

MUSTAFABI, Seyed Hamid et al. Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. **Acta physiologiae plantarum**, v. 40, n. 6, p. 102, 2018.

NASCIMENTO-GAVIOLI, Maria Carolina Andrade et al. Physiological and biochemical features of embryogenic and non-embryogenic peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, n. 1, p. 33-40, 2017.

NHUT, Duong Tan; DA SILVA, JA Teixeira; VAN LE, Bui. Thin cell layer sectioning for inducing somatic embryogenesis in woody plants. In: **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Springer Netherlands, p. 577-585, 2005.

NIC-CAN, Geovanny I. et al. The relationship between stress and somatic embryogenesis. In: **Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications**. Springer, Cham, 2016. p. 151-170.

OCHATT, Sergio et al. Cryopreservation and In Vitro banking: a cool subject—Preface from the editors. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 144, n. 1, p. 1-5, 2021.

- PANIS, B; LAMBARDI, Maurizio. Status of cryopreservation technologies in plants (Crops and Forest Trees). **The role of biotechnology**, p. 43-54, 2006.
- PANG, Zhiqiang et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W388-W396, 2021.
- POLESI, Luiza Giacomolli et al. Chloroplast ultrastructure and hormone endogenous levels are differently affected under light and dark conditions during in vitro culture of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 1, p. 10, 2019.
- POLESI, Luiza Giacomolli et al. Somatic embryogenesis in bamboos: advances and prospects. In: Ahmad Z, Ding Y, Shahzad A (eds) **Biotechnological Advances in Bamboo: The “Green Gold” of the Earth**. Springer, Singapore, p. 85–105, 2021.
- RAKESH, B; SUDHEER, WN; NAGELLA, Pr. Role of polyamines in plant tissue culture: An overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, p. 1-20, 2021.
- REIS, Ricardo Souza et al. Pretreatment free of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid improves the differentiation of sugarcane somatic embryos by affecting the hormonal balance and the accumulation of reserves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, n. 1, p. 101-115, 2021.
- RAO, Mulpuri V.; PALIYATH, Gopinadhan; ORMROD, Douglas P. Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. **Plant physiology**, v. 110, n. 1, p. 125-136, 1996.
- REN, Li; WANG, Min-Rui; WANG, Qiao-Chun. ROS-induced oxidative stress in plant cryopreservation: Occurrence and alleviation. **Planta**, v. 254, n. 6, p. 1-18, 2021.
- SHIRASUNA, R.T.; AFONSO, E.A.L.; CLARK, L.G.; VIANA, P.L.; FILGUEIRAS, T.S. (in memoriam). 2020. *Guadua in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13250>>. Acesso em: 17 de junho de 2022.
- SILVEIRA, Vanildo et al. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 114, n. 3, p. 351-364, 2013.
- SORENG, Robert J et al. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. **Journal of Systematics and evolution**, v. 55, n. 4, p. 259-290, 2017.
- STEINMACHER, Douglas André et al. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 699-709, 2007.

THAPA, Pooja et al. Advances in Bamboo Biotechnology: Present Status and Future Perspective. In: **Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 1**. Springer, Cham, 2018. p. 243-265.

VAN, K. Tran Thanh. Thin cell layer concept. In: **Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications**. Springer, Dordrecht, p. 1-16, 2003.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VON ARNOLD, Sara et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 69, n. 3, p. 233-249, 2002.

WÓJCIK, Anna M.; WÓJCIKOWSKA, Barbara; GAJ, Małgorzata D. Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, p. 1333, 2020.

WRIGHT, P. C. et al. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, v. 77, n. 4, p. 738-765. e52, 2012.

WUDDINEH, Wegi; MINOCHA, Rakesh; MINOCHA, Subhash C. Polyamines in the context of metabolic networks. In: **Polyamines**. Humana Press, New York, NY, p. 1-23, 2018.

ZHANG, Shou-gong et al. Changes in H₂O₂ content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 100, n. 1, p. 21-29, 2010.

ZHANG, Di et al. ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 9, p. 1499-1513, 2015.