

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

Hugo Pacheco de Freitas Fraga

**EFEITOS DA 5-AZACITIDINA NA EMBRIOGÊNESE  
SOMÁTICA DE *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret E NOS NÍVEIS  
DE METILAÇÃO DO DNA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais. Orientador: Prof. Miguel Pedro Guerra. Co-orientadora: Profa. Rosete Pescador.

Florianópolis  
2012

Catlogação na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

F811e Fraga, Hugo Pacheco de Freitas  
Efeitos da 5-azacitidina na embriogênese somática de  
Acca sellowiana (O. Berg.) Burret e nos níveis de metilação  
do DNA [dissertação] / Hugo Pacheco de Freitas Fraga ;  
orientador, Miguel Pedro Guerra. - Florianópolis, SC, 2012.  
102 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Agricultura. 2. Recursos genéticos vegetais. 3.  
Engenharia genética. 4. Embriogênese somática. I. Guerra,  
Miguel Pedro. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.  
III. Título.

CDU 631





À Leila do N. Vieira,  
Por sua presença e apoio essenciais,  
**Ofereço.**

Aos meus pais Carlos José e Ademilde,  
Pela linda família que somos,  
**Dedico.**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, que me permitiu concluir uma grande etapa da minha vida, apesar de todos os percalços do caminho, e que me fez encontrar forças mesmo quando tudo parecia perdido.

Aos meus queridos pais, Carlos José e Ademilde, por sempre acreditarem que tudo daria certo e me apoiarem incondicionalmente, o meu muito obrigado.

Aos meus amados irmãos, Raphael e Carlos Matheus, e minha avó querida Rosália, por simplesmente fazerem parte da minha vida e mesmo à distância terem participado de todos os momentos, bons e ruins, desta etapa da minha vida.

A minha amada Leila, a quem devo boa parte da realização deste trabalho, por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis e me ajudar a superar todos os obstáculos do caminho. Muito obrigado de verdade por tudo o que não encontro palavras pra dizer.

Ao meu orientador, Prof. Miguel Pedro Guerra, pela boa convivência, os ótimos ensinamentos transmitidos, as revisões “rapidíssimas” e acima de tudo pela confiança depositada e a oportunidade de realizar este trabalho junto ao LFDGV.

A minha co-orientadora, Profa. Rosete Pescador, pela atenção e carinho em relação a este trabalho, e pelo apoio de sempre.

A Clarissa Alves Caprestano, por me passar seus ótimos conhecimentos a respeito de embriogênese somática em *Acca sellowiana*, estar sempre de braços abertos para me ajudar nas longas horas de fluxo e também pela ótima amizade construída.

Ao Douglas André Steinmacher, que além de dar um novo rumo às coisas quando era necessário, me ensinou, dando o exemplo, como um bom profissional da nossa área deve ser e agir. Agradeço principalmente pela amizade construída, os jantares de confraternização e os ótimos momentos compartilhados.

A Sarah Agapito Tenfen, por todo o auxílio nas análises proteômicas e as risadas do percurso CCA/Scanner.

Ao Prof. Gustavo Amadeu Micke e seus alunos Daniel e Melina, por toda ajuda nas análises por HPLC e os “insights” compartilhados.

Aos colegas de mestrado, Yohan Fritsche (Johanssen) e Gustavo Klabunde (Gluglu), que além da ótima convivência se tornaram grandes amigos.

Ao amigo Angelo Schuabb Heringer, que assim como eu é um imigrante “carioca”, pela amizade já antiga e pelos ótimos momentos compartilhados.

Aos professores do PPG em Recursos Genéticos Vegetais, principalmente àqueles que contribuíram diretamente na minha formação: Prof. Rubens Onofre Nodari, Prof. Maurício Sedrez dos Reis, Prof. Charles Roland Clement e Profa. Marisa dos Santos.

Aos queridos companheiros de lab: Antônio, Carol, Daniel, Deola, Denise, Gabriela, Juan, Liliana, Maria Luiza, Morgana, Rafael, Ramon, Rogalski, Vinícius. Obrigado pelos momentos de descontração na salinha do lab e pelo companheirismo.

Ao pessoal da EPAGRI, pelo auxílio nas polinizações e pelo envio dos frutos utilizados nos experimentos deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino público gratuito e de qualidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos.

A todos que indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho o meu muito obrigado.



## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 1 – ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA ..... 18**

Figura 1. A - Exemplares do banco ativo de germoplasma de <i>Acca sellowiana</i> na Estação Experimental da EPAGRI de São Joaquim/SC. B – Flores de <i>A. sellowiana</i> . ....	20
Figura 2. Principais etapas morfo genéticas durante a embriogênese em dicotiledôneas. ....	25
Figura 3. Representação esquemática das rotas bioquímicas para a metilação da citosina, demetilação, e mutagenese da citosina e 5-mdC. ....	29
Figura 4. Estruturas da citidina e seus 5-aza-análogos.....	31
Figura 5. Mecanismo de ação da 5-Azacitidina (5-AzaC). ....	32

### **CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO INIBIDOR DA METILAÇÃO 5-AZACITIDINA NA INDUÇÃO E CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Acca sellowiana* ..... 40**

Figura 1. Resumo esquemático do procedimento realizado para a instauração do experimento de indução da embriogênese somática em <i>A. sellowiana</i> . ....	46
Figura 2. Número médio de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> do acesso 101X458 em diferentes tempos de cultivo (20, 30 e 45 dias) em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4. ....	52
Figura 3. Número médio de embriões somáticos de <i>A. sellowiana</i> do acesso 85 em diferentes tempos de cultivo (20, 30 e 45 dias) em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4. ....	54
Figura 4. Aspectos morfo genéticos das culturas do acesso 101X458 de <i>A. sellowiana</i> em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4 aos 20, 30 e 45 dias de cultivo. ....	55
Figura 5. Aspectos morfo genéticos das culturas do acesso 85 de <i>A. sellowiana</i> em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4 aos 20, 30 e 45 dias de cultivo. ....	56
Figura 6. Detalhe da formação de embriões somáticos do acesso 85 de <i>Acca sellowiana</i> em diferentes estádios do desenvolvimento em resposta ao tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC aos 45 dias de cultivo. ....	58

Figura 7. Secções transversais e longitudinais das culturas de <i>A. sellowiana</i> do acesso 101X458 cultivadas aos 10, 20 e 30 dias, entre os diferentes tratamentos de indução da ES testados. ....	61
Figura 8. Secções transversais e longitudinais das culturas de <i>A. sellowiana</i> do acesso 85 cultivadas aos 10, 20 e 30 dias, entre os diferentes tratamentos de indução da ES testados. ....	64
Figura 9. Porcentagem de conversão de embriões somáticos dos acessos 85 e 101 X 458 de <i>A. sellowiana</i> oriundos dos tratamentos de indução 1.1 e 3.1 aos 30 dias de cultivo. ....	67
Figura 10. Conversão de embriões somáticos do acesso 101X458 de <i>A. sellowiana</i> , após trinta dias de inoculação. ....	69
Figura 11. Conversão de embriões somáticos do acesso 85 de <i>A. sellowiana</i> , após trinta dias de inoculação. ....	70

### **CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA METILAÇÃO DO DNA GLOBAL DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Acca sellowiana* POR MEIO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ..... 75**

Figura 1. Porcentagem de metilação (5mdC) quantificada por HPLC/UV entre os diferentes tratamentos testados para indução da ES do acesso 101X458 em <i>Acca sellowiana</i> em diferentes tempos de cultivo (10, 20 e 30 dias). ....	86
Figura 2. Porcentagem de metilação (5mdC) quantificada por HPLC/UV entre os diferentes tratamentos testados para indução da ES do acesso 85 em <i>Acca sellowiana</i> em diferentes tempos de cultivo (10, 20 e 30 dias). ....	88
Figura 3. Porcentagem de metilação (5mdC) quantificada por HPLC/MS/MS entre os diferentes tratamentos testados para indução da ES do acesso 101X458 em <i>Acca sellowiana</i> em diferentes tempos de cultivo (10, 20 e 30 dias). ....	90
Figura 4. Porcentagem de metilação (5mdC) quantificada por HPLC/MS/MS entre os diferentes tratamentos testados para indução da ES do acesso 85 em <i>Acca sellowiana</i> em diferentes tempos de cultivo (10, 20 e 30 dias). ....	94
Figura 5. Resumo esquemático das alterações nos padrões de metilação analisados por HPLC/MS/MS observados para o acesso 101X458 de <i>A. sellowiana</i> durante a indução a embriogênese somática em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4. ....	96
Figura 6. Resumo esquemático das alterações nos padrões de metilação	

analisados por HPLC/MS/MS observados para o acesso 85 de *A. sellowiana* durante a indução a embriogênese somática em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4. .... 97  
 Figura 7. Cromatograma gerado por HPLC/MS/MS do padrão na concentração de 25 µM onde se pode observar a presença dos quatro deoxinucleosídeos (dC, dA, dG e dT) e a 5-metildeoxicidina (5mdC). ..... 100  
 Figura 8. Cromatograma gerado por HPLC/MS/MS de uma das amostras da indução da embriogênese somática em *A. sellowiana* analisadas, onde se pode observar a presença dos quatro deoxinucleosídeos (dC, dA, dG e dT), os três nucleosídeos (A, C e G), a 5-metilcitidina (5mC) e a 5-metildeoxicidina (5mdC). ..... 101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos testados para a indução da embriogênese somática em *A. sellowiana* com o uso de AzaC. .... 47  
 Tabela 2. Média de indução de embriões somáticos de *A. sellowiana* em resposta aos tratamentos testados nos acessos 101x458 e 85 aos 20, 30 e 45 dias de cultivo. .... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem  
µg – micrograma  
µM – micromolar  
µL – microlitro  
µm - micrometro  
2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético  
5mC – 5<sup>o</sup>-metilcitidina  
5mdC – 5<sup>o</sup>-metildeoxicitidina  
ABA – ácido abscísico  
AG<sub>3</sub> – ácido giberélico  
ANOVA – análise de variância  
AzaC – 5-Azacitidina  
BAP – 6-benzilaminopurina  
CCA – Centro de Ciências Agrárias  
DNMT - DNA metiltransferase  
dNTP - deoxirribonucleotídeo fosfatado  
EPAGRI – Empresa Catarinense de Pesquisa e Extensão Rural  
ES – embriogênese somática  
Fluridone - metil-3-fenil-5-[3-(trifluormetil)-fenil]-4(1H)-piridinona  
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência  
LEC – *Leafy Cotyledon*  
LFDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal  
LPm – von Arnold e Eriksson, 1981  
miRNA – micro ácido ribonucléico  
MS – meio de cultura (Murashige & Skoog, 1962)  
MS/MS – Espectrometria de massas em seqüência  
SNK - Student-Newman-Keuls  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
UV - ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>CAPÍTULO 1 – ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA .....</b>	<b>17</b>
1. <i>Acca sellowiana</i> .....	19
2. Embriogênese zigótica .....	21
3. Embriogênese somática.....	23
4. Embriogênese somática em <i>Acca sellowiana</i> .....	26
5. A metilação do DNA como um mecanismo epigenético durante a embriogênese somática .....	28
6. Referências bibliográficas.....	34
<b>CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO INIBIDOR DA METILAÇÃO 5-AZACITIDINA NA INDUÇÃO E CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Acca sellowiana</i> .....</b>	<b>40</b>
1. Resumo .....	42
2. Abstract .....	43
3. Introdução .....	44
4. Material e Métodos .....	45
4.1. Indução da embriogênese somática .....	45
4.2. Conversão de embriões somáticos.....	47
4.3. Análises histológicas por microscopia óptica .....	48
5. Resultados e discussão.....	49
5.1. Indução da embriogênese somática .....	49
5.2. Análises histológicas durante a indução da embriogênese somática.....	58
5.3. Conversão de embriões somáticos.....	65
6. Referências bibliográficas.....	72

**CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA METILAÇÃO DO DNA GLOBAL DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Acca sellowiana* POR MEIO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ..... 76**

1. Resumo.....	78
2. Abstract.....	79
3. Introdução.....	80
4. Material e Métodos.....	81
4.1 Indução da embriogênese somática .....	81
4.2. Extração de DNA.....	81
4.3. Digestão de ácidos nucleicos .....	82
4.4. Análise por HPLC/UV .....	83
4.5. Análise por HPLC/MS/MS .....	84
5. Resultados e discussão .....	85
5.1. Níveis de metilação durante o desenvolvimento embrionário ...	85
5.2. Métodos de detecção da metilação do DNA por HPLC.....	98
6. Referências bibliográficas .....	103
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>106</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret) é uma planta da família Myrtaceae, nativa da região sul da América da Sul, mais especificamente do Sul do Brasil e Norte do Uruguai. Ocorre espontaneamente no planalto catarinense, em altitudes superiores a 800 m, possuindo grande variedade de formas habitats e tamanho de frutos, sendo dispersas naturalmente por sementes. Devido à sua fácil adaptação em regiões subtropicais, atualmente, é cultivada na Califórnia e, principalmente em países como Colômbia e Nova Zelândia, onde os frutos são muito populares, sendo estes países os maiores produtores e exportadores mundiais do fruto.

Estudos envolvendo as rotas de morfogênese *in vitro* desta espécie têm dado ênfase à embriogênese somática, a qual permite a propagação massal clonal de genótipos superiores, além de servir como modelo de estudos fisiológicos, genéticos e bioquímicos do desenvolvimento embrionário.

O Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do CCA/UFSC vêm desenvolvendo estudos associados à embriogênese somática em *Acca sellowiana* desde 1997, resultando em dissertações, artigos publicados e teses, e tendo, portanto, esta rota morfogenética *in vitro* bem estabelecida dentre suas linhas de atuação. No entanto, diversas lacunas ainda necessitam ser preenchidas, tais como a elucidação de aspectos relacionados à dinâmica de metilação do DNA nesta rota morfogenética.

No presente trabalho buscou-se investigar os efeitos do agente hipometilante 5-Azacitidina (AzaC) no processo de indução da embriogênese somática, visando estudar suas consequências nos padrões de metilação do DNA, que são reconhecidamente um dos mediadores-chave no mecanismo epigenético associado, entre outros ao desenvolvimento embrionário e ao desenvolvimento de embriões somáticos.

O agente hipometilante AzaC leva a uma rápida queda - dose e tempo dependentes - na atividade da DNA metiltransferase, e pode interferir na síntese de DNA demetilado em sistemas animais. Este composto é uma base análoga estrutural da citosina e potente inibidor

das metiltransferases, podendo ser incorporado no DNA durante a replicação, levando a hipometilação do DNA genômico. Os efeitos do AzaC na alteração dos padrões de metilação têm sido estudados em nível molecular, tanto no DNA genômico, com a utilização de técnicas como o HPLC, quanto em sequências específicas, utilizando enzimas de restrição sensíveis à metilação.

Na embriogênese somática, a desdiferenciação das células alvo e a aquisição da competência embriogenética são moduladas pela demetilação do DNA e mediadas por reguladores de crescimento, desencadeando a duplicação do DNA, a transcrição de proteínas de origem embrionária e a indução de pró-embriões. Se a demetilação do DNA não for transiente podem ocorrer distúrbios na formação dos embriões somáticos e/ou perda da competência celular. Desta forma, faz-se necessária a avaliação do padrão de metilação do DNA dos embriões somáticos durante o processo de indução, a fim de investigar o papel da metilação no processo morfogenético e suas implicações na formação dos embriões.

Este trabalho foi estruturado na forma de capítulos visando uma melhor compreensão dos ensaios realizados e seus resultados obtidos. O primeiro capítulo consiste em uma revisão bibliográfica sobre os aspectos da embriogênese somática (ES), com ênfase em *Acca sellowiana*, e na metilação do DNA como um mecanismo epigenético durante a ES. O segundo capítulo aborda a influência do AzaC como um agente hipometilador do DNA global na ES desta espécie, e como este composto afeta o processo de indução e conversão dos embriões somáticos. O terceiro capítulo aborda aspectos relacionados aos níveis de metilação do DNA global durante os diferentes estádios do desenvolvimento dos embriões somáticos através de análises por HPLC, com diferentes formas de detecção.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral*

O presente trabalho tem como objetivo elucidar os efeitos do inibidor da metilação 5-Azacitidina ao longo da embriogênese somática de *Acca sellowiana* e nos padrões de metilação do DNA global.

### 2.2 *Objetivos Específicos*

- i. Estudar o efeito do inibidor da metilação 5-Azacitidina no processo de indução da embriogênese somática em *Acca sellowiana* através de análises morfológicas e histológicas, e a posterior conversão dos embriões somáticos.
- ii. Quantificar os níveis de metilação global dos embriões somáticos obtidos nos tratamentos de indução com e sem o inibidor da metilação em diferentes estádios do desenvolvimento.
- iii. Avaliar a precisão de dois diferentes métodos de quantificação da metilação do DNA por meio de cromatografia líquida de alta eficiência.



**CAPÍTULO 1 – ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO  
PROBLEMA**



## 1. *Acca sellowiana*

A *Acca sellowiana*, popularmente conhecida como goiabeira-serrana, pineapple-guava, ou feijoa, é uma frutífera arbustiva da família Myrtaceae, nativa dos planaltos meridionais do Brasil e com dispersão secundária no nordeste do Uruguai (GUERRA *et al.*, 2001).

Esta espécie foi inicialmente descrita por Berg, em 1856, como *Orthostemon sellowianus*, sendo, em 1859, reclassificada no gênero *Feijoa*. Nesse gênero foram incluídas as três espécies identificadas inicialmente e coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, além do Uruguai. Posteriormente, as três espécies foram agrupadas em apenas uma, a *Feijoa sellowiana* (Berg) (MATTOS, 1969, 1986). Em 1941, o botânico alemão Max Burret incorporou as espécies do gênero *Feijoa* no gênero *Acca* O. Berg, em razão da grande similaridade nas estruturas florais e nas sementes das espécies peruanas pertencentes a este último gênero, como *A. lanuginosa* (Ruiz e Pav. Ex G. Don) McVaughan e *A. macrostema* (Ruiz e Pav. Ex G. Don) McVaughan (MATTOS, 1986; THORPE BIELESKI, 2002).

Diversos estudos comprovaram propriedades farmacológicas nos frutos de *A. sellowiana*, como atividade anti-inflamatória e antialérgica (BASILE *et al.*, 1997), anticancerígena (BONTEMPO *et al.*, 2007) e antimicrobiana potente contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos (BEYHAN *et al.*, 2010).

Visando a conservação e o avanço no conhecimento científico, o manejo da diversidade genética ainda existente, e a viabilização de seu cultivo no Brasil, foi estabelecido o projeto de Domesticação da Goiabeira-Serrana, coordenado pela Epagri – Estação Experimental de São Joaquim e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A partir de projetos de pesquisa realizados pelo Dr. Jean-Pierre H. J. Ducroquet, pesquisador da EPAGRI/São Joaquim, foi estabelecido um Banco Ativo de Germoplasma (BAG), inicialmente na Estação Experimental de Videira, sendo o mesmo transferido posteriormente para a Estação Experimental de São Joaquim (Figura 1).

O convênio entre a EPAGRI e o Departamento de Fitotecnia do CCA/UFSC foi estabelecido na década de 1990, teve como intuito ampliar, de forma articulada, integrada e multidisciplinar o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa na forma de um programa integrado de domesticação da goiabeira serrana. Este programa culminou no lançamento das quatro primeiras cultivares de feijoa para o

estado de Santa Catarina: Helena, Alcântara, Nonante e Mattos (MALGARESI, 2007; DUCROQUET, 2008).



**Figura 1.** A - Exemplares do banco ativo de germoplasma de *Acca sellowiana* na Estação Experimental da EPAGRI de São Joaquim/SC. B – Flores de *A. sellowiana*.

A *A. sellowiana* apresenta fecundação cruzada (PUGLIANO, 1980; SOH, 1985) assegurada por várias espécies de pássaros que se alimentam de suas pétalas (DUCROQUET E HICKEL, 1997). A propagação sexuada via sementes resulta normalmente em uma alta taxa de germinação, com sobrevivência e crescimento satisfatórios. Porém, este método não reproduz as características da planta mãe, não permitindo a fixação das características desejadas das plantas matrizes ou do germoplasma elite. Apesar disto, essa técnica é utilizada para a obtenção de porta-enxertos, os quais apresentam bom vigor (DUCROQUET *et al.*, 2000).

Como alternativa aplicável a este modelo, a propagação *in vitro* fornece um conjunto de técnicas que possibilitam a propagação massal de genótipos selecionados, permitindo a captura e fixação de ganhos genéticos (GUERRA, TORRES E TEIXEIRA, 1999). A aplicação desta técnica é dependente da indução e controle da morfogênese *in vitro* em suas duas rotas: organogênese e embriogênese somática.

A micropropagação por organogênese desta espécie apresenta limitações na taxa de multiplicação (DAL VESCO, 1998; OLTRAMARI *et al.*, 2000). Por outro lado a embriogênese somática é a técnica que possibilita uma maior taxa de multiplicação, assumindo uma grande importância para a propagação massal da espécie, além de estudos básicos relacionados com a fisiologia, genética e bioquímica do desenvolvimento embrionário (GUERRA, TORRES E TEIXEIRA, 1999).

## 2. Embriogênese zigótica

O ciclo de vida das angiospermas pode ser dividido em duas gerações: a geração haplóide ou gametofítica, e uma diplóide ou geração esporofítica. A geração esporofítica é iniciada por um evento de dupla fertilização (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006).

Durante a polinização, o tubo polínico penetra no saco embrionário e libera duas unidades espermáticas. A fusão de uma unidade com o óvulo dá origem ao zigoto e inicia o desenvolvimento embrionário, enquanto que a unidade restante funde-se com a célula central para formar o endosperma, que fornece nutrientes para o desenvolvimento do embrião e/ou posterior à germinação (WEST e HARADA, 1993).

O desenvolvimento do embrião zigótico pode ser conceitualmente dividido em duas fases: uma primeira fase morfofogenética, na qual a estrutura básica do embrião é estabelecida, e uma segunda etapa metabólica caracterizada por atividades bioquímicas que preparam o embrião para a quiescência. Durante a fase morfofogenética, o desenvolvimento do embrião zigótico pode ser dividido em quatro etapas sequenciais gerais em dicotiledôneas: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (LOPES e LARKINS, 1993).

Durante o desenvolvimento do embrião, três domínios especiais são formados ao longo do eixo longitudinal: o domínio apical, constituído pelos cotilédones e meristema apical, o domínio central, incluindo o hipocótilo e, por último, um domínio basal consistindo de primórdios de raiz (WEST e HARADA, 1993).

Na embriogênese zigótica as auxinas são importantes para o desenvolvimento do embrião, especialmente na regulação do padrão de formação embrionário (FISCHER-IGLESIAS e NAUHAUS, 2001). Nas fases tardias da embriogênese observa-se a diminuição dos níveis de ácido giberélico e do AIA, concomitantemente como o progressivo aumento do ácido abscísico na semente, alcançando os valores máximos de concentração (CHIWOCHA e VON ADERKAS, 2002).

No final da fase de desenvolvimento, a estrutura dos órgãos nos embriões está estabelecida, mas em tamanho reduzido. Praticamente, não há proteínas de reserva acumuladas durante a diferenciação e a organogênese, sendo seguido por uma fase envolvendo um aumento das taxas de síntese e deposição de proteínas de reserva, lipídios e amido,

resultando na expansão celular (DODEMAN *et al.*, 1997).

As reservas estão localizadas no endosperma de sementes albuminosas ou nos cotilédones de sementes não albuminosas. O tegumento é formado durante este rápido aumento no tamanho e peso. Os vacúolos apresentam um comportamento especializado durante a maturação, em que eles se separaram e desidratam, dando origem a corpos protéicos e grãos de aleurona, no qual grandes quantidades de proteína se acumulam (DODEMAN *et al.*, 1997). No final da fase de maturação, as sementes entram em dormência, paralisam a síntese e do teor de água diminui rapidamente, permitindo que o embrião sobreviva até que as condições adequadas para a germinação estejam disponíveis (GOLDBERG *et al.*, 1989).

Por definição, a germinação integra os eventos que começam com a absorção de água pelas sementes quiescentes e termina com o alongamento do eixo embrionário. O sinal visível de que a germinação é completa é geralmente a penetração das estruturas que cercam o embrião do sistema radicular, muitas vezes chamado de germinação visível. Eventos subsequentes, incluindo a mobilização das principais substâncias de reserva, estão associados com o crescimento das plântulas (BEWLEY, 1997).

A embriogênese em plantas superiores tem a finalidade de (i) especificar os meristemas e o padrão ápice caulinar-radicular do corpo da planta, (ii) diferenciar os tipos de tecido vegetal primários, (iii) para gerar um órgão de armazenamento especializado essencial para a germinação e o desenvolvimento das plântulas e (iv) para permitir que o esporófito se encontre dormente até que as condições ambientais sejam favoráveis para o seu desenvolvimento pós-embrionário (GOLDBERG, 1989).

O estudo do processo que rege o aparecimento e desenvolvimento do embrião zigótico é limitado pela sua localização dentro da semente, onde é inacessível à manipulação experimental, particularmente durante os primeiros passos do desenvolvimento embrionário (GOLDBERG *et al.*, 1994).

Os eventos de fertilização e posterior desenvolvimento do embrião ocorrem normalmente no interior dos tecidos maternos. O embrião é minúsculo e está rodeado tanto por endosperma quanto por células maternas. Embora a descrição morfológica do desenvolvimento embrionário tenha sido amplamente registrada por meio de microscopia, análises moleculares e bioquímicas, estes estudos têm sido prejudicados

significativamente por essa inacessibilidade física (ZIMMERMAN, 1993). Neste sentido, a embriogênese somática se enquadra como um modelo adequado para a investigação do início do desenvolvimento da planta nas suas mais variadas vertentes (GUERRA, TORRES E TEIXEIRA, 1999).

### **3. Embriogênese somática**

Por sua condição sésstil, as plantas necessitam se acomodar às diferentes variações do ambiente que a circunda, diferentemente dos animais, que possuem como característica o movimento ativo. Com a impossibilidade de migração e a necessidade de contínua organogênese durante seu desenvolvimento, as plantas necessitam manter nichos de células indiferenciadas com potencial morfogenético, os meristemas. Dessa forma, o programa ontogenético das plantas é altamente flexível e isso está ligado à reversibilidade do estado de diferenciação das células vegetais somáticas (FEHÉR *et al.*, 2003).

A embriogênese somática *in vitro* (ES) é uma das rotas de expressão morfogenética pela qual células isoladas ou um pequeno grupo de células somáticas dão origem a embriões (TAUTORUS *et al.*, 1991). Neste processo, células somáticas diferenciadas e mitoticamente quiescentes podem recuperar o potencial embriogênico e originar novos embriões viáveis, através da reprogramação da expressão gênica (MARSONI *et al.*, 2008). A ES segue um padrão morfogenético semelhante ao dos embriões zigóticos formados após a fertilização da célula ovo, apresentando estágios de desenvolvimento embrionários similares (ZIMMERMAN, 1993; GOLDBERG *et al.* 1994).

Há evidências de que os principais processos metabólicos e de desenvolvimento que ocorrem na embriogênese zigótica são mimetizados na embriogênese somática (FEHÉR *et al.*, 2003). Não sendo limitada pela quantidade de tecido ou acessibilidade, como ocorre na embriogênese zigótica, a ES pode ser amplamente investigada por fornecer um sistema modelo para o estudo de diferentes aspectos relacionados ao processo de desenvolvimento da planta, como a competência embriogênica.

Diferentemente de seu análogo zigótico, embriões somáticos podem ser facilmente manipulados, as condições de cultura podem ser controladas e falta de material não é um fator limitante para a

experimentação. Estas características fizeram da embriogênese somática um modelo eficiente para o estudo das características morfológicas, fisiológicas, moleculares e eventos bioquímicos que ocorrem durante o início e desenvolvimento da embriogênese em plantas superiores (NOMURA e KOMAMINE, 1995).

A competência embriogênica celular, em geral, se manifesta após a mudança de uma ou mais condições de cultivo como meio de cultura, composição de reguladores de crescimento vegetal, fonte de carboidrato, potencial osmótico, dentre outras. Após essas alterações, células ou tecidos induzidos alcançam a segunda fase ou fase de expressão, na qual as células se diferenciam em embriões somáticos revelando sua competência embriogênica (JIMENEZ *et al.*, 2005).

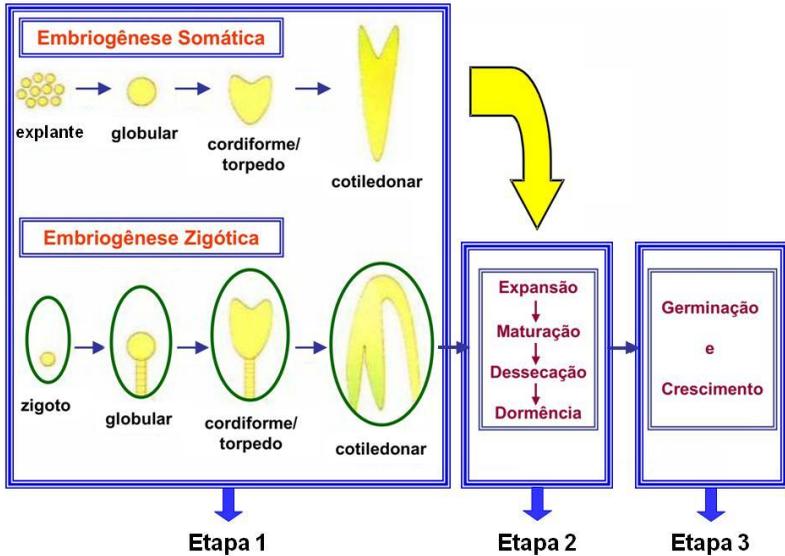
Culturas embriogênicas apresentam células em diversos estágios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (GUERRA, TORRES E TEIXEIRA, 1999).

Na embriogênese zigótica de dicotiledôneas, e analogamente na ES, pequenos embriões globulares inicialmente são formados, em seguida, submetidos a um crescimento isodiamétrico e conseqüente estabelecimento da simetria bilateral. Os embriões evoluem ao estágio cordiforme, em que ambos os cotilédones e meristemas apicais caulinares e radiculares são claramente estabelecidos. O desenvolvimento prossegue com a formação de embriões torpedo e posteriormente cotiledonares. As plântulas formadas contêm cotilédones verdes, hipocótilo alongado e radículas desenvolvidas com pelos radiculares rudimentares (Figura 2) (DEO *et al.*, 2010).

O processo básico para a ES em angiospermas compreende dois ciclos repetitivos. No primeiro, de embriogênese repetitiva, culturas embriogênicas são induzidas em meios de cultura geralmente suplementados com auxinas, sendo a mais utilizada o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). Essas culturas passam por processos de multiplicação, em ciclos repetitivos de divisões celulares, em meios contendo auxinas em baixas concentrações (STEINER *et al.*, 2008).

No segundo ciclo, a fase de maturação, as culturas são estimuladas a prosseguir o seu desenvolvimento pela retirada da auxina do meio de cultura e a utilização de promotores de maturação, como o ácido abscísico (ABA), citocininas e outros osmorreguladores, sendo nesta fase mantidos em exposição à luz. Ao fim deste ciclo, os embriões

somáticos maduros podem ser convertidos em plantas em condições *in vitro* e *ex vitro* e podendo ser utilizados para a obtenção de sementes sintéticas (STEINER *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Principais etapas morfológicas durante a embriogênese em dicotiledôneas. Adaptado de ZIMMERMAN (1993).

A embriogênese somática é promissora para micropropagação clonal massal de genótipos selecionados e está sendo aplicada para a goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret). Essa técnica vem sendo estudada para esta espécie no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC, como mostram os trabalhos de GUERRA *et al.* (1997 e 2001); DAL VESCO E GUERRA, (2001); STEFANELLO *et al.* (2005); CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* (2004, 2007 e 2009), CAPRESTANO (2010) e PESCADOR *et al.* (2008 e 2011), entre outros.

#### 4. Embriogênese somática em *Acca sellowiana*

A embriogênese somática em *Acca sellowiana* foi primeiramente descrita por CRUZ, CANHOTO E ABREU (1990), a partir de calos originados na região cotiledonar de embriões zigóticos cultivados em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), tendo sido esse protocolo posteriormente modificado pela alteração da fonte de carbono no meio de cultura (CANHOTO E CRUZ, 1994).

Segundo CRUZ, CANHOTO E ABREU (1990), células meristemáticas, originadas da região cotiledonar, após duas semanas em cultivo com 2,4-D, apresentavam características típicas de células embriogênicas, sendo pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, núcleo central proeminente com pequenos grãos de amido e vacúolos pequenos.

GUERRA *et al.* (2001) observaram que choques auxínicos, durante duas semanas no meio de cultura contendo 2,4-D, antes da inoculação em meio de cultura isento de reguladores de crescimento resultou na produção antecipada de embriões somáticos em uma grande porcentagem de explantes. Além disso, a indução da embriogênese somática para esta espécie se mostrou genótipo-dependente, visto que para determinados genótipos uma maior frequência de embriões somáticos foi observada. Este fato pôde ser associado com a interação entre o genótipo da planta-mãe e a constituição do meio de cultura (CANHOTO, MESQUITA E CRUZ, 1996; GUERRA *et al.*, 1997).

Utilizando concentrações originais de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  presentes no meio LPm (von Arnold e Eriksson, 1981) suplementado com glutamina (4 mM), DAL VESCO e GUERRA (2001) observaram que o número de embriões somáticos obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos aumentou, e que para embriões zigóticos maduros a adição de asparagina, glicina ou arginina ao meio básico LPm melhorou a indução da embriogênese somática. Na etapa de conversão dos embriões somáticos em plântulas foi observado que o meio básico MS/2 suplementado com BAP foi eficiente.

Filamentos de estames de *A. sellowiana*, inoculados em meio de cultura LP (VON ARNOLD E ERIKSSON, 1981) suplementado com Picloram ( $10 \text{ } \mu\text{M}$ ) e cinetina (Kin) ( $1 \text{ } \mu\text{M}$ ) ou Picloram ( $1 \text{ } \mu\text{M}$ ) e Kin

(0,5  $\mu\text{M}$ ) e posteriormente transferidos para meio líquido LP suplementado com 2,4-D (1  $\mu\text{M}$ ) e 2-iP (1  $\mu\text{M}$ ) apresentaram competência para a indução e estabelecimento de culturas embriogênicas (STEFANELLO *et al.*, 2005). Entretanto a obtenção de embriões não foi reproduzível (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007).

CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* (2004) caracterizaram histologicamente o processo de diferenciação de embriões somáticos, o qual ocorreu a partir da fragmentação de células do cotilédone do embrião zigótico de *Acca sellowiana* em duas etapas: (i) formação de centros meristemáticos a partir do processo de segregação celular, (ii) formação de uma camada de células periférica que circunda o centro meristemático, onde cada célula da camada periférica demonstrou a competência embriogênica.

O protocolo de embriogênese somática desta espécie foi otimizado por CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* (2007). A porcentagem e número de embriões somáticos formados a partir de embriões zigóticos, no meio de cultura LPm suplementado com ácido glutâmico e 2,4-D se mostrou superior, quando comparado a protocolos anteriores. A utilização de um endosperma artificial proporcionou as maiores taxas de conversão dos embriões somáticos encapsulados, sendo que o meio de cultura LPm/2 suplementado com sacarose, BAP e AG<sub>3</sub> revelou-se como um adequado endosperma artificial.

Estudos associados à caracterização dos lipídios de reserva também foram desenvolvidos e os resultados revelaram um elevado grau de semelhança na composição de lipídios totais entre os embriões somáticos e zigóticos desta espécie. Nas duas rotas estudadas o conteúdo de lipídios totais aumentou durante o desenvolvimento do embrião, especialmente na transição do estágio torpedo para o cotiledonar (PESCADOR *et al.*, 2011).

Segundo CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* (2007) o número de embriões somáticos formados por explante de *A. sellowiana* foi alto, porém as taxas de conversão destes embriões somáticos em plântulas se mostraram relativamente baixas. Este fato pode ser atribuído a um possível efeito residual do 2,4-D empregado para a indução da embriogênese.

O 2,4-D tem sido associado com anormalidades genéticas como a aneuploidia, poliploidia e a estimulação de síntese de DNA, o qual

pode resultar em endoreduplicação (GEORGE, 1993). Anormalidades cromossômicas foram verificadas em células de *Nigella sativa*, cultivadas *in vitro*, em meio que continha 2,4-D (CHAND E ROY, 1980). No mesmo contexto, células cultivadas *in vitro*, de *Vicia faba* apresentaram-se poliplóides, sendo esta característica também possivelmente atribuída ao 2,4-D (GEORGE, 1993). Além disso, herbicidas auxínicos, como o 2,4-D, têm apresentado interação com a síntese de etileno e ABA, aumentando os níveis endógenos desses hormônios, também conhecidos como “hormônios do estresse” (GROSSMAN, 2000).

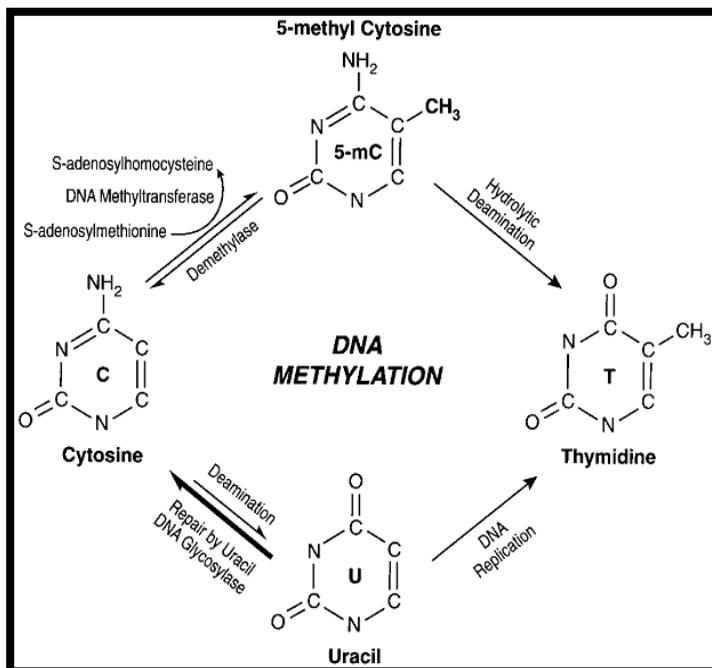
Neste sentido, o baixo percentual de embriões somáticos que retomam o desenvolvimento após a fase cotiledonar tem sido um fator limitante do sucesso da embriogênese somática de *A. sellowiana*, afetando a conversão completa do embrião somático em uma planta inteira (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007; Pescador *et al.*, 2008).

No entanto, indícios mais recentes apontam que a conversão de ES em plântulas foi mais eficiente quando utilizado um pré-tratamento com 2,4-D (200  $\mu$ M) por uma hora, resultando num porcentual mais alto de plântulas convertidas e numa menor taxa de embriões anormais (CAPRESTANO, 2010). Além disso, esta autora observou que apesar de apresentar a formação de ES com cotilédones anormais, a transferência destes para um meio de cultura isento de fitorregulador possibilitou o desenvolvimento posterior normal de grande parte dos ES, com a formação do segundo ou terceiro par de folhas verdadeiras de fenótipo e filotaxia normais.

## **5. A metilação do DNA como um mecanismo epigenético durante a embriogênese somática**

O termo metilação do DNA refere-se à metilação pós-síntese de deoxicitosinas na posição 5' do anel de pirimidina da citosina (a única base que pode ser metilada em plantas) para formar metildeoxicitosina (FINNEGAN e KOVAK, 2000). Essa modificação pode virtualmente ocorrer em qualquer base, mas a transmissão dos padrões de metilação só ocorre em seqüências simétricas CpG, CpNpG, ou CpNpN, onde N

pode ser qualquer deoxinucleotídeo. Nas plantas, a metilação do DNA é mais comum em ilhas CpNpG, característica de transposons, contribuindo ainda mais para o nível de metilação da citosina, especialmente devido à elevada presença destes elementos em genomas de plantas (VALLEDOR *et al.*, 2007) (Figura 3).



**Figura 3.** Representação esquemática das rotas bioquímicas para a metilação da citosina, demetilação, e mutagenese da citosina e 5-mc (SINGAL e GINDER, 1999).

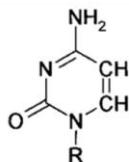
Evidências indicam que o genoma largamente demetilado tem um efeito pleiotrópico sobre a morfologia das plantas, em particular na regulação dos processos de desenvolvimento que ocorrem em tecidos específicos ou em estádios do desenvolvimento em plantas (CHAKRABARTY *et al.*, 2003). Nos últimos anos, a metilação do DNA genômico passou a atrair o interesse da comunidade científica devido à sua importância para a compreensão do desenvolvimento dos animais e plantas. Tem sido comprovado que mudanças específicas na metilação do DNA de plantas estão associadas com a fase de desenvolvimento,

sendo também possível relacionar o *status* de metilação específico à competência morfogênica *in vitro* (NOCEDA *et al.* 2009).

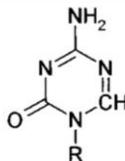
A metilação do DNA tem sido associada com a alteração da expressão gênica em numerosas espécies de plantas, sendo que ela pode aumentar as variações das características quantitativas, pois muitos genes podem ser afetados simultaneamente (JAIN, 2001). Algumas sequências de DNA não metilado em sementes tornam-se metilados em plântulas. A idade do tecido pode mudar o padrão de metilação do DNA, podendo ter um caráter regulatório, e parecendo estar associada com a transição do desenvolvimento em plantas (SULIMOVA *et al.*, 1978).

A alteração mais comum no DNA de plantas é a metilação dos resíduos de citosina na posição do carbono 5, ocorrendo após a replicação. No DNA da planta, até 30% de todos os resíduos de citosina que existem como seqüências CpG são metilados, um nível significativamente mais elevado do que o encontrado em mamíferos, sendo que em *Arabidopsis thaliana*, de 20-30% da citosina é metilada (JEDDELOH E RICHARDS, 1996).

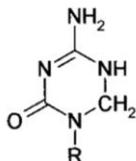
Os agentes demetilantes 5-azacitidina (AzaC) e 5-aza-2'-desoxicitidina levam a uma rápida queda, dose e tempo dependentes, na atividade da DNA metiltransferase, e podem interferir na síntese de DNA hipometilado em sistemas animais (CHRISTMAN, 2002) (Figura 4). Eles são bases análogas estruturais da citosina e potentes inibidores das metiltransferases, podendo ser incorporadas no DNA durante a replicação, levando a hipometilação do DNA genômico. Os efeitos do AzaC na alteração os padrões de metilação têm sido estudados em nível molecular, tanto no DNA genômico, com a utilização de técnicas como o HPLC, quanto em seqüências particulares, usando enzimas de restrição sensíveis à metilação (CASTILHO *et al.*, 1999; TATRA *et al.*, 2000).



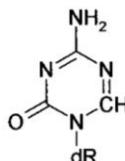
Citidina



5-Azacidina



5,6-Dihidroazacidina

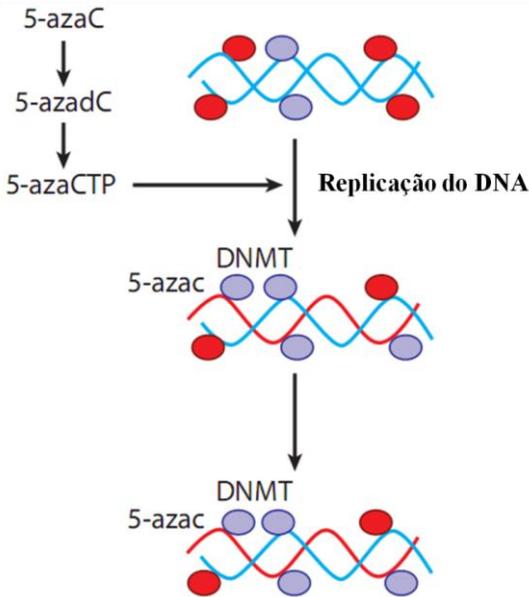


5-Aza-2'-deoxicitidina

**Figura 4.** Estruturas da citidina e seus 5-aza-análogos. R = ribose e dR = desoxirribose. Adaptado de CHRISTMAN (2002).

O 5-AzaC é primeiro fosforilado pelas citidina quinases celulares a nucleotídeos trifosfatados (5-azaCTP) e incorporados ao DNA durante a sua síntese. A DNA metiltransferase (DNMT) forma uma ligação covalente com o carbono da posição 6 da citosina, bem como no anel do 5-aza-citosina do DNA.

Em condições normais, a enzima transfere o grupo metil para a posição de carbono 5 do anel da citosina, permitindo a liberação da enzima de sua ligação covalente com citosina. Quando um anel de 5-aza-citosina substitui a citosina no DNA, a transferência do radical metila não ocorre e a DNMT permanece “presa” ao DNA. A forquilha de replicação avança na ausência da DNMT, resultando em perda passiva de metilação do DNA na vertente nascente (SZYF, 2009) (Figura 5).



**Figura 5.** Mecanismo de ação da 5-Azacytidina (5-AzaC). CGs metilados (círculos vermelhos); CGs não metilado (círculos roxos). Adaptado de SZYF (2009).

O papel da metilação do DNA nas fases iniciais da ES foi descrito, por LOSCHIAVO *et al.* (1989). Neste caso, onde a aplicação do AzaC em culturas embriogênicas de cenoura levou ao desenvolvimento de embriões somáticos no estágio cordiforme, além de induzir a embriogênese secundária. Estes estudos foram complementados posteriormente por YAMAMOTO *et al.* (2005), os quais também investigaram os efeitos do AzaC na indução da ES direta em cenoura. Segundo estes autores, o tratamento com AzaC inibiu totalmente a formação de aglomerados de células embriogênicas nas células epidérmicas de cenoura. Foi ainda observado que quando aplicada durante a morfogênese dos embriões, o AzaC inibia a expressão de LEC1, um gene importante durante o desenvolvimento embrionário. Além disso, em células não tratadas, uma transcrição de genes DNA metiltransferase se acumulava transitoriamente após a aplicação de auxina, mas antes da formação de aglomerados de células embriogênicas, sugerindo um papel direto da metilação do DNA no estabelecimento de competência embriogênica em células somáticas de cenoura (YAMAMOTO *et al.*, 2005).

Em *Acca sellowiana*, vários estudos tem reportado a formação de embriões somáticos anômalos (CRUZ, CANHOTO E ABREU, 1990; CANHOTO, MESQUITA E CRUZ, 1996; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2004; PESCADOR *et al.*, 2008), sendo que as anomalias apresentadas são a presença de mais de dois cotilédones ou cotilédones fusionados e a fusão de embriões. Estas anomalias são claramente perceptíveis e estes embriões descartados, sendo que ainda assim a taxa de conversão de embriões somáticos de *Acca sellowiana* em plântulas é baixa, entre 10 e 19% (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2009; PESCADOR *et al.*, 2008).

CRUZ, CANHOTO E ABREU (1990) propuseram que a baixa taxa de conversão estaria associada ao grande número de embriões somáticos anormais formados, afetando o desenvolvimento pós-embriônico. PESCADOR *et al.* (2008) afirmam que a alta ocorrência de embriões somáticos anômalos e a baixa taxa de conversão em plântulas podem estar associadas ao efeito residual do 2,4-D, que interfere no funcionamento normal dos processos fisiológicos e genéticos.

Além disso, os processos associados à formação dos meristemas estão intimamente ligados a expressão de genes específicos, como *WUSCHEL* e *CLAVATA*, durante a embriogênese. Levando-se em conta que os mecanismos de metilação do DNA podem ativar ou silenciar genes específicos, possivelmente esses eventos podem estar relacionados com o processo anormal de ontogênese dos embriões somáticos de *A. sellowiana*, consequentemente interferindo nas taxas de conversão desses embriões.

Desta forma, para se confirmar a natureza *true-to-type* da plântula regenerada a partir de embriões somáticos de *A. sellowiana*, a análise do padrão de metilação do DNA global figura como uma ferramenta aplicável, visto que modificações reversíveis no DNA, como a metilação, tem se mostrado um importante mecanismo no processo morfogênético vegetal, assim como outros eventos epigenéticos, como a modificações de histonas e o silenciamento gênico mediado pelos miRNAs.

## 6. Referências bibliográficas

- BASILE, A.; VUOTTO, M.L.; SORBO, S.; MARTONE, G.; CASTALDO, C.R. Antibacterial activity in *Acnidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. International Journal of Antimicrobial Agents, Birmingham, v.8, n. 3, p. 199-203, 1997.
- BEYHAN, O.; ELMASTA, M.; GEDIKLI, F. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae). Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(11), pp. 1065-1072. 2010.
- BEWLEY, J.D. Seed Germination and Dormancy. The Plant Cell, Vol. 9, 1055-1066, 1997.
- BONTEMPO, P.; MITA, L.; MICELI, M.; DOTO, A.; NEBBIOSO, A.; BELLIS, F.; CONTE, M.; MINICHIELLO, A.; MANZOA, F.; CARAFA, V.; BASILE, A.; RIGANO, S.; SORBO, S.; COBIANCHI, R.C.; SCHIAVONE, E.M.; FERRARA, F.; SIMONE, M.; VIETRI, M.T.; CIOFFI, M.; SICA, V.; BRESCIANI, F.; LERA, A.R.; ALTUCCI, L.; MOLINARI, A.L. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. The international Journal of Biochemistry & Cell biology. Amsterdam, v. 39, n. 10, p. 1902-1914, 2007.
- CACIOPPO, O. La feijoa. Madrid: Mundi Prensa, 85 p. 1988.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P.; Morphological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. Protoplasma, Karlsruhe v. 224 33–40, 2004.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CAPRESTANO, C.A.; DUCROQUET, J.P.H.J.; GUERRA, M.P. Competência embriogénica em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). Revista Brasileira de Biociências. Revista Brasileira de Biociências, v. 5, p. 87-89, 2007.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; MALDONADO, S.B.; GUERRA, M.P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. Pesq. Agropec. Bras. vol.44 no.3. Brasília, 2009.
- CANHOTO, J.M.; CRUZ, G.S. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae) by manipulation of culture media composition. *In vitro* Cell. Dev. Biol. – Plant. 30:21-25, 1994.

CANHOTO, J.M.; MESQUITA, J.F.; CRUZ, G.L. Ultrastructural Changes in Cotyledons of Pineapple Guava (Myrtaceae) During Somatic Embryogenesis. *Annals of Botany*.78:513-521, 1996.

CAPRESTANO, C.A. Embriogênese somática em *Acca sellowiana*: avanços na indução e conversão. Dissertação de Mestrado (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 99p. 2010.

CASTILHO, A.; NEVES, N.; RUFINI-CASTIGLIONE, M.; VIEGAS, W.; HESLOP-HARRISON, J. S. 5-Methylcytosine distribution and genome organization in Triticale before and after treatment with 5-azacytidine. *Journal of Cell Science* 112, 4397-4404, 1999.

CHAKRABARTY, D.; YU, K.W.; PAEK, K.Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleuterococcus senticosus*). *Plant Science*, Vol. 165, Issue 1, P. 61-68, 2003.

CHAND, S.; ROY, S.C. Effect of different auxins on chromosome behaviour of leaf callus tissues of *Nigela sativa*. *Caryologia*, 33. 387-392, 1980.

CHIWOCHA S, VON ADERKAS P. Endogenous levels of free and conjugated forms of auxin, cytokinins and abscisic acid during seed development in Douglas fir. *Plant Growth Regulation*, v. 36, p. 191–200, 2002.

CHRISTMAN, J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483 – 5495, 2002.

CRUZ, G.L.; CANHOTO, J.M.; ABREU, M.A.V. Somatic embryogenesis and Plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Science* v. 66, p. 263 – 270. 1990.

DAL VESCO, L. L. Indução e controle da embriogênese somática *in vitro* na goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg). Dissertação de mestrado (Mestre em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 109p. 1998.

DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) somatic embryogenesis. *The*

Plant Cell Tissue and Organ Culture, 64: 19-25, 2001.

DEO, P.C.; TYAGI, A.P.; TAYLOR, M.; HARDING, R.; BECKER, D. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences 28(1) 27-40, 2011.

DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botany, v. 48, p. 1493 – 1509, 1997.

DUCROQUET, J.P.H.J. HICKEL, E.R. Birds as pollinators of Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.). Acta Horticulture, v. 452, p. 37–40, 1997.

DUCROQUET, J.P.H.J. HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. Goiabeira-Serrana (*Feijoa sellowiana*). Sociedade Brasileira de Fruticultura/FUNEP, 1. ed. Jaboticabal 66p. 2000.

DUCROQUET, J.P.H.J. Cultivo da goiabeira serrana (*Acca sellowiana*). In: Seminário nacional sobre fruticultura de clima temperado, 8, 2008, São Joaquim. Resumos... São Joaquim, SC: Epagri, 2008.

FACCHINELLO, J.C.; MIELKE, M.S.; NACHTIGAL, J. de C. Propagação vegetativa de goiabeira-serrana. Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas, v.14 233-236, 1992.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D.; Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture v.74 201-228, 2003.

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

FISCHER-IGLESIAS C.; NAUHAUS G. Zygotic embryogenesis hormonal control of embryo development. In: Bhojwani, S.S.; Soh W.Y. (eds) Current Trends in the Embryology of Angiosperms Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 223–247, 2001.

GEORGE, E.F. Plant propagation by Tissue culture. Parte 1. The Technology. 2a. Edição Exwgetics Ltd. Edington, Wilts. BA 13 4 QG. England. 554p. 1993.

GOLDBERG, R.B.; BARKER, S.J.; PEREZ-GRAU, L. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. Cell 56, 149-60, 1989.

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

- GUERRA, M.P.; PESCADOR, R.; DAL VESCO, L.L.; NODARI, R.O.; DUCROQUET, J.P.H.J. *In vitro* Morfogenesis in *Feijoa sellowiana*: Somatic embryogenesis plant regeneration. Acta Horticulture, 452: 27-36, 1997.
- GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; REIS, M. Somatic embryogenesis in Goiabeira-serrana: Genotype Response, Auxinic shock and synthetic seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13: 117-128, 2001.
- JAIN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica, v.118, p.153-166, 2001.
- JEDDELOH, J.A.; RICHARDS, E.J. <sup>m</sup>CCG methylation in angiosperms. The plant journal volume 9, issue 5, pages 579–586, 1996.
- JIMENEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regulation, 47:91–110, 2005.
- LOPES, M.A.; LARKINS, B.A. Endosperm origin, development, and function. Plant Cell. 5(10): 1383–1399, 1993.
- LO SCHIAVO, F.; PITTO, L.; GIULIANO, G.; TORTI, G.; NUTIRONCHI, V.; MARAZZATI, D.; VERGARA, R.; ORSELLI, S.; TERZI, M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiations, hormones and hypomethylating drugs. Theor Appl Genet 77:325–331, 1989.
- MARSONI, M.; BRACALE, M.; ESPEN L.; PRINSI, B.; NEGRI, A.S.; VANNINI, C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. Plant Cell Rep, 27:347–356, 2008.
- MALGARESI, E. T. Goiaba Serrana: A boa nova que vem da serra. Revista Agropecuária Catarinense, Florianópolis, Editora da Epagri, v. 20, n. 2, 2007.
- MATTOS, J.R. Myrtaceae do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. CEUE, 721p. 1969.
- MATTOS, J.R. A goiabeira-serrana. Porto Alegre. Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis, 84 p. 1986.
- NOCEDA, C.; SALAJ, T.; PÉREZ, M.; VIEJO, M.; CAÑAL, M.N.; SALAJ, J.; RODRIGUEZ, R. DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. Trees 23:1285–1293, 2009.

- NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE TA. (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; p. 249 – 266, 1995.
- OLTRAMARI, A.C.; DAL VESCO, L. L.; PEDROTI, E.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O; GUERRA, M.P. Desenvolvimento do protocolo de micropropagação da goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana* Berg). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 61-68, 2000.
- PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B. ; VIVIANI, D. ; KRAUS, J. E. . Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg). *Revista Brasileira de Botânica*, V. 31, P. 155-164. 2008.
- PESCADOR, R.; KERBAUY, G.B.; SANTOS, D.Y.A.C.; DAL VESCO, L.L.; FRAGA, H.P.F.; GUERRA, M.P. Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*. DOI 10.1007/s11738-011-0877-7, 2011.
- PUGLIANO, G. La Feijoa. *Fruticultura*, [S.L.; s.n.], v. 42, n. 9, p. 51-54, 1980.
- QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant cell, tissue and organ culture*, Volume 86, Number 3, 285-301, 2006.
- SINGAL, R.; GINDER, G.D. DNA methylation. *Blood*, 93: 4059-4070, 1999.
- SOH, R. R. La Feijoa. *La platina*: Ipa, n. 31, p. 7-9, 1985.
- STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). *Scientia Horticulturae*, v. 105, p. 117–126, 2005.
- STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J.B.R.; BALBUENA, T.S.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* Biotechnology – Review. *Funct. Plant. Sci. Biotech.*, 2:20-28, 2008.
- SULIMOVA, G.E.; VANYUSHIN, B.F.; CHVOJKA, L.; FRIDRICH, A.; BULGAKOV, R.; CHERNY, B. On the impossibility of the 5-

methylcytosine and its nucleosides incorporation into DNA of higher plants. *Biochemistry (Mosc)* 43:240–245, 1978.

SZYF, M. Epigenetics, DNA Methylation, and Chromatin Modifying Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2009. 49:243–63, 2009.

TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.*, 69:1873-1899, 1991.

TATRA, G.S.; MIRANDA, J.; CHINNAPPA, C.C.; REID, D.M. Effect of light quality and 5-azacytidine on genomic methylation and stem elongation in two ecotypes of *Stellaria longipes*. *Physiologia Plantarum* Vol. 109, Issue 3, p. 313–321, 2000.

THORP, G.; BIELESKI, R. Feijoas: origins, cultivation and uses. *HortResearch*. Auckland: David Bateman, 87 p., 2002.

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

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

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

YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, N.; TOGASHI, T.; MORI, Y.; KIKUCHI, K.; KURIYAMAA, K.; TOKUJI, Y. Formation of embryogenic cell clumps from carrot epidermal cells is suppressed by 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor. *Journal of Plant Physiology* 162 47—54, 2005.

WEST, M.; HARADA, J.J. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *Plant Cell*. 5(10): 1361–1369, 1993.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5:1411–1423, 1993.

**CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO INIBIDOR DA METILAÇÃO 5-  
AZACITIDINA NA INDUÇÃO E CONVERSÃO DE EMBRIÕES  
SOMÁTICOS DE *Acca sellowiana***



## 1. Resumo

Na embriogênese somática tem sido proposto que a desdiferenciação das células alvo e a aquisição da competência embriogênica são moduladas pela metilação do DNA e por fitorreguladores, como o 2,4-D. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do inibidor da metilação do DNA 5-Azacitidina (AzaC) na embriogênese somática em *Acca sellowiana* por meio de análises morfológicas e microscopia óptica. Embriões zigóticos de dois acessos de *A. sellowiana* (101X458 e 85) foram submetidos a quatro diferentes pulsos de 1h (200  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; 200  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 10  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC; 10  $\mu\text{M}$  de AzaC; e 100  $\mu\text{M}$  de AzaC), seguidos da inoculação em meio de cultura LPM suplementado com maltose (30  $\text{g.L}^{-1}$ ), vitamina de Morel, ácido glutâmico (8 mM) e Phytigel<sup>®</sup> (2  $\text{g.L}^{-1}$ ), com diferentes concentrações de AzaC (0, 10 e 50  $\mu\text{M}$ ). Os embriões somáticos obtidos foram, após 50 dias de cultivo, inoculados em meio de conversão LPM suplementado com vitaminas de Morel, sacarose (30  $\text{g.L}^{-1}$ ), BAP (0,5  $\mu\text{M}$ ), AG<sub>3</sub> (1,0  $\mu\text{M}$ ) e carvão ativado (1,5  $\text{g.L}^{-1}$ ). Os tratamentos isentos de 2,4-D apresentaram inibição da formação de embriões somáticos em ambos os acessos testados. O tratamento com suplementação de 10  $\mu\text{M}$  de AzaC no meio de cultura e pulso de 2,4-D resultou na maior formação de embriões para o acesso 101X458, indicando médias de 19,6, 60 e 110,4 embriões somáticos, aos 20, 30 e 45 dias, respectivamente. Para o acesso 85, o tratamento com 50  $\mu\text{M}$  de AzaC com pulso de 2,4-D resultou no maior número de embriões somáticos formados, indicando médias de 14,4, 364,4 e 484 embriões somáticos, aos 20, 30 e 45 dias, respectivamente. Para a conversão, foram obtidas taxas médias de conversão para plântulas de 35% para o acesso 101X458 e 30,2% para o acesso 85, e para o tratamento com pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/50  $\mu\text{M}$  AzaC 16,6% e 8,9%, respectivamente. Os resultados obtidos indicam que o AzaC influencia positivamente a indução de embriões somáticos nesta espécie, contudo, o pulso de 2,4-D se mostrou essencial para este processo. Além disso, foi observado que a presença do AzaC no meio de cultura de indução parece prejudicar as taxas de conversão dos embriões somáticos a plântulas.

## 2. Abstract

It has been proposed that in somatic embryogenesis, the dedifferentiation of target cells and the acquisition of embryogenic competence are modulated by DNA methylation and plant hormones, such as 2,4-D. The present work aimed to study the effect of DNA methylation inhibitor 5-Azacidine (AzaC) during somatic embryogenesis in *Acca sellowiana*, through morphological and optical microscopy analysis. Zygotic embryos of two accessions (101X458 and 85) were submitted to four different pulses of 1h (200  $\mu\text{M}$  2,4-D; 200  $\mu\text{M}$  2,4-D and 10  $\mu\text{M}$  AzaC; 10  $\mu\text{M}$  AzaC; and 100  $\mu\text{M}$  AzaC), followed by inoculation in LPm culture medium with maltose (30  $\text{g.L}^{-1}$ ), Morel vitamins, glutamic acid (8 mM) and Phytigel<sup>®</sup> (2  $\text{g.L}^{-1}$ ) with AzaC different concentrations (0, 10 and 50  $\mu\text{M}$ ). The embryos at 50 days of cultivation, from the induction treatments, were inoculated in conversion LPm medium supplemented with Morel vitamins, sucrose (30  $\text{g.L}^{-1}$ ), BAP (0.5  $\mu\text{M}$ ), AG<sub>3</sub> (1.0  $\mu\text{M}$ ) and activated charcoal (1.5  $\text{g.L}^{-1}$ ). The treatments 2,4-D free showed inhibition of somatic embryos formation in both the accessions tested. Treatment with 10  $\mu\text{M}$  AzaC supplementation in the culture medium and 2,4-D pulse resulted in increased embryos formation for 101X458 access, indicating averages of 19.6, 60 and 110.4 somatic embryos at 20, 30 and 45 days, respectively. To access 85, treatment with 50  $\mu\text{M}$  5-AzaC and 2,4-D pulse resulted in the greatest number of somatic embryos formed, indicating averages of 14.4, 364.4 and 484 somatic embryos at 20, 30 and 45 days, respectively. For the conversion, was observed for the control treatment percentages of 35% for 101X458 access and 30,2% to 85 access, and to 3.1 treatment 16.6% and 8.9% respectively. The results indicate that AzaC positively influences the somatic embryos induction in this species, however, the pulse of 2,4-D proved to be essential for launch this process. Moreover, it was observed that the presence of AzaC in the culture medium induction seem to hinder somatic embryos conversion on new plantlets.

### 3. Introdução

A embriogênese somática (ES) é promissora para micropropagação clonal massal de genótipos selecionados e está sendo aplicada para a goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret). Essa rota morfogênética vem sendo estudada para esta espécie no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC, como demonstram os trabalhos de GUERRA *et al.* (1997 e 2001); DAL VESCO E GUERRA, (2001); STEFANELLO *et al.* (2005); CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* (2004, 2007 e 2009), CAPRESTANO (2010) e PESCADOR *et al.* (2008 e 2011), entre outros.

Durante a indução da ES, o tecido utilizado como fonte de explante passa por uma reprogramação da expressão gênica, possibilitando que as células se tornem competentes e responsivas aos sinais fisiológicos e bioquímicos indutores (DUDITS *et al.*, 1995). Dentre os mecanismos responsáveis pela dinâmica na expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário está a metilação do DNA global, sendo esse processo influenciado pela presença de uma auxina, em geral o 2,4-D (DE KLERK, BRUGGE E MARINOVA, 1997). Uma alteração na metilação no genoma parece ser necessário para modificar um programa celular estabelecido. Como resultado tem-se uma série de divisões que levam ao crescimento desorganizado de células, ou o crescimento polarizado, capaz de formar embriões (DUDITS *et al.*, 1995).

A metilação da citosina do DNA é uma importante alteração epigenética, que aumenta o conteúdo de informação de muitos genomas eucarióticos, incluindo os das plantas superiores (CHAKRABARTY *et al.*, 2003). Este mecanismo desempenha papel importante em processos celulares fundamentais, especialmente no controle repressivo da expressão do genoma sobre o desenvolvimento e na manutenção da integridade genômica global (ZHAO, 2007).

A ES é acompanhada por mudanças dramáticas nos componentes celulares, tais como proteínas, fitormônios, poliaminas e polissacarídeos. Tais mudanças exigem a expressão de muitos genes que são necessários para a síntese ou mobilização desses compostos, sendo que a regulação desses genes pode ser afetada por modificações no genoma, por exemplo, remodelamento da cromatina ou metilação do DNA.

Considerando a relevância de se estudar aspectos do desenvolvimento embrionário, o presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do inibidor da metilação 5-Azacitidina no processo de indução da embriogênese somática em *Acca sellowiana* através de análises morfológicas e histológicas, e suas posteriores consequências na etapa de conversão dos embriões somáticos.

## 4. Material e Métodos

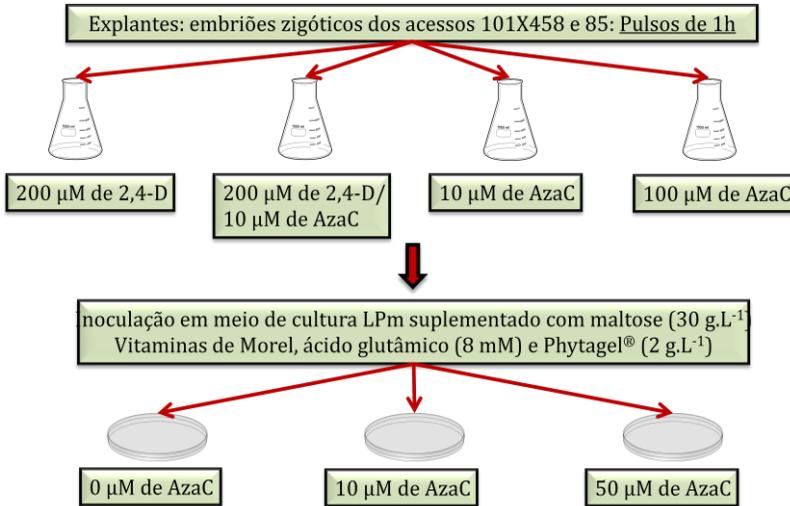
### 4.1. Indução da embriogênese somática

O material vegetal utilizado nos experimentos foi obtido junto a coleção de germoplasma de *A. sellowiana* da EPAGRI da Estação Experimental São Joaquim/SC (Latitude 28°18' S, Longitude 49°56' L), de novembro de 2010 a março de 2011. Os frutos foram transportados em caixas de plástico com gelo seco, sendo em seguida as sementes extraídas dos frutos.

Embriões zigóticos de *Acca sellowiana* foram excisados das sementes obtidas de frutos do acesso 101x458 e do acesso 85, sendo desinfestados segundo procedimentos descritos por GUERRA *et al.* (2001). Antes da inoculação em meio de cultura, foram testados 4 diferentes pulsos de 1h contendo: 200  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (controle); 200  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 10  $\mu\text{M}$  de AzaC; 10  $\mu\text{M}$  de AzaC; e 100  $\mu\text{M}$  de AzaC. Posteriormente, os embriões foram inoculados em placas de petri contendo 25 mL de meio de cultura LPm (VON ARNOLD e ERIKSSON, 1981) suplementado com maltose (30  $\text{g.L}^{-1}$ ), vitamina de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), ácido glutâmico (8 mM) e Phytigel<sup>®</sup> (2  $\text{g.L}^{-1}$ ), com diferentes concentrações de AzaC (0, 10 e 50  $\mu\text{M}$ ). A figura 1 apresenta um resumo esquemático dos procedimentos realizados para a inoculação dos explantes.

Foi testada também a inoculação dos explantes em meio de cultura suplementado com 10  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC por seis dias, seguido da transferência para meio de cultura isento deste inibidor. Visando um melhor entendimento dos tratamentos empregados foi organizada uma tabela onde constam as legendas de cada tratamento testado (Tabela 1). O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 e autoclavado 1,5 atm a 121°C durante 15 min. As culturas foram mantidas em sala de crescimento em ausência de luz, com temperatura controlada de 25°C  $\pm$

2°C.



**Figura 1.** Resumo esquemático do procedimento realizado para a instauração do experimento de indução da embriogênese somática em *A. sellowiana*.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados, cuja unidade experimental foi constituída de 3 placas de petri por tratamento com 5 embriões zigóticos cada, arranjados em três blocos, sendo totalizados 16 tratamentos, com três repetições cada. Dados de indução de embriogênese somática e número de embriões formados foram coletados aos 20, 30 e 45 dias de cultivo, sendo as datas estabelecidas de acordo com ensaios preliminares. Os embriões foram classificados nos diferentes estádios do desenvolvimento (globular, cordiforme, torpeda e cotiledonar). Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de médias SNK (5%).

**Tabela 1.** Tratamentos testados para a indução da embriogênese somática em *A. sellowiana* com o uso de AzaC.

Legenda	Tratamento
1.1	Pulso 200 $\mu\text{M}$ 2,4-D/0 $\mu\text{M}$ AzaC
1.2	Pulso 200 $\mu\text{M}$ 2,4-D + 10 $\mu\text{M}$ AzaC/0 $\mu\text{M}$ AzaC
1.3	Pulso 10 $\mu\text{M}$ AzaC/0 $\mu\text{M}$ AzaC
1.4	Pulso 100 $\mu\text{M}$ AzaC/0 $\mu\text{M}$ AzaC
2.1	Pulso 200 $\mu\text{M}$ 2,4-D/10 $\mu\text{M}$ AzaC
2.2	Pulso 200 $\mu\text{M}$ 2,4-D + 10 $\mu\text{M}$ AzaC/10 $\mu\text{M}$ AzaC
2.3	Pulso 10 $\mu\text{M}$ AzaC/10 $\mu\text{M}$ AzaC
2.4	Pulso 100 $\mu\text{M}$ AzaC/10 $\mu\text{M}$ AzaC
3.1	Pulso 200 $\mu\text{M}$ 2,4-D/50 $\mu\text{M}$ AzaC
3.2	Pulso 200 $\mu\text{M}$ 2,4-D + 10 $\mu\text{M}$ AzaC/50 $\mu\text{M}$ AzaC
3.3	Pulso 10 $\mu\text{M}$ AzaC/50 $\mu\text{M}$ AzaC
3.4	Pulso 100 $\mu\text{M}$ AzaC/50 $\mu\text{M}$ AzaC
4.1	Pulso 200 $\mu\text{M}$ 2,4-D/10 $\mu\text{M}$ AzaC (6 dias)
4.2	Pulso 200 $\mu\text{M}$ 2,4-D + 10 $\mu\text{M}$ AzaC/10 $\mu\text{M}$ AzaC (6 dias)
4.3	Pulso 10 $\mu\text{M}$ AzaC/10 $\mu\text{M}$ AzaC (6 dias)
4.4	Pulso 100 $\mu\text{M}$ AzaC/10 $\mu\text{M}$ AzaC (6 dias)

#### 4.2. Conversão de embriões somáticos

Aos 50 dias de cultivo, os embriões somáticos nos estádios torpedo e pré-cotiledonar oriundos do tratamento controle (pulso de 1h com 200  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e inoculação em meio LPm básico) e do melhor tratamento de indução com AzaC de ambos acessos testados foram submetidos a conversão em plântulas. Os embriões foram convertidos em placas de Petri contendo 25 ml do meio LPm suplementado com vitaminas de Morel, sacarose (30  $\text{g.L}^{-1}$ ), 6-benzilaminopurina (BAP) (0,5  $\mu\text{M}$ ), ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ) (1,0  $\mu\text{M}$ ) e carvão ativado (1,5  $\text{g.L}^{-1}$ ). A unidade experimental foi constituída de cinco placas de Petri contendo em média 35 embriões, arrançados em três blocos. Dados de porcentagem de conversão de embriões em plântulas foram coletados aos trinta dias de cultivo.

### *4.3. Análises histológicas por microscopia óptica*

Amostras representativas das culturas submetidas aos tratamentos de indução da ES foram coletadas aos 10, 20 e 30 dias de cultivo e fixadas em glutaraldeído (2.5 %) em tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,2) por 16-18h a 25°C. Em seguida as amostras foram lavadas três vezes em tampão sem fixativo e desidratadas em série etílica gradual (10–96%), por 30 min cada. As amostras foram imersas em solução de pré-infiltração, compostos pela solução de infiltração do kit de Histo-resina Leica® (50 mL de resina básica e 0,5 g de peróxido de benzoila) com etanol 96% (1:1, v/v) por 16-18h a 25°C.

Em seguida as amostras foram imersas em solução de infiltração pura durante 24h e incluídas em solução de infiltração com endurecedor Leica® (dimetil sulfóxido) na proporção de 15:1 (v/v) e orientadas em moldes plásticos. Secções de 5-7 µm foram obtidas usando micrótomo de rotação SLEE Technik®, distendidas em lâminas com uma gota de água e mantidas a temperatura de 42°C ± 2°C. Após a evaporação da água, foram coradas com azul de toluidina na concentração de 0.05% em H<sub>2</sub>O e os aspectos relevantes foram identificados e fotografados usando câmara DP 71 acoplada a microscópio BX-40 da Olympus®.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Indução da embriogênese somática

De uma maneira geral, dentre os tratamentos testados, aqueles que continham 2,4-D resultaram na formação de embriões somáticos, estando associado ou não à presença de AzaC. Aqueles tratamentos que não continham 2,4-D e apenas a presença do AzaC em diferentes concentrações, não resultaram na formação de embriões somáticos (Tabela 2).

YAMAMOTO *et al.* (2005), relataram que embriões somáticos de cenoura se formaram numa frequência similar a observada no controle (sem AzaC), quando comparada ao tratamento com baixa concentração de AzaC (0.41  $\mu\text{M}$ ). Todos explantes foram tratados por 24h com 2,4-D (1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e posteriormente inoculados em meio de cultura com diferentes concentrações de AzaC (0.41, 4.1 e 20.5  $\mu\text{M}$ ). No entanto, concentrações mais altas de AzaC se mostraram inibitórias à formação de embriões somáticos. Os autores sugeriram que essas concentrações mais altas estariam afetando o processo de transição das células somáticas a células embriogênicas, etapa chave para a indução da ES.

BELCHEV, TCHORBADJIEVA e PANTCHEV (2004), trabalhando com anteras de duas diferentes cultivares de *Triticum aestivum*, relataram que o AzaC causou um claro aumento na indução de calos e regeneração de plântulas em concentrações que variavam de 5 a 10  $\mu\text{M}$ . Foi observado em uma das cultivares testadas um aumento de indução de até 38% no tratamento suplementado com 10  $\mu\text{M}$  de AzaC e de 25% na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , quando comparado ao controle (sem AzaC). Foram testadas concentrações que variaram de 1 pM a 1000  $\mu\text{M}$ , sendo observado que o AzaC apresentou um efeito citotóxico, sem indução de calos ou regeneração de plantas, em concentrações superiores a 100  $\mu\text{M}$ .

No presente trabalho, para o acesso 101X458, foi observado que o tratamento com pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/10  $\mu\text{M}$  AzaC resultou em um maior número de embriões somáticos em todas as datas de avaliação, porém diferindo estatisticamente do tratamento controle (pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/0  $\mu\text{M}$  AzaC) apenas aos 30 e 45 dias de cultivo, indicando médias de 60 e 110,3 embriões somáticos, respectivamente.

Para o acesso 85, observou-se que os tratamentos com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC, pulso 200 uM 2,4-D + 10 uM AzaC/10 uM AzaC e pulso 200 uM 2,4-D + 10 uM AzaC/50 uM AzaC resultaram nas médias mais elevadas de indução embriogênica aos 20 e 30 dias de cultivo, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, inclusive o controle. Porém, aos 45 dias o tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC se destacou, resultando em valores médios de 484 embriões. O acesso 85 se mostrou mais homogêneo quanto à indução de embriões somáticos em todos os tratamentos que continham 2,4-D no pulso quando comparado ao acesso 101X458, principalmente aos 45 dias de cultivo. Este fato provavelmente se deve a resposta genótipo-dependente da espécie, que pode apresentar respostas morfogenéticas diferentes de acordo com a cultivar ou acesso testado (GUERRA *et al.*, 2001).

Estudos envolvendo embriogênese somática em *Cucurbita pepo* L. indicaram que a atividade hipometilante do AzaC não bloqueou a indução da ES, sendo que a adição de AzaC ao meio com 2,4-D não alterava significativamente a proporção de embriões em diferentes estágios com relação ao encontrado no mesmo meio sem AzaC (LELJAK-LEVANIC *et al.*, 2004). Os autores concluíram que a ES pode ser induzida por condições de estresse que se manifestam através de mudanças na metilação, sendo que a correlação dos altos níveis de metilação do DNA e o desenvolvimento embrionário precoce parecem não ser exclusivamente dependentes da presença/ausência de auxinas exógenas.

**Tabela 2.** Média de indução de embriões somáticos de *A. sellowiana* em resposta aos tratamentos testados nos acessos 101x458 e 85 aos 20, 30 e 45 dias de cultivo. As letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos testados submetidos a ANOVA e teste de separação de médias SNK ( $p < 0,05$ ).

Tratamentos	Acesso 101X458			Acesso 85		
	20 dias	30 dias	45 dias	20 dias	30 dias	45 dias
Pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC	7,7 ab	12 b	44,7 b	3,3 c	33,3 d	197,3 b
Pulso 200 uM 2,4-D/10 uM AzaC	19,7 a	60 a	110,3 a	6,7 bc	162,7 bc	163 b
Pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC	0 b	3,7 b	4 b	14,3 ab	364,3 a	484 a
Pulso 200 uM 2,4-D/10 uM AzaC (6 dias)	0 b	6,3 b	23 b	7 bc	176 bc	105,7 b
Pulso 200 uM 2,4-D + 10 uM AzaC/0 uM AzaC	2,7 b	2,7 b	16,3 b	3,3 c	116 cd	105,3 b
Pulso 200 uM 2,4-D + 10 uM AzaC/10 uM AzaC	6 ab	12 b	41 b	15 ab	267,3 ab	210,3 b
Pulso 200 uM 2,4-D + 10 uM AzaC/50 uM AzaC	0 b	2,7 b	39,3 b	19 a	359 a	234,3 b
Pulso 200 uM 2,4-D + 10 uM AzaC/10 uM AzaC (6 dias)	1,7 b	23,3 ab	38,7 b	8,7 bc	75,7 cd	124,3 b
Pulso 10 uM AzaC/0 uM AzaC	5,3 ab	1,7 b	0 b	0 c	0 c	0 c
Pulso 10 uM AzaC/10 uM AzaC	1,3 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 c
Pulso 10 uM AzaC/50 uM AzaC	0,7 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 c
Pulso 10 uM AzaC/10 uM AzaC (6 dias)	0,3 b	2 b	0 b	0 c	0 c	0 c
Pulso 100 uM AzaC/0 uM AzaC	7 ab	0 b	0 b	0 c	0 c	0 c
Pulso 100 uM AzaC/10 uM AzaC	2,3 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 c
Pulso 100 uM AzaC/50 uM AzaC	0,7 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 c
Pulso 100 uM AzaC/10 uM AzaC (6 dias)	0,3 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 c

De acordo com resultados obtidos neste experimento foram escolhidos apenas três tratamentos de cada acesso, para as posteriores análises histológicas e os experimentos de conversão. Essa escolha fez-se necessária visto o grande número de tratamentos testados, que inviabilizaria a realização dos demais experimentos, sendo escolhidos aqueles tratamentos que se mostraram mais contrastantes quanto a indução da ES e a ausência de indução.

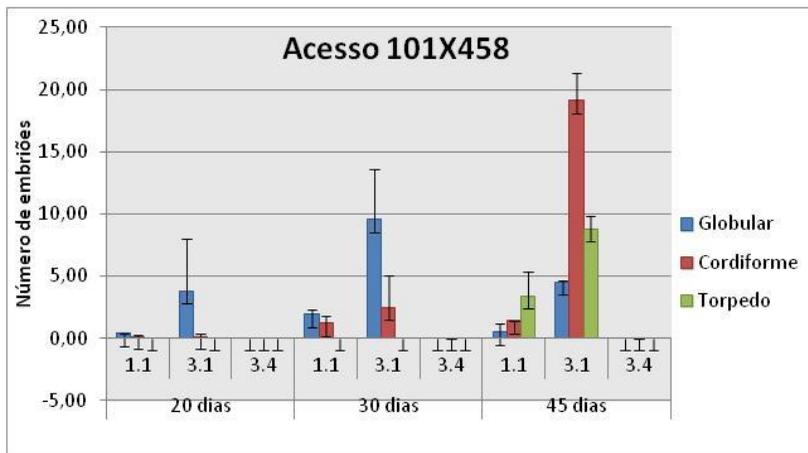
Os tratamentos escolhidos foram o controle (Pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC), o tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC, que foi aquele que indicou maior formação de embriões somáticos dentre todos os tratamentos testados para o acesso 85 aos 45 dias, e o tratamento com pulso 100 uM AzaC/ 50 uM AzaC, que foi um daqueles no qual não foi observada formação de embriões somáticos e que continha os maiores níveis do agente hipometilante AzaC.

Nas figuras 2 e 3 são apresentados os valores médios de embriões somáticos formados de acordo com os diferentes estádios do desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) em diferentes tempos de cultivo entre os três tratamentos acima citados de ambas cultivares testadas.

Para o acesso 101X458 foi observado que o tratamento controle

(Pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC) resultou na formação de embriões somáticos nos estádios globular e cordiforme aos 20 dias (0,4 e 0,1, respectivamente), enquanto que no tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC foram observados valores médios de 0,9 e 0,1, respectivamente. O tratamento com pulso 100 uM AzaC/50 uM AzaC não resultou na formação de embriões somáticos em nenhum dos tempos de avaliação (Figura 2).

Aos 30 dias de cultivo, o tratamento controle resultou em valores médios de 1,9 e 1,2 para a formação de embriões somáticos globulares e cordiformes, respectivamente, enquanto que o tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC resultou na formação de 9,53 e 2,47 embriões somáticos, respectivamente. Aos 45 dias a diferença na formação de ES entre o tratamento controle e o com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC foi bem mais expressiva, tendo o tratamento controle resultado em valores médios de 0,5, 1,4 e 3,4 embriões somáticos nos estádios globular, cordiforme e torpedo, respectivamente, e o tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC apresentou médias de 4,5, 19,1 e 8,8, respectivamente (Figura 2).



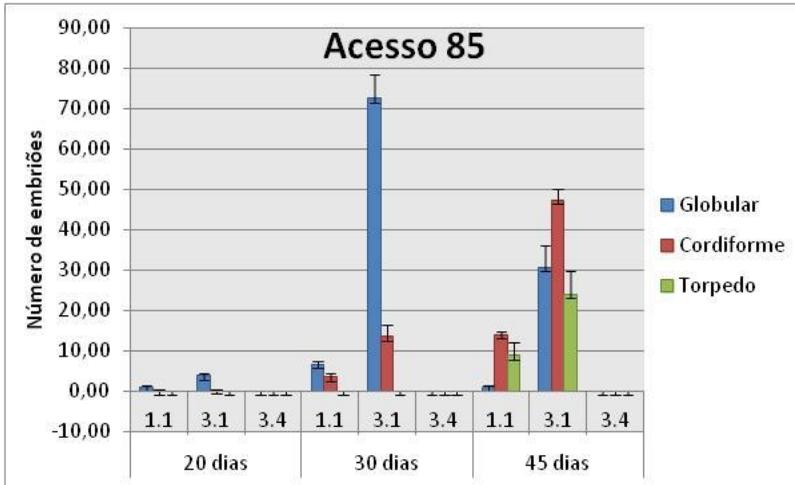
**Figura 2.** Número médio de embriões somáticos de *A. sellowiana* do acesso 101X458 em diferentes tempos de cultivo (20, 30 e 45 dias) em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4. Valores médios seguidos de  $\pm$  desvio padrão (barras verticais). Tratamento 1.1: Pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100 uM de AzaC/50 uM AzaC.

Para o acesso 85 foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados em todos os tempos de cultivo. Assim como observado no acesso 101X458, não houve formação de embriões somáticos em resposta ao tratamento com pulso 100 uM de AzaC/50 uM AzaC em nenhuma das datas de avaliação. Aos 20 dias de cultivo, foram observados no tratamento controle números médios de 0,9 e 0,1 na indução de embriões somáticos globulares e cordiformes e 3,8 e 0,3, respectivamente, em resposta ao tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC (Figura 3).

Aos 30 dias de cultivo foram observadas diferenças significativas entre o número de embriões somáticos formados em resposta ao tratamento controle e o tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC, tanto para a formação de embriões somáticos globulares, que indicaram médias de 6,6 e 72,5, respectivamente, quanto para a formação de embriões cordiformes, que indicaram médias de 3,4 e 13,5, respectivamente.

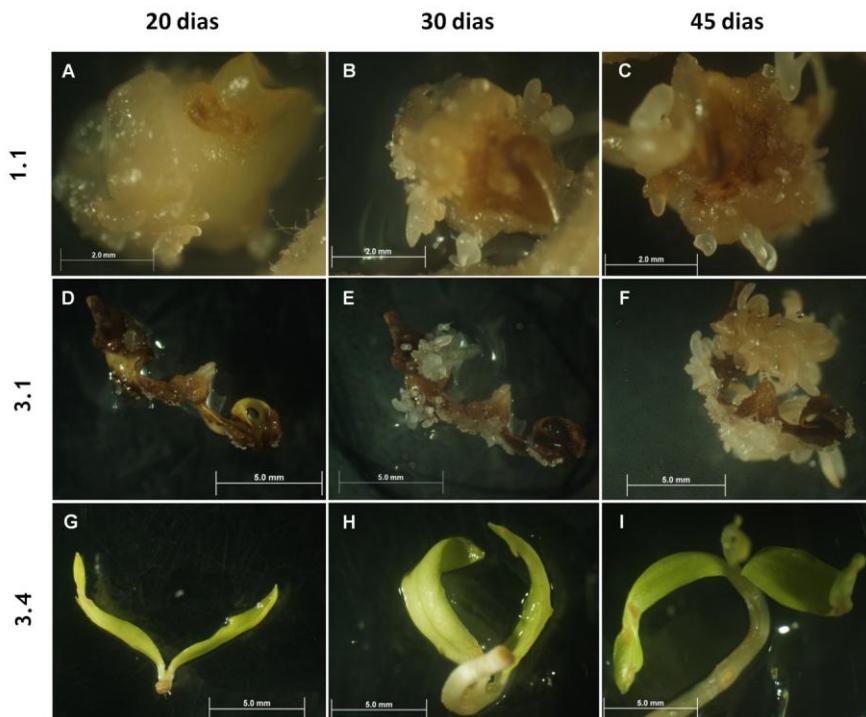
Aos 45 dias o mesmo padrão foi observado, indicando médias de 1,0, 13,9 e 8,8 de embriões somáticos globulares, cordiformes e torpedo em resposta ao tratamento controle, respectivamente, e 30,7, 47,3 e 24,0 para o tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC (Figura 3). Essas diferenças expressivas nas taxas de indução indicam que apesar de o 2,4-D ser indispensável para a indução da embriogênese somática neste caso, como pode ser corroborado com os resultados encontrados para o tratamento com pulso 100 uM de AzaC/50 uM AzaC que não continha 2,4-D, a presença do AzaC no meio de cultura (50 µM) parece favorecer a formação desses embriões.

O papel da metilação do DNA no processo de mudança de fase e no início da ES sugere que esta rota morfogenética pode ser induzida em espécies e explantes até então recalcitrantes para esta rota, através da modificação induzida no seu padrão de metilação, com, por exemplo, o uso de drogas hipometilantes (VON ADERKAS E BONGA, 2000). No presente trabalho, a presença do AzaC notoriamente alterou o padrão de resposta do explante inoculado no meio de cultura, gerando até três vezes mais embriões cordiformes e duas vezes mais embriões torpedo que os resultados obtidos em resposta ao tratamento controle, aos 45 dias de cultivo.



**Figura 3.** Número médio de embriões somáticos de *A. sellowiana* do acesso 85 em diferentes tempos de cultivo (20, 30 e 45 dias) em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4. Valores médios seguidos de  $\pm$  desvio padrão (barras verticais). Tratamento 1.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100  $\mu$ M de AzaC/50  $\mu$ M AzaC.

As figuras 4 e 5 mostram o desenvolvimento dos embriões somáticos nos diferentes acessos testados ao longo do cultivo. Nas imagens é possível notar uma formação mais abundante de embriões no tratamento com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC em ambos acessos, quando comparado ao tratamento controle, como já descrito anteriormente. Também é possível notar a ausência na formação de ES no tratamento com pulso 100  $\mu$ M AzaC/50  $\mu$ M AzaC, no qual é possível observar a formação de clorofila e o desenvolvimento de um processo semelhante a germinação na ausência de luz dos explantes inoculados. A figura 6 mostra em detalhes a formação assíncrona de ES do tratamento com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC do acesso 85 aos 45 dias de cultivo. Na imagem é possível identificar ES nos estádios globular, torpedo e cotiledonar.



**Figura 4.** Aspectos morfogenéticos das culturas do acesso 101X458 de *A. sellowiana* em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4 aos 20, 30 e 45 dias de cultivo. A, B, C, D, E e F – Culturas aos 20, 30 e 45 dias dos tratamentos 1.1 e 3.1, respectivamente, onde é possível observar a presença de regiões com desdiferenciação celular e de embriões somáticos; G, H e I – Aspectos das culturas aos 20, 30 e 45 dias do tratamento 3.4, onde é possível notar a presença de cotilédones do embrião zigótico esverdeados e ausência de embriões somáticos. Tratamento 1.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100  $\mu$ M de AzaC/50  $\mu$ M AzaC.



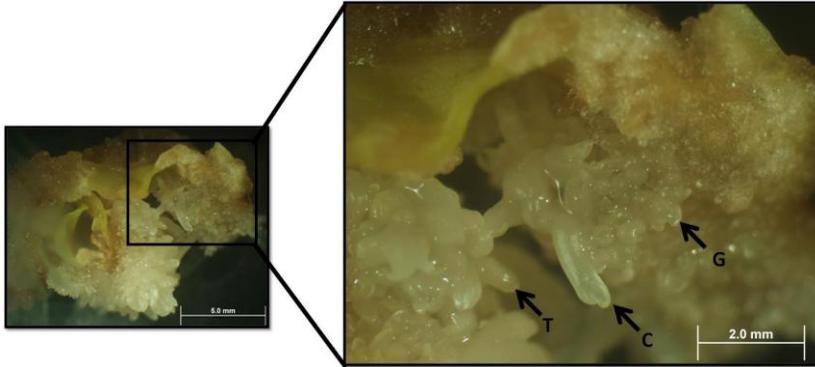
**Figura 5.** Aspectos morfo genéticos das culturas do acesso 85 de *A. sellowiana* em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4 aos 20, 30 e 45 dias de cultivo. A, B, C, D, E e F – Culturas aos 20, 30 e 45 dias dos tratamentos 1.1 e 3.1, respectivamente, onde é possível observar a presença de regiões com desdiferenciação celular e de embriões somáticos; G, H e I – Aspectos das culturas aos 20, 30 e 45 dias do tratamento 3.4, onde é possível notar a presença de cotilédones do embrião zigótico esverdeados e ausência de embriões somáticos. Tratamento 1.1: Pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100 uM de AzaC/50 uM AzaC.

Em um trabalho que descreve uma das primeiras utilizações de drogas hipometilantes na indução da ES em cenoura, LOSCHIAVO *et al.* (1989) relataram que a adição de concentrações crescentes do regulador de crescimento 2,4-D em meio de cultura de células em suspensão esteve correlacionado com uma elevação dos níveis de metilação do DNA.

Culturas embriogênicas e não-embriogênicas de *Medicago truncatula*, quando induzidas na ausência de AzaC, apresentaram um desenvolvimento normal, apenas proliferando-se. Porém, quando as culturas embriogênicas foram inoculadas em meio de cultura contendo AzaC houve formação de embriões somáticos, ao passo que a linhagem não-embriogênica quando inoculada no mesmo meio não progrediu o crescimento, apresentando oxidação e morte celular, ambos após 10 dias de cultivo (SANTOS e FEVEREIRO, 2002).

A propagação associada a condições de estresse frequentemente resulta na instabilidade do genoma da planta e uma desregulação dos controles normais, como resultado dos efeitos epigenéticos relacionados às mudanças na metilação do DNA (KAEPLER, KAEPLER e RHEE, 2000). Em um sistema de cultura de células e tecidos, a diferenciação e desdiferenciação, bem como a divisão celular, são acompanhados por eventos de metilação e demetilação do DNA genômico tecido-específicos (ARNHOLDT-SCHMITT, HERTERICH e NEUMANN, 1995).

Os resultados do presente trabalho sugerem a existência de um nível adequado de metilação, levando a uma maior indução e proliferação de embriões somáticos em resposta ao tratamento contendo 2,4-D e AzaC. O primeiro estaria atuando como um agente metilante do DNA e o outro como um antagonista, que pode estar agindo, desde que numa concentração específica, como um regulador do processo de aquisição de competência morfogênica. Com isso, o tratamento controle, que apenas contém 2,4-D, estaria com um nível de metilação mais alto, ao passo que o tratamento que apenas contém AzaC estaria exibindo um padrão de hipometilação acima da ideal para indução de embriões somáticos, com ausência de formação dos mesmos (Figuras 3 e 4).



**Figura 6.** Detalhe da formação de embriões somáticos do acesso 85 de *Acca sellowiana* em diferentes estádios do desenvolvimento em resposta ao tratamento com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC aos 45 dias de cultivo. G – Globular; T – Torpedo; C – Cotiledonar.

Estudos mostrando que a reativação de genes silenciados após o tratamento com AzaC correlacionados com uma diminuição nos níveis de citosina metilada, indicam que a metilação do DNA desempenha um papel preponderante na regulação da expressão gênica (SANTOS E FEVEREIRO, 2002). Portanto, possivelmente essa alteração na expressão gênica através da hipometilação causada pelo AzaC poderia estar gerando uma resposta morfogenética distinta, o que pode ser observado em nossos experimentos.

### 5.2. Análises histológicas durante a indução da embriogênese somática

Com a finalidade de estudar o processo de formação dos embriões somáticos e avaliar como os tecidos da planta se comportavam de acordo com os tratamentos testados, foram realizadas análises histológicas das culturas inoculadas nos tratamentos de indução da embriogênese somática aos 10, 20 e 30 dias de cultivo de ambos acessos.

Trabalhos anteriores com ES em *A. sellowiana* descreveram alterações histológicas associadas à posição e atividade de células competentes durante a aquisição de competência embriogênica (CANHOTO E CRUZ, 1996; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2004). A formação de uma densa camada de células meristemáticas

originárias da face adaxial dos cotilédones de embriões zigóticos foi descrita. Assim, dois padrões de diferenciação de embriões somáticos foram observados: um a partir de células epidérmicas simples e outros de grupos de células meristemáticas localizadas perto da superfície adaxial (CANHOTO E CRUZ, 1996).

No presente trabalho, aos 10 dias de cultivo foi observado, em resposta ao tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC apenas o aparecimento de algumas protusões e o início de organização dos tecidos, em estruturas semelhantes a pró-embriões, para o acesso 101X458 (Figura 7). Aos 20 dias era possível observar a formação de alguns embriões somáticos globulares na epiderme do explante, além da presença de regiões de células segregantes, resultado da rápida proliferação celular ocorrida.

Os setores observados em verde são produto da reação metacromática do reagente utilizado (azul de toluidina) com compostos fenólicos, podendo ser observadas inúmeras regiões com este tipo de coloração, especialmente em algumas regiões com formação de embriões somáticos. Resultados similares também foram observados em *A. sellowiana*, sugerindo-se que essas células ricas em fenóis formariam uma barreira entre os embriões somáticos e o tecido-matriz durante a indução e desenvolvimento de embriões somáticos (REIS, BATISTA E CANHOTO, 2008). A presença dessas células também poderia servir para bloquear o transporte simplástico, como uma força principal que conduz a alterações morfológicas, favorecendo o desenvolvimento de embriões somáticos através desse isolamento (PFLUGER E ZAMBRYSKI, 2001).

CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* (2004) relataram a existência de regiões de células segregantes após 18 a 21 dias de cultivo, sendo que essas células eram pequenas e isodiamétricas com um núcleo parietal, além de conter compostos fenólicos e grãos de amido. Aos 30 dias de cultivo foi observado um comportamento semelhante comparado aos 20 dias, porém, corroborando com os resultados apresentados no tópico 5.1, não houve o aparecimento abundante de embriões somáticos, apesar da epiderme dos explantes exibirem inúmeras protusões e processos de reorganização do parênquima e epiderme (Figura 7).

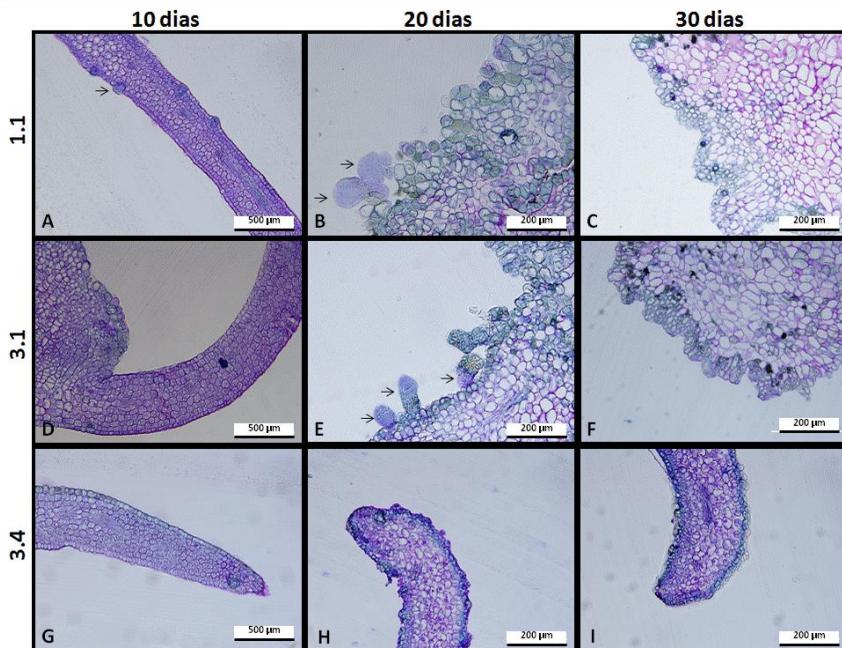
O tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC exibiu um padrão de desenvolvimento semelhante ao do controle, exibindo poucas alterações histológicas aos 10 dias de cultivo. Aos 20 dias em cultivo, observou-se também uma alta taxa proliferativa celular, além do

aparecimento de inúmeros embriões somáticos. Aos 30 dias, novamente foi observada uma involução de algumas estruturas semelhantes a pró-embriões que haviam se formado sobre a epiderme dos explantes, no entanto, apresentando um número considerável de embriões somáticos.

O tratamento com pulso 100 uM AzaC/50 uM AzaC se mostrou o mais diverso quando comparado aos dois anteriores. Esse comportamento já era esperado, visto o não desenvolvimento de embriões somáticos no tratamento testado para a indução, além da ausência de resposta quanto a desdiferenciação dos tecidos e posterior formação de calos. O padrão de distribuição dos tecidos foi fundamentalmente o mesmo aos 10, 20 e 30 dias de avaliação, apresentando uma aparência um tanto quanto mais irregular e rugosa a partir dos 20 dias.

A toxicidade do AzaC em células de mamíferos tem sido atribuída ao seu efeito inibitório sobre a metilação do DNA, resultando na expressão gênica generalizada. Essa expressão gênica generalizada pode ser a razão principal da toxicidade também observada em sistemas de plantas tratadas com AzaC. KLAAS *et al.* (1989) demonstraram que a dose ideal de AzaC em culturas de células em suspensão de tabaco se encontrava na faixa de 1-10  $\mu\text{M}$ , enquanto que as concentrações na faixa de 100  $\mu\text{M}$  resultaram em cerca de 50% de morte celular.

No presente estudo não foi observado até o 30 dias de cultivo morte celular ou mesmo necrose tecidual dos explantes inoculados no tratamento com pulso 100 uM AzaC/50 uM AzaC, porém, foi possível notar após este período o aparecimento de regiões oxidadas, fato não observado nos demais tratamentos testados (dados não apresentados).



**Figura 7.** Secções transversais e longitudinais das culturas de *A. sellowiana* do acesso 101X458 cultivadas aos 10, 20 e 30 dias, entre os diferentes tratamentos de indução da ES testados. A, D e G – Aspectos histológicos das culturas aos 10 dias de cultivo; B, E e H - Aspectos histológicos das culturas aos 20 dias de cultivo; C, F e I - Aspectos histológicos das culturas aos 30 dias de cultivo. As setas indicam a formação de embriões somáticos sobre a epiderme dos explantes. Nas imagens H e I é possível notar ausência de embriões somáticos e uma epiderme mais organizada que as demais no mesmo período. Tratamento 1.1: Pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100 uM de AzaC/50 uM AzaC.

Para o acesso 85, assim como observado nas avaliações visuais de formação de embriões somáticos, algumas diferenças anatômicas puderam ser notadas, quando comparado ao acesso 101X458. O tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC exibiu uma resposta morfogênica relevante aos 10 dias, podendo ser observadas inúmeras protusões e formações de agrupamentos celulares um pouco mais organizados (Figura 8).

Essa rápida resposta morfogênica observada em nossos resultados, para ambos acessos testados, indica um bom potencial de uso

do pulso de 2,4-D, corroborando com o demonstrado por GUERRA *et al.* (2001). Neste trabalho foram testados diferentes tempos de pré-inoculação em meio de cultura suplementado com 2,4-D, sendo encontrado bons resultados principalmente com 2 semanas de pré incubação (GUERRA *et al.*, 2001). Ainda segundo os autores, o curto tempo de exposição ao 2,4-D pode ser associado a uma rápida diferenciação e desenvolvimento de embriões somáticos. No presente trabalho foram utilizados tempos ainda menores de exposição ao 2,4-D, num pulso de apenas 1h, o que pode ter contribuído para repostas ainda mais rápidas.

No presente trabalho para o acesso 85, aos 20 dias foram observadas mudanças semelhantes àsquelas observadas no acesso 101X458 para o mesmo período e tratamento, apresentando regiões de aparente rápida divisão celular e a formação de inúmeras estruturas globosas na superfície do explante. Nas imagens é possível observar que estas estruturas se encontram mais fortemente coradas em azul que os demais tecidos, indicando a presença de células com potencial embriogênico (Figura 8).

O grupo de células presentes na superfície do cotilédone dos embriões zigóticos de *A. sellowiana* foi denominado como células embriogênicas ou meristemáticas por CANHOTO E CRUZ (1996), justamente por eles não necessitarem de um tempo de exposição muito longo a auxinas para a indução da ES. Em condições de cultura adequadas, essas células se mostram competentes para dar início a um programa de desenvolvimento embrionário, resultando na produção de embriões somáticos, mimetizando o padrão de desenvolvimento da embriogênese zigótica (ZIMMERMAN, 1993).

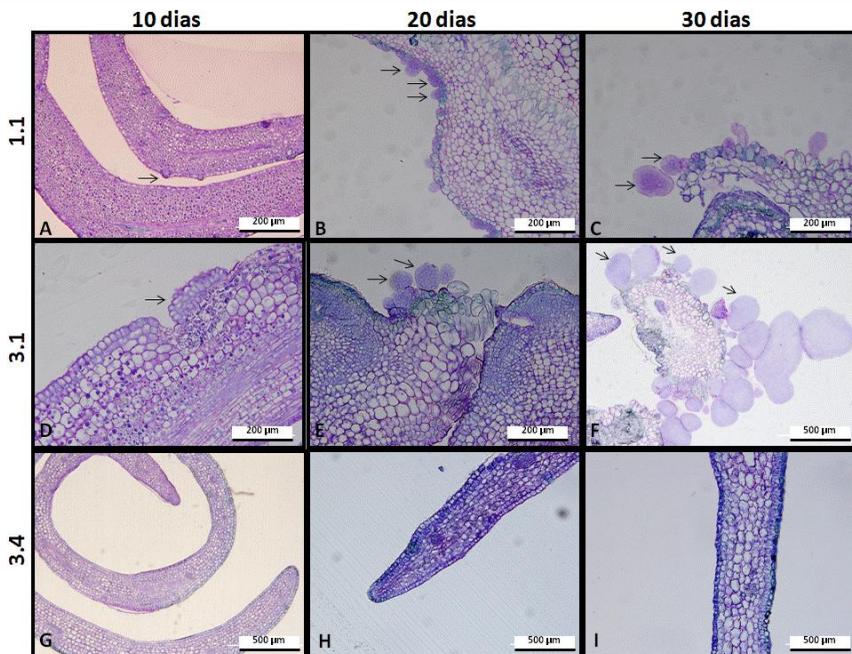
A evolução dessas estruturas meristemáticas ou embriogênicas formadas nos períodos anteriores de cultivo pode ser confirmada aos 30 dias de cultivo, onde o aparecimento de embriões somáticos globulares pode ser observado em regiões específicas dos explantes avaliados. Segundo CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* (2004), a primeira visualização da formação de embriões somáticos propriamente dita foi possível apenas a partir dos 39 dias de cultivo. Os resultados do presente trabalho indicaram o surgimento desses embriões de forma mais precoce, como pode comprovar os dados apresentados no tópico 5.1. Essa diferença pode ser creditada tanto ao fato da utilização de pulsos de 1h de 2,4-D, que pode acelerar esse processo como já discutido, quanto ao fato da embriogênese somática em *A. sellowiana* ser fortemente

genótipo dependente.

GUERRA *et al.* (2001) relataram a existência de respostas morfogênicas diferenciadas quando estudaram 5 diferentes genótipos de *A. sellowiana* durante a indução da ES, sendo este fato relacionado a forte interação entre o genótipo da planta-mãe e a constituição do meio de cultura. Em nossos resultados foi possível observar essa diferença, justamente por realizarmos todo o estudo fundamentado em 2 acessos diferentes, corroborando os resultados anteriormente encontrados para a ES desta espécie.

O tratamento com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC, em que o meio de cultura continha AzaC, demonstrou respostas ainda mais aceleradas que os demais tratamentos. Aos 10 dias foi possível observar claros agrupamentos celulares, apresentando inclusive setores de rápida divisão celular, como pode ser visualizado na imagem, destacado pela seta (Figura 8). Esse padrão se mostrou bastante diferenciado de todos os demais tratamentos aos 10 dias de ambos acessos, confirmando os dados obtidos na contagem de embriões somáticos para este tratamento.

Aos 20 dias de cultivo já foi possível observar a formação de embriões somáticos globulares na superfície do explante, indicados pelas setas. Os tecidos seguiram o mesmo comportamento observado aos 10 dias de cultivo, apresentando inúmeras reentrâncias na superfície e proliferação abundante de células. A análise aos 30 dias de cultivo indicou formação de embriões somáticos em profusão, já sendo possível perceber claramente a formação de epiderme, sendo que alguns embriões já se destacavam da superfície do explante e se desenvolviam independentemente, indicando o desenvolvimento de embriogênese somática secundária (Figura 8 - C e F).



**Figura 8.** Secções transversais e longitudinais das culturas de *A. sellowiana* do acesso 85 cultivadas aos 10, 20 e 30 dias, entre os diferentes tratamentos de indução da ES testados. A, D e G – Aspectos histológicos das culturas aos 10 dias de cultivo; B, E e H - Aspectos histológicos das culturas aos 20 dias de cultivo; C, F e I - Aspectos histológicos das culturas aos 30 dias de cultivo. As setas indicam a formação de embriões somáticos sobre a epiderme dos explantes. Nas imagens H e I é possível notar ausência de embriões somáticos e uma epiderme mais organizada que as demais no mesmo período. Tratamento 1.1: Pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100 uM de AzaC/50 uM AzaC.

O azul de toluidina, reagente utilizado nas análises histológicas do presente estudo, apresenta reação metacromática em azul no citoplasma e o núcleo das células, não marcando vacúolos. Culturas embriogênicas de *Arabidopsis* inoculadas em meio de cultura de indução da ES com e sem AzaC, aos 14 dias de cultivo, indicaram padrões morfológicos distintos (TOKUJI *et al.*, 2011). As células cultivadas em meio de cultura isento de AzaC reagiram fracamente em azul, indicando que o tecido continha células mais vacuolizadas, e portanto mais diferenciadas. Já os calos cultivados em meio com AzaC continham

menos células vacuolizadas e apresentavam grande número de células embriogênicas, coradas fortemente em azul (TOKUJI *et al.*, 2011).

Por fim, no presente trabalho, o tratamento 3.4 indicou padrão de resposta bastante similar a observada para o mesmo tratamento do acesso 101X458, em todas as datas de avaliação (10, 20 e 30 dias).

### 5.3. Conversão de embriões somáticos

Visando avaliar a resposta morfogênica dos embriões somáticos induzidos nos tratamentos com pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/0  $\mu\text{M}$  AzaC e com pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/50  $\mu\text{M}$  AzaC, um experimento de conversão foi realizado. Como o terceiro tratamento (que continha apenas AzaC) não apresentou formação de embriões somáticos, o material utilizado foi resultante apenas dos dois tratamentos já citados.

Resultados anteriores em *Acca sellowiana* indicaram baixas taxas de conversão dos embriões somáticos em plântulas. Segundo CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* (2007), apenas 22,5% e 19% de conversão de embriões somáticos em plântulas após 30 e 45 dias de cultivo, respectivamente, foram obtidas. PESCADOR *et al.* (2008) obtiveram 10% de conversão após 70 dias de cultura, sendo a baixa taxa de plântulas obtidas atribuída a alta porcentagem de embriões somáticos anômalos formados. CAPRESTANO (2010), trabalhando com aparatos de imersão temporária RITA<sup>®</sup>, encontrou uma taxa de 25% de conversão, quando o meio de cultura era suplementado com 0,05  $\mu\text{M}$  de fluridone, um inibidor da síntese de ABA.

No presente trabalho, foi observado para o tratamento com pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/0  $\mu\text{M}$  AzaC porcentagens de 35% de conversão para o acesso 101X458 e 30,2% para o acesso 85, sem diferenças estatísticas entre ambos (Figura 9). Estes valores superam as taxas encontradas nos trabalhos anteriormente citados para esta espécie, indicando um bom potencial de conversão do material induzido. No entanto, a etapa de conversão ainda parece ser um dos fatores limitantes desta rota de desenvolvimento para *A. sellowiana*, visto a alta capacidade desta espécie na etapa de indução e formação de embriões somáticos, levando a uma perda considerável de material obtido.

Para o tratamento com pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/50  $\mu\text{M}$  AzaC foram observadas taxas consideravelmente menores de conversão dos embriões somáticos, com o acesso 101X458 apresentando 16,6% e o acesso 85

taxa de 8,9% (Figura 9). As porcentagens de conversão apresentadas diferem significativamente entre si, sendo possível concluir que o acesso 101X458 responde melhor a etapa de conversão. Contudo, é relevante ressaltar na etapa de indução da ES o acesso 85 respondeu melhor, indicando médias pelo menos duas vezes superiores de formação de embriões somáticos torpeda que o observado no acesso 101X458, neste tratamento. Com isso, é possível estimar que apesar de apresentar uma porcentagem de conversão menor, a obtenção desses embriões é mais abundante, representando, em números absolutos, um número de plântulas formadas potencialmente maior neste acesso e tratamento.

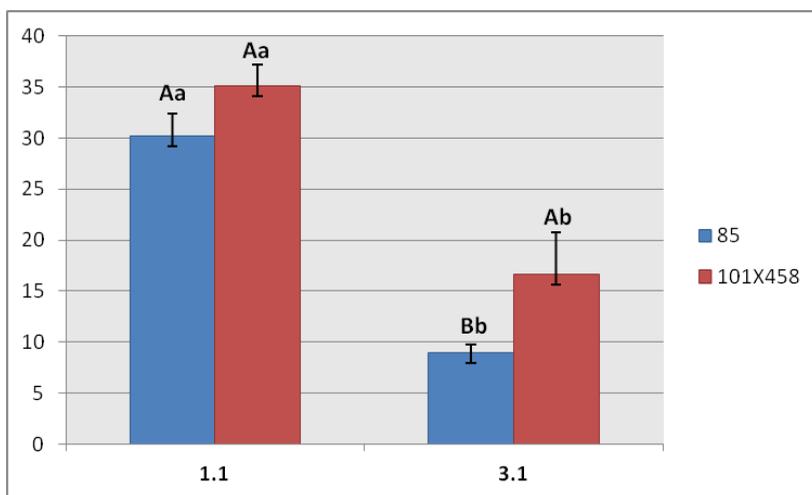
Este mesmo cenário pode ser considerado quando analisamos comparativamente as respostas do tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC e o com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC do acesso 85. Apesar de apresentar diferenças significativas entre as porcentagens de conversão, levando-se em consideração números absolutos a formação de novas plântulas pode ser mais vantajosa no tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC. Entretanto, o cenário ideal seria que os embriões somáticos obtidos apresentassem a mesma capacidade observada para a indução durante a etapa de conversão.

A exposição à auxina aumenta o nível de metilação, resultando no estímulo da divisão celular e desdiferenciação, podendo induzir processos diversos como a ES e formação de raízes adventícias. O processo de metilação induzido pela auxina durante a ES é mediada pela S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilcisteína (SAC). A remoção do 2,4-D resulta na redução da produção de etileno, o que aumenta o acúmulo de SAM e a relação SAM/SAC, que, por sua vez, resulta num aumento da metilação do DNA. Portanto, no momento da remoção do 2,4-D, a metilação é baixa, mas aumenta dramaticamente quando os embriões torpeda e as plântulas somáticas se desenvolvem. Isto sugere que a hipometilação do DNA induza um estado de diferenciação em células somáticas, semelhante ao que ocorre nos embriões zigóticos imaturos (VON ADERKAS E BONGA, 2000).

Estudando a dinâmica da metilação do DNA durante o desenvolvimento sementes de *Silene latifolia*, ZLUVOVA, JANOUSEK E VYSKOT (2001) observaram um processo moderado de hipometilação global durante a sua germinação. Este processo durante os períodos de germinação e pós-germinação refletiria uma forma de transição da semente metabolicamente quiescente para o crescimento

ativo e o desenvolvimento das plântulas.

O status metabólico gerado pela presença do 2,4-D em contato com os explantes pode resultar em níveis crescentes de metilação do DNA. A utilização de drogas hipometilantes conseqüentemente gera um desbalanço nesse padrão, causando drásticas alterações bioquímicas. Sabe-se que existe um equilíbrio sensível do metabolismo das plantas no início de seu desenvolvimento, seja ele hormonal, no processo de acúmulo de reservas, entre outros. É possível supor que a resposta observada no presente trabalho na conversão dos embriões oriundos do tratamento com AzaC seja uma decorrência desse desbalanço, visto que a metilação é um dos inúmeros mecanismos que governam a transição do embrião somático heterotrófico/mixotrófico a condição de plântula autotrófica.

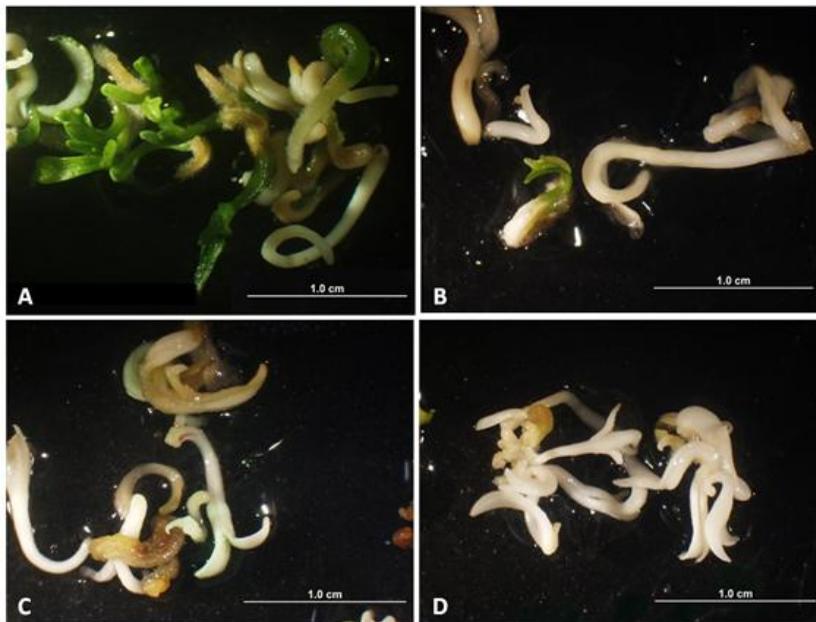


**Figura 9.** Porcentagem de conversão de embriões somáticos dos acessos 85 e 101 X 458 de *A. sellowiana* oriundos dos tratamentos de indução 1.1 e 3.1 aos 30 dias de cultivo. Valores médios seguidos de  $\pm$  desvio padrão. Tratamento 1.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC. As letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os acessos (101X458 e 85), e as letras minúsculas diferença nos tratamentos testados, de acordo com o teste de separação de médias SNK ( $p < 0,05$ ).

As figuras 10 e 11 mostram os embriões somáticos submetidos ao meio de conversão, aos 30 dias de cultivo, oriundos dos tratamentos de indução com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC e o com pulso 200  $\mu$ M

2,4-D/50 uM AzaC, de ambos acessos testados. Nas imagens é possível notar a formação de plântulas em resposta ao tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC e também a presença de alguns embriões somáticos não convertidos, com aparência estiolada. Já no tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC foi possível observar a presença abundante de embriões somáticos estiolados com a presença de poucos embriões esverdeados, em decorrência da baixa taxa de conversão observada (Figura 9).

Explantos de *Petunia* inoculados no tratamento controle apresentaram formação de brotos após 10 dias de cultivo, enquanto que em diferentes tratamentos com AzaC houve um atraso na indução que variou de 3 a 4 semanas (PRAKASH E KUMAR (1997)). Além disso, os autores observaram que quando em meio contendo 5  $\mu$ M de AzaC a formação de brotos caía pela metade, quando comparado ao controle, sendo essa formação inibida diretamente proporcional a maiores concentrações da droga. Os autores sugerem que alguns genes fundamentais na regulação do processo de indução de brotos podem ter seu padrão de expressão alterado na presença dessas drogas, inibindo a indução de novos brotos (PRAKASH E KUMAR, 1997).



**Figura 10.** Conversão de embriões somáticos do acesso 101X458 de *A. sellowiana*, após trinta dias de inoculação. A e B – Embriões somáticos oriundos do tratamento controle (1.1). C e D – Embriões somáticos oriundos do tratamento 3.1. Em A é possível notar o aspecto das plântulas convertidas do tratamento controle. Em B, C e D é possível notar a formação de embriões estiolados, sem presença de clorofila e de aparência esbranquiçada, de ambos tratamentos testados. Tratamento 1.1: Pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/0  $\mu\text{M}$  AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/50  $\mu\text{M}$  AzaC.



**Figura 11.** Conversão de embriões somáticos do acesso 85 de *A. sellowiana*, após trinta dias de inoculação. A e B – Embriões somáticos oriundos do tratamento controle (1.1). C e D – Embriões somáticos oriundos do tratamento 3.1. Em A e D é possível notar o aspecto das plântulas convertidas dos diferentes tratamentos testados. Em B e C é possível notar a formação de embriões estiolados, sem presença de clorofila e de aparência esbranquiçada. Tratamento 1.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC.

A diferenciação implica em um aumento da metilação do DNA, chamado metilação *de novo*. Isto é visto durante a maturação de sementes, por exemplo, assim como na perda de competência embriogênica que normalmente ocorre após um longo prazo de cultivo *in vitro*. Apesar desta dinâmica, alguns padrões de metilação do DNA não são apagados durante a gametogênese e, portanto, não são restabelecidos em todas as gerações, gerando uma espécie de "memória epigenética" (VALLEDOR *et al.*, 2007).

Os resultados apresentados no presente capítulo mostram que a metilação do DNA influencia de forma expressiva na embriogênese somática em *Acca sellowiana*. Foi possível observar que a presença do 2,4-D associada ao AzaC, em doses específicas, contribui para a formação de embriões somáticos, comparado ao tratamento controle sem

o agente hipometilante. Sugere-se ainda que o 2,4-D seja fundamental para o início deste processo, visto que nos tratamentos onde não estava presente não foi observada a presença de novos embriões.

As análises histológicas realizadas revelaram padrões distintos de histomorfogênese. A análise em diferentes tempos de cultivo mostra uma rápida mudança de padrão naqueles tratamentos que resultam na formação de embriões somáticos, indicando inúmeras regiões com rápida divisão celular. A formação dos embriões somáticos na superfície dos cotilédones pode corroborar resultados obtidos anteriormente para esta espécie, mostrando, no entanto níveis diferentes de formação de embriões. O tratamento sem presença de 2,4-D mostra um padrão bastante distinto, fundamentalmente mantendo-se diferenciado e não apresentando competência celular para se desdiferenciar e iniciar o processo de ES.

Os resultados encontrados na etapa de conversão apontam para uma possível desregulação causada pelo AzaC, que estaria afetando a formação de novas plântulas através da mudança de padrão de metilação. Isto indica que apesar de influenciar positivamente a formação de novos embriões somáticos, o AzaC parece exercer um efeito negativo na etapa de formação das plantas autotróficas, resultando em taxas menores de plântulas autotróficas do que aquelas obtidas em resposta ao tratamento controle para indução, em ambos acessos estudados.

## 6. Referências bibliográficas

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

BELCHEV, I.; TCHORBADJIEVA, M.; PANTCHEV, I. Effect of 5-azacytidine on callus induction and plant regeneration potential in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Bulg. J. Plant Physiol, 30(1-2), 45-50, 2004.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P.; Morphological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. Protoplasma, Karlsruhe v. 224 33–40, 2004.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CAPRESTANO, C.A.; DUCROQUET, J.P.H.J.; GUERRA, M.P. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). Revista Brasileira de Biociências. Revista Brasileira de Biociências, v. 5, p. 87-89, 2007.

CANHOTO, J.M.; CRUZ, G.S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* BERG.). Protoplasma 191: 34–45, 1996.

CAPRESTANO, C.A. Embriogênese somática em *Acca sellowiana*: avanços na indução e conversão. Dissertação de Mestrado (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 99p. 2010.

CHAKRABARTY, D.; YU, K.W.; PAEK, K.Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). Plant Science, Vol. 165, Issue 1, P. 61-68, 2003.

DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa sellowiana* Berg) somatic embryogenesis. The Plant Cell Tissue and Organ Culture, 64: 19-25, 2001.

DE KLERK, G.J.; BRUGGE, J.T.; MARINOVA, S. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in malus 'jork 9'. Plant cell, tissue

and organ culture 49: 39–44, 1997.

DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKO, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In Thorpe T. A. (ed) *In vitro* Embryogenesis in Plants (267-308) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1995.

GUERRA, M.P.; PESCADOR, R.; DAL VESCO, L.L.; NODARI, R.O.; DUCROQUET, J.P.H.J. *In vitro* Morfogenesis in *Feijoa sellowiana*: Somatic embryogenesis plant regeneration. Acta Horticulture, 452: 27-36, 1997.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; REIS, M. Somatic embryogenesis in Goiabeira-serrana: Genotype Response, Auxinic shock and synthetic seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13: 117-128, 2001.

KAEPPLER, S.M.; KAEPPLER, H.F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Mol Biol 43:179–188, 2000.

KLAAS, M.; JOHN, M.C.; CROWELL, D.N.; AMASINO, R.M. Rapid induction of genomic demethylation and T-DNA gene expression in plant cells by 5-azacytosine derivatives. Plant Molecular Biology, Vol 12, Nº. 4, 413-423, 1989.

LELJAK-LEVANIC, D.; BAUER, N.; MIHALJEVIC, S.; JELASKA, S. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. Plant Cell Rep, 23:120–127, 2004.

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

MOREL, G M.; WETMORE, R H. Tissue culture of monocotyledons. Am J. Bot v. 38 138-140, 1951.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B. ; VIVIANI, D. ; KRAUS, J. E. . Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg). Revista Brasileira de Botânica, V. 31, P. 155-164. 2008.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G.B.; SANTOS, D.Y.A.C.; DAL VESCO, L.L.; FRAGA, H.P.F.; GUERRA, M.P. Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acca sellowiana* (O.

Berg.) Burret embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*. DOI 10.1007/s11738-011-0877-7, 2011.

PFLUGER, J.; ZAMBRYSKI, P.C. Cell growth: the power of symplastic isolation. *Current Biology*, 11: R436-R439, 2001.

PRAKASH, A.P.; KUMAR, P.P. Inhibition of shoot induction by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in *Petunia* involves DNA hypomethylation. *Plant Cell Reports*, 16: 719–724, 1997.

REIS, E.; BATISTA, M.T, CANHOTO, J.M. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* BERG. *Protoplasma* 232: 193–202, 2008.

SANTOS, D.; FEVEREIRO, P. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 155–161, 2002.

STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). *Scientia Horticulturae*, v. 105, p. 117–126. 2005.

TOKUJI, Y.; TAKANO, S.; TONOMURA, M.; TANAKA, S.; IGARI, T.; WATANABE, T. Influence of 5'-azacitidine on promoting recovery of cell competence for shoot organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 106:289–297, 2011.

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

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

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

YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, N.; TOGASHI, T.; MORI, Y.;

KIKUCHI, K.; KURIYAMA, K.; TOKUJI, Y. Formation of embryogenic cell clumps from carrot epidermal cells is suppressed by 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor. *Journal of Plant Physiology* 162 47—54, 2005.

ZHAO, X.; CHAI, Y.; LIU, B. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids. *Plant Science*, v. 172, 930–938, 2007.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5:1411–1423, 1993.

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

**CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA METILAÇÃO DO DNA GLOBAL  
DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Acca sellowiana* POR MEIO DA  
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**



**1. Resumo** - A metilação de DNA é um mecanismo epigenético regulatório da expressão gênica, sendo que mudanças específicas na metilação do DNA de plantas estão associadas com a fase de desenvolvimento, podendo ser relacionado o *status* de metilação específico à competência morfogênica *in vitro*. O objetivo do presente trabalho foi estudar os padrões de metilação do DNA global na embriogênese somática (ES) de *A. sellowiana* por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para tanto, embriões zigóticos dos acessos 101X458 e 85 foram submetidos a três diferentes tratamentos: a) Pulso 200 µM 2,4-D/0 uM AzaC; b) Pulso 200 µM 2,4-D/50 µM AzaC; c) Pulso 100 µM AzaC/50 µM AzaC, sendo cada pulso consistindo em 1h de duração. Amostras obtidas aos 10, 20 e 30 dias de cultivo foram submetidas a extração de DNA e posterior digestão de ácidos nucleícos, até a obtenção de nucleosídeos. As análises por HPLC foram realizadas por meio de dois tipos de detecção diferentes: detector UV e espectrometria de massas (MS/MS). As análises dos nucleosídeos por HPLC/MS/MS se mostraram mais precisas e mais rápidas, realizando a separação dos compostos em 8 min, comparado a 25 min por HPLC/UV. Os dados obtidos por HPLC/MS/MS indicaram para as amostras do acesso 101X458 no tratamento com pulso 200 µM 2,4-D/0 uM AzaC um aumento crescente na metilação dos 10 aos 30 dias (34,7%, 40,9% e 44,3%, respectivamente). No tratamento com pulso 200 µM 2,4-D/50 µM AzaC observou-se uma queda nos níveis de metilação entre os 10 e 20 dias, seguido de uma alta (39,5%, 36,2% e 41,6%, respectivamente). Para o tratamento com pulso 100 µM AzaC/50 µM AzaC, observou-se uma queda nos três períodos de avaliação (36,8%, 28,8% e 20,8%, respectivamente). Para o acesso 85 o tratamento controle apresentou valores de 22,6%, 35,2% e 41% e o que continha AzaC e 2,4-D valores de 29,9%, 38,9% e 42,6%, sendo estes os tratamentos que estiveram associados à indução da ES. Por outro lado, o tratamento com AzaC, que não resultou na indução da ES, apresentou um padrão bastante distinto, com queda gradual nos níveis de metilação dos 10 aos 30 dias (37,6%, 24,7% e 21,5%). Os resultados indicam que os níveis de metilação exercem papel preponderante no processo de indução da ES em *A. sellowiana*.

**2. Abstract** - DNA methylation is an epigenetic regulatory mechanism of gene expression, and that specific changes in plants are associated with the development phase and maybe related to methylation status of specific *in vitro* morphogenic competence. The objective of this study was to analyze patterns of global DNA methylation in *A. sellowiana* somatic embryogenesis (SE) by high performance liquid chromatography (HPLC). To this end, zygotic embryos of 101X458 and 85 accesses were submitted to three different treatments: a) Pulse 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/0  $\mu\text{M}$  AzaC; b) Pulse 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/50  $\mu\text{M}$  AzaC; c) Pulse 100  $\mu\text{M}$  AzaC/50  $\mu\text{M}$  AzaC. The material obtained at 10, 20 and 30 days of culture was collected and submitted for DNA extraction and subsequent digestion of nucleic acids, to obtain nucleosides. The HPLC analysis was performed by using two different types of detection: UV detector and mass spectrometry (MS/MS). Nucleosides analysis by HPLC/MS/MS were more accurate and faster, making the separation of compounds in 8 minutes, compared to 25 minutes by HPLC/UV. The data obtained by HPLC/MS/MS for the samples of access 101X458 treatment with pulse 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/0  $\mu\text{M}$  AzaC indicated methylation increasing from 10 to 30 days (34.7%, 40.9% and 44.3%, respectively) in the treatment with pulse 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/50  $\mu\text{M}$  AzaC a decrease from 10 to 20 days followed by an increase (39.5%, 36.2% and 41.6%) and a pulse 100  $\mu\text{M}$  AzaC/50  $\mu\text{M}$  AzaC drop from 10 to 30 days (36.8%, 28.8% and 20.8%, respectively). To access 85 was observed methylation increased from 10 to 30 days in treatments with pulse 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/0  $\mu\text{M}$  AzaC and pulse 200  $\mu\text{M}$  2,4-D/50  $\mu\text{M}$  AzaC, with 22.6, 35.2 and 41% for the first and 29.9, 38.9 and 42.6% for the second, which are the treatments that showed SE induction. On the other hand, the treatment with pulse 100  $\mu\text{M}$  AzaC/50  $\mu\text{M}$  AzaC, which showed no SE induction, indicated a very different pattern, with a gradual decrease from 10 to 30 days (37.6, 24.7 and 21.5%). Taken together the results indicate that methylation levels play a key role in the process of SE induction in *A. sellowiana*.

### 3. Introdução

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético regulatório da expressão gênica, sendo que em plantas, o padrão de metilação pode variar de acordo com a espécie, tecido, organela e idade da planta. As alterações específicas na metilação do DNA acompanham toda a vida de uma planta, a partir da germinação das sementes até a morte celular programada ou induzida por vários agentes e fatores de natureza biológica ou abióticos. O crescimento e o desenvolvimento são regulados por hormônios vegetais específicos, sendo a modulação da metilação do DNA um dos modos de ação hormonal na planta (VANYUSHIN *et al.*, 2004).

Em sistemas de cultivo de células e tecidos, processos de diferenciação e desdiferenciação, bem como a divisão celular, são acompanhadas por eventos de metilação e demetilação do DNA genômico tecido-específicos (ARNHOLDT-SCHMITT, HERTERICH e NEUMANN, 1995).

A quantificação da metilação do DNA genômico através da 5-metildeoxicitidina estabelece determinados graus de metilação do DNA global como marcadores para os processos de crescimento e desenvolvimento de plantas. Além disso, do ponto de vista molecular, as variações na metilação do DNA global podem representar alterações na estrutura da cromatina durante as diferentes fases de desenvolvimento de plantas (VALLEDOR *et al.*, 2007).

A metilação do DNA é um mecanismo dinâmico através do qual a plasticidade é induzida por sinais ambientais e/ou ontogênicos, entre outros (RAMCHANDANI *et al.*, 1999). A plasticidade da metilação é definida como as alterações de metilação/demetilação que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento da planta, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Reduções no nível de metilação numa população de células específica, chamado hipometilação, estão sempre associados ao início de um programa de diferenciação, tal como a embriogênese (RAMCHANDANI *et al.*, 1999).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo quantificar os níveis de metilação global das culturas obtidas nos tratamentos de indução com e sem o inibidor da metilação 5-Azacidina, em diferentes estádios do desenvolvimento. Além disso, foi

estudada a precisão de dois diferentes métodos de quantificação da metilação do DNA por meio de cromatografia líquida de alta eficiência.

## **4. Material e Métodos**

### *4.1 Indução da embriogênese somática*

Embriões zigóticos de *Acca sellowiana* foram excisados de sementes extraídas de frutos do acesso 101x458 e do acesso 85 do Banco Ativo de Germoplasma da Estação Experimental da Epagri de São Joaquim. Os procedimentos de desinfestação seguiram as metodologias descritas por GUERRA *et al.* (2001). O processo de indução foi realizado de acordo com o descrito no tópico 3.1 do material e métodos do capítulo 2. De acordo com os resultados obtidos no experimento de indução realizado, como descrito no referido tópico, foram selecionados apenas três tratamentos para a obtenção do material vegetal utilizado nos experimentos de quantificação da metilação do DNA global. Os tratamentos escolhidos foram o tratamento controle (1.1 - Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC), o tratamento 3.1 (Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC) e o tratamento 3.4 (Pulso 100  $\mu$ M AzaC/50  $\mu$ M AzaC), tendo cada pulso duração de 1h.

A unidade experimental foi constituída de cinco placas de Petri (60 x 15 mm) por tratamento com seis embriões zigóticos cada, arranjados em três blocos, com três repetições cada. As amostras oriundas do processo de indução da embriogênese somática foram utilizadas para os procedimentos de quantificação da metilação global, sendo coletadas em duplicata aos 10, 20 e 30 dias de cultivo.

### *4.2. Extração de DNA*

As amostras coletadas, consistindo em culturas embriogênicas ou apenas os embriões zigóticos inoculados, foram submetidas à extração de DNA segundo o protocolo descrito por DOYLE E DOYLE (1987). Foram utilizados 150 mg de matéria fresca, posteriormente depositados em um cadinho de cerâmica ao qual foi adicionado nitrogênio líquido para a maceração do material. Após a maceração

foram adicionados 700 µl de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100mM Tris-Cl, pH 8,0; 2% polivinilpirrolidona e 3% 2-mercaptoetanol), transferido para um microtubo de 2 ml e incubado em banho-maria (60-65°C) por 30 min, sendo agitado a cada 10 min para a homogeneização da amostra. Após a retirada do banho-maria foram adicionados 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA), submetido a agitação por inversão durante 5 min e centrifugação em microcentrífuga (12.000 a 15.000 RPM durante 8 min). Após esse procedimento, foi transferida a fase superior aquosa para um novo tubo onde foram adicionados 50 µl de CTAB 10% e 1,4 M de NaCl. O procedimento de extração com 600 µl de CIA foi repetido novamente, para garantir a qualidade do DNA por meio da máxima extração de impurezas (proteínas, agentes fenólicos, entre outros) possível.

Após a segunda extração, foram adicionados 2/3 do volume de isopropanol para a precipitação do DNA por período não inferior a duas horas a -20°C. Submeteu-se a amostra a nova centrifugação (6000-7500 RPM) por 10 min, até a formação do pellet. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes em álcool 70% por um minuto e uma vez em solução de etanol 95% por um minuto. O sobrenadante foi descartado e o pellet deixado secar por aproximadamente 30 min para a total evaporação do álcool. Uma vez lavado e livre de qualquer resíduo de álcool, o pellet foi resuspenso em 100 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop<sup>®</sup> 1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) que forneceu a concentração de ácido nucléico das amostras.

#### 4.3. Digestão de ácidos nucléicos

Os procedimentos de digestão foram baseados no protocolo desenvolvido por JOHNSTON *et al.* (2005). As digestões com RNase realizadas com 100 µl de ácido nucléico (1 µg.µl<sup>-1</sup>) em tampão TE. As amostras foram aquecidas a 65°C por 5 min para sua desnaturação e incubadas a 4°C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 10 µl de RNase A (1 µg.µl<sup>-1</sup>) e 10 µl de RNase T1 (20 µg.µl<sup>-1</sup>) sendo vortexadas e incubadas a 37°C por 17 horas.

Após a digestão, 20 µl de acetato de sódio (3M, pH 5,4) foram adicionados para uma concentração final de 0,3 M e os microtubos foram agitados. O DNA e o RNA resistente a RNase foram precipitados com 136 µl de isopropanol gelado (-20°C), agitados e incubados por 30

min a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram então centrifugadas a  $5.000 \times \text{g}$  por 10 min para formação de um *pellet*, sendo lavado com etanol 70% (v/v) e re-centrifugados a  $5000 \times \text{g}$  por 5 min. Os *pellets* foram secos a temperatura ambiente e ressuspensos em  $100 \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada e autoclavada. A concentração de ácidos nucleicos foi novamente determinada conforme descrito anteriormente e as concentrações das amostras foram ajustadas para  $0,25 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{O}$ .

As digestões de DNA com nuclease P1 e fosfatase alcalina foram realizadas utilizando  $25 \mu\text{g}$  de ácido nucleico em  $100 \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada, de acordo com o descrito por JOHNSTON *et al.* (2005). Os ácidos nucleicos foram desnaturados por aquecimento a  $100^{\circ}\text{C}$  por 2 min e mantidos a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Foram adicionados  $5 \mu\text{l}$  de  $10 \text{ mM ZnSO}_4$  e  $10 \mu\text{l}$  de nuclease P1 ( $1.0 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  em  $\text{NaOAc } 30 \text{ mM}$  (pH 5.4)) seguido da agitação das amostras e incubação para a reação de digestão a  $37^{\circ}\text{C}$  por 17 horas. Após este período, foram adicionados  $10 \mu\text{l}$  de Tris  $0.5 \text{ M}$  (pH 8.3) e  $10 \mu\text{l}$  de fosfatase alcalina ( $10 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $2.5 \text{ M}$ ) aos microtubos, sendo agitados e incubados por 2h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Por fim, as amostras foram centrifugadas a  $10.000 \times \text{g}$  por 5 min e o sobrenadante foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise por HPLC.

#### 4.4. Análise por HPLC/UV

As análises por HPLC/UV foram baseadas no procedimento descrito por JOHNSTON *et al.* (2005). Foi utilizada uma coluna Hyperclone  $5 \mu\text{m C18}$  ( $250 \times 4.6 \text{ mm}$ ) (Phenomenex<sup>®</sup>), pré-coluna ( $4.0 \times 3.0 \text{ mm}$ ) (Phenomenex<sup>®</sup>) e detector UV a  $280 \text{ nm}$ . O programa de eluição por gradiente consistiu de 3 min com 100% de tampão A ( $0,5\%$  v/v de metanol em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $10 \text{ mM}$ , pH ajustado para 3,7 com ácido fosfórico), seguido por um gradiente linear 3-20 min com 100% de tampão B ( $10\%$  v/v de metanol em  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $10 \text{ mM}$ , pH ajustado para 3,7 com ácido fosfórico), seguido por 20-25 min com 100% de tampão B. O fluxo utilizado foi  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  sendo injetados  $20 \mu\text{l}$  de amostra, com duas repetições cada, totalizando duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas de cada amostra.

As concentrações de nucleosídeos foram determinadas por comparação com padrões externos de acordo com a área do pico formado. Os padrões utilizados foram dNTPs (dA, dT, dC, 5m dC e dG) submetidos a digestão por duas horas com fosfatase alcalina ( $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e Tris-HCl ( $0,5 \text{ M}$  pH 8,3) a  $37^{\circ}\text{C}$ , visando obter-se os nucleosídeos. Os

padrões de nucleosídeos (5-50 mM) foram preparados em H<sub>2</sub>O deionizada e armazenados a -20°C. A quantificação da 5-metil-2'-deoxicitina (5mdC) (%) foi calculada de acordo com a concentração de 5mdC dividido pela concentração de 5mdC somada a concentração de deoxicitidina (dC) multiplicado por 100.

Os dados obtidos foram analisados pelo software STATISTICA<sup>®</sup> para Windows versão 7.0 sendo submetidos a ANOVA e posterior teste de separação de médias. Os tratamentos foram comparados pelo teste SNK para determinar diferenças significativas entre os tratamentos (P < 0.05).

#### 4.5. Análise por HPLC/MS/MS

As análises por HPLC/MS/MS foram baseadas no protocolo descrito por SONG *et al.* (2005). Foi utilizada uma coluna Shim-Pack XR-ODS 2,2 µm C18 (30 × 2 mm) (Shimadzu<sup>®</sup>) e um HPLC Agilent 1200<sup>®</sup> com bomba quaternária acoplado a um espectrômetro de massa 3200 Q TRAP<sup>®</sup> LC/MS/MS (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Foram utilizados dois eluentes, sendo o eluente A metanol 95% e o eluente B ácido fórmico 0,1%, com um gradiente linear de 2 min 1% A e 99% de B e 6 min com 22,5% de A e 77,5% de B para a eluição de nucleosídeos, num tempo total de corrida de 8 min. A separação foi realizada em um fluxo de 220 µL.min<sup>-1</sup>, sendo o volume de injeção de 5 µL com duas repetições cada, totalizando duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas de cada amostra.

Os padrões de nucleosídeos utilizados foram os mesmos acima descritos, sendo suas concentrações determinadas nas amostras de acordo com a área do pico formado. A identificação de cada nucleosídeo foi feita de acordo com a massa conhecida de cada um (5mdC: 242,1/126,3; dC: 228,2/112,2; dG: 268,1/152,3; dA: 252,3/135,9 a dT: 243,3/127,2 em Daltons). A quantificação da 5mdC (%) foi calculada de acordo com a concentração de 5mdC dividido pela concentração de 5mdC somada a concentração de dC multiplicado por 100. A área dos picos obtidos foi analisada pelo software Analyst 1.5.1 (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

Os dados obtidos foram analisados pelo software STATISTICA<sup>®</sup> para Windows versão 7.0 sendo submetidos a ANOVA e posterior teste de separação de médias. Os tratamentos foram comparados pelo teste SNK para determinar diferenças significativas

entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ).

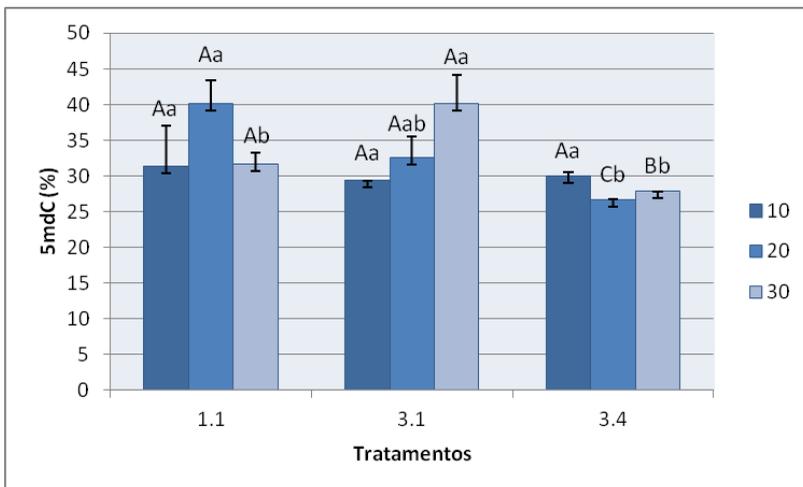
## **5. Resultados e discussão**

### *5.1. Níveis de metilação durante o desenvolvimento embrionário*

Amostras oriundas dos tratamentos de indução testados (1.1, 3.1 e 3.4) aos 10, 20 e 30 dias de cultivo dos acessos 101X458 e 85 tiveram seus níveis de metilação quantificados por HPLC/UV (Figuras 1 e 2).

Estes resultados revelaram padrões distintos de metilação nos diferentes tratamentos. Explantes do 101X458, submetidos ao tratamento controle (Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC) revelaram um sutil aumento nos níveis de metilação aos 20 dias de cultivo quando comparado aos 10 e 30 dias, chegando a cerca de 40% de DNA metilado. Entretanto, não foi observada diferença estática entre os tratamentos, de acordo com o apresentado na Figura 1.

O tratamento com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC aumentou gradativamente sua porcentagem de metilação, apesar da presença do inibidor no meio de cultura. Apesar deste aumento ser perceptível, mais uma vez não houve diferença estatística entre as datas de coleta analisadas. No tratamento com pulso 100  $\mu$ M de AzaC /50  $\mu$ M AzaC, para o qual não se observou a indução da ES, foram observados níveis mais elevados de metilação aos 10 dias (29,9%), ocorrendo uma queda aos 20 dias (26,7%), seguido de um sutil aumento aos 30 dias de cultivo (27,8%). Essa resposta indicou um padrão diferenciado daquele observado em resposta aos demais tratamentos os quais estiveram associados à indução da ES sugerindo uma possível correlação entre os níveis de metilação e competência para a indução da ES.



**Figura 1.** Porcentagem de metilação (5mdC) quantificada por HPLC/UV entre os diferentes tratamentos testados para indução da ES do acesso 101X458 em *Acca sellowiana* em diferentes tempos de cultivo (10, 20 e 30 dias). Valores médios seguidos de  $\pm$  desvio padrão (barras verticais). Letras maiúsculas representam diferenças entre os tempos de avaliação em cada tratamento e letras minúsculas nos tempos de cultivo entre os tratamentos, segundo o teste SNK ( $p < 0,05$ ). Tratamento 1.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100  $\mu$ M de AzaC/50  $\mu$ M AzaC.

Considerando ainda os níveis de metilação nos diferentes tempos de cultivo para o acesso 101X458, observou-se aos 10 dias que a taxa de metilação apresentava homogeneidade em respostas aos diferentes entre os tratamentos, não havendo diferença entre eles. Já aos 20 dias, os níveis de metilação do tratamento com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC (controle) foram superiores aos valores observados nos dois outros tratamentos no mesmo período. Os valores resultantes do tratamento com pulso 100  $\mu$ M AzaC/50  $\mu$ M AzaC apresentaram 26,6% de metilação, comparativamente aos valores de 40,1% observados em resposta ao tratamento controle. Aos 30 dias, a maior porcentagem de metilação ocorreu em resposta ao tratamento com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC, com 40% de metilação, comparativamente aos valores observados em resposta aos tratamentos controle e pulso 100  $\mu$ M AzaC/50  $\mu$ M AzaC, os quais resultaram em níveis de metilação de 31,6% e 27,8%, respectivamente (Figura 1).

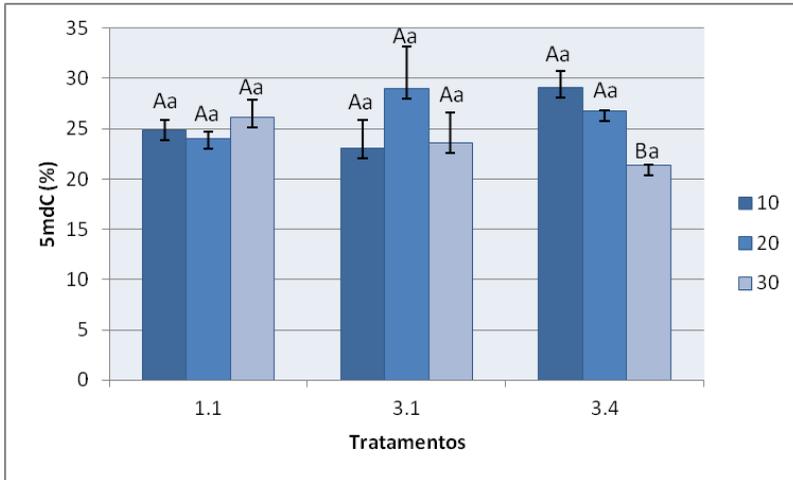
Já, para o acesso 85 (Figura 2), os resultados encontrados

divergiram consideravelmente daqueles obtidos para o acesso 101X458. O tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC resultou em níveis de metilação praticamente constantes ao longo dos dias de cultivo, indicando valores entre 24% e 26% de metilação. O tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC também mostrou um padrão similar, com uma variação um pouco maior em média, porém sem diferenças estatísticas, indicando valores que variaram entre 23% e 29% de metilação. O tratamento com pulso 100 uM AzaC/50 uM AzaC revelou um comportamento divergente dos demais, resultando em níveis decrescentes de metilação ao longo dos dias de cultivo. Assim, aos 10, 20 e 30 dias em cultura observou-se níveis de metilação de 29%, 26,8% e 21,4%, este último diferindo estatisticamente dos demais. Ou seja, este comportamento mais uma vez indicou um padrão diferente de metilação para o tratamento que não induziu ES, quando comparado aos demais (Figura 2).

Trabalhando com hipocótilo de *Arabidopsis* para a indução da ES, TOKUJI *et al.* (2011) também quantificaram por HPLC a porcentagem de 5mdC presente em suas culturas. Os autores relataram que os explantes quando em meio de cultura de indução sem AzaC apresentavam níveis de metilação aumentados ao longo dos dias de cultivo, ao passo que quando o AzaC era suplementado ao meio de cultura os níveis de metilação se mantinham. No presente trabalho, esse padrão foi observado apenas com relação ao meio de cultura contendo AzaC, onde os níveis se mantiveram aparentemente estáveis ao longo do cultivo. Contudo, para os valores observados em resposta ao tratamento controle não foi observado um aumento expressivo nos níveis de metilação em ambos os acessos analisados.

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

Com relação aos tempos de cultivo, mais uma vez as diferenças não se mostraram significativas, não havendo claras diferenças entre os tratamentos testados e seus respectivos tempos de cultivo.



**Figura 2.** Porcentagem de metilação (5mdC) quantificada por HPLC/UV entre os diferentes tratamentos testados para indução da ES do acesso 85 em *Acca sellowiana* em diferentes tempos de cultivo (10, 20 e 30 dias). Valores médios seguidos de  $\pm$  desvio padrão (barras verticais). Letras maiúsculas representam diferenças entre os tempos de avaliação em cada tratamento e letras minúsculas nos tempos de cultivo entre os tratamentos, segundo o teste SNK ( $p < 0,05$ ). Tratamento 1.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100  $\mu$ M de AzaC/50  $\mu$ M AzaC.

Amostras oriundas dos três tratamentos de indução testados aos 10, 20 e 30 dias de cultivo dos acessos 101X458 e 85 também tiveram seus níveis de metilação quantificados por HPLC/MS/MS, e cujos resultados encontram-se sumarizados nas Figuras 3 e 4. Essas análises foram realizadas tanto para determinar qual técnica se mostra mais adequada para este tipo de análise, quanto para confirmar os dados obtidos pelo HPLC com o uso do detector UV, de acordo com o que foi acima apresentado.

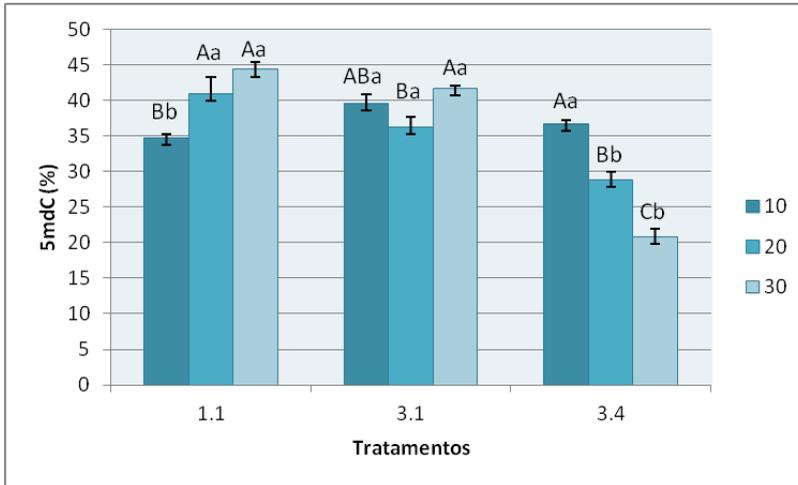
A figura 3 apresenta os dados obtidos para o acesso 101X458. Observou-se grosso modo, padrões distintos em resposta a cada um dos tratamentos, da mesma forma do que foi observado nas análises por HPLC/UV. O tratamento com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC resultou em níveis crescentes de metilação, os quais variaram de 34,7% aos 10 dias a 44,3% de metilação aos 30 dias de cultivo, nível este o mais elevado encontrado em todas as análises em ambos acessos testados.

O DNA em plantas, quando comparado a outros organismos, é o

mais fortemente metilado. Encontrou-se 5mdC no DNA de musgos, samambaias, gimnospermas e angiospermas. Via de regra, o DNA de gimnospermas contém menos 5mdC que em angiospermas (VANYUSHIN, 2006). Os níveis encontrados no presente trabalho para *A. sellowiana* indicam altos índices de metilação, variando de 20 e 45% de metilação aproximadamente, níveis estes substancialmente mais altos do que os encontrados para animais, cujos níveis de metilação podem chegar a apenas 3,1%, em determinadas espécies (WAGNER E CAPESIUS, 1981).

O tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC resultou em níveis mais altos de metilação de DNA aos 10 dias de cultivo (39,5%), seguido de um declínio aos 20 dias (36,2%) e novamente uma alta aos 30 dias (41,6%). Novamente, pode ser notado um padrão de metilação crescente, apesar deste tratamento conter 50 µM de AzaC suplementado ao meio de cultura, podendo essa alta de metilação ser creditada a um possível efeito residual do 2,4-D utilizado no pulso de uma hora, antes da inoculação dos explantes no meio de cultura.

Já o tratamento com pulso 100 uM AzaC/50 uM AzaC resultou em acentuada queda nos níveis de metilação ao longo do período de cultivo. Aos 10 dias as amostras apresentavam 36,6% de metilação com posterior decréscimo para 28,8% e, finalmente revelando valores de 20,8% de metilação aos 30 dias, sendo este o menor índice encontrado em ambas análises por HPLC e em todas amostras analisadas. Essa forte queda pode ser atribuída ao fato deste tratamento conter altos níveis de AzaC, tanto no pulso de uma hora (100 µM), quanto no meio de cultura (50 µM).



**Figura 3.** Porcentagem de metilação (5mdC) quantificada por HPLC/MS/MS entre os diferentes tratamentos testados para indução da ES do acesso 101X458 em *Acca sellowiana* em diferentes tempos de cultivo (10, 20 e 30 dias). Valores médios seguidos de  $\pm$  desvio padrão (barras verticais). Letras maiúsculas representam diferenças entre os tempos de avaliação em cada tratamento e letras minúsculas nos tempos de cultivo entre os tratamentos, segundo o teste SNK ( $p < 0,05$ ). Tratamento 1.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100  $\mu$ M de AzaC/50  $\mu$ M AzaC.

Quando se analisaram os tempos de cultivo separadamente, foi possível notar, aos 10 dias de cultivo, níveis mais altos de metilação em resposta aos tratamentos com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC e com pulso 100  $\mu$ M AzaC/50  $\mu$ M AzaC em relação aos níveis observados em resposta ao tratamento controle (35%) (Figura 3). Já aos 20 dias, observou-se um decréscimo expressivo nos níveis de metilação em resposta ao tratamento com pulso 100  $\mu$ M AzaC/50  $\mu$ M AzaC, bem como o aumento significativo nos níveis de metilação em resposta ao tratamento controle. Esse mesmo padrão de comportamento foi observado aos 30 dias com os tratamentos com pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC e controle (Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC), apresentando níveis de 41,6% e 44,3%, respectivamente, enquanto que o tratamento com pulso 100  $\mu$ M AzaC/50  $\mu$ M AzaC resultou em níveis de 20,8% (Figura 3).

Os resultados obtidos no acesso 85 são apresentados na figura 4. O tratamento controle resultou em um padrão de metilação

semelhante ao encontrado para o acesso 101X458 na quantificação por HPLC/MS/MS. Aos 10 dias foi observado um percentual de 22,6 de metilação, ocorrendo então uma expressiva elevação para 35,2% aos 20 dias e outra alta aos 30 dias (41%).

O tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC, revelou um comportamento similar ao encontrado para o tratamento controle. Nos três períodos de avaliação as taxas respectivas de metilação foram de 30%, 38,9% e 42,6%.

É possível supor que, essa diferença no padrão de metilação encontrado para este acesso neste tratamento (Pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC) esteja correlacionada com o fato de o mesmo ter resultado em uma das maiores taxas de indução da ES entre todos os tratamentos testados, como apresentado no capítulo 2. Além disso, o fato deste tratamento apresentar um comportamento semelhante ao encontrado no controle positivo em ambos acessos testados, indica de fato que os níveis de metilação exercem papel preponderante no processo de indução da ES em *A. sellowiana*.

A indução de embriogênese somática consiste na rescisão de um padrão atual de expressão gênica no tecido do explante, e a sua substituição por um programa de expressão gênica embriogênico (CHAKRABARTY *et al.*, 2003). O aumento crescente na metilação observado no presente trabalho pode estar associado a essa drástica mudança de padrões que ocorre no processo de competência e de determinação sofrido pelo explante, e posteriormente pelos embriões somáticos induzidos. Outros trabalhos que descreveram essa dinâmica no padrão de metilação durante o desenvolvimento também reportaram essa mudança de padrão. Assim, em *Arabidopsis thaliana* observou-se que o nível de metilação do DNA aumentava durante o desenvolvimento das plântulas (RUIZ-GARCÍA *et al.*, 2005).

A metilação da citosina no DNA controla o crescimento e desenvolvimento das plantas. Similar aos animais, a metilação específica da citosina em plantas controla praticamente todos os processos genéticos, incluindo a transcrição, replicação, mecanismo de reparo do DNA e diferenciação celular, além de estar particularmente envolvida no silenciamento de genes específicos e elementos de transposição (VANYUSHIN, 2006). Esses níveis crescentes de metilação encontrados no presente trabalho possivelmente estão afetando diretamente o controle da expressão gênica, além de todos os processos genéticos descritos. Essas alterações podem ser elementos-

chave do processo de morfogênese *in vitro* de *A. sellowiana*, visto que os processos de competência e determinação estão intimamente relacionados ao controle da expressão gênica.

Foi observado para o tratamento com pulso 100 uM AzaC/50 uM AzaC níveis mais altos de metilação aos 10 dias de cultivo (37,6%), havendo um considerável declínio aos 20 dias (24,7%), seguido de uma sutil queda aos 30 dias (21,5%), porém a última não apresentando diferenças significativas. Essa acentuada queda na metilação observada dos 10 para os 20 dias de cultivo e a posterior diminuição não-significativa aos 30 dias provavelmente deve-se ao fato do AzaC ir diminuindo sua ação ao longo do cultivo. Além disso, o pulso com altas doses de AzaC pode ter gerado nos períodos iniciais uma brusca hipometilação, o que foi observado neste tratamento tanto para o acesso 101X458 quanto para o acesso 85 dos 10 para os 20 dias de cultivo.

É sabido que as plantas têm uma tendência e a capacidade de reestabelecer um padrão de metilação do genoma inicial, podendo essa capacidade sofrer um distúrbio em resposta a droga (AzaC). O tratamento com AzaC resultou no desenvolvimento de morfologias alteradas em alelotetraplóides de *Arabidopsis thaliana* e *Cardaminopsis arenosa* (MADLUNG *et al.*, 2002). Essa mesma distorção pode ter ocorrido com os explantes inoculados no tratamento apenas com AzaC, levando a uma resposta morfogenética inesperada, com os embriões zigóticos germinando em ausência de luz (dados apresentados no capítulo 2).

É possível supor ainda que a aparente “germinação” dos explantes, neste caso embriões zigóticos, deve-se a respostas mais complexas. LU *et al.* (2006), estudando os níveis de metilação de sementes de *Brassica napus* por HPLC e também por marcadores moleculares, descreveram que eventos de metilação e demetilação ocorriam durante o processo germinativo. No entanto, os eventos de demetilação pareciam ser mais frequentes e com um maior número de sítios de demetilação. Este relato pode vir a ser uma possível explicação da aparente germinação desses explantes, visto que o AzaC em altas concentrações induziu um alto processo de hipometilação, como mostram os nossos resultados, levando os embriões zigóticos a germinar.

Os níveis de metilação, quando comparados nos tempos de cultivo, apresentaram algumas diferenças substanciais. Aos 10 dias, observou-se em resposta ao tratamento com pulso 100 uM AzaC/50 uM AzaC os maiores níveis (37,6%), seguido das respostas elicitadas pelos

tratamentos com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC e controle, com valores de 29,9% e 22,6%, respectivamente. Aos 20 dias, níveis mais elevados de metilação foram observados em resposta aos tratamentos controle e com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC (35,2% e 38,9%, respectivamente), diferindo dos resultados elicitados pelo tratamento com pulso 100 uM AzaC/50 uM AzaC, que resultou em valores de 24,7%.

Por fim, aos 30 dias, novamente foram observados níveis semelhantes de metilação em resposta aos tratamentos controle e com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC (41% e 42,6%), e níveis expressivamente mais baixos em resposta ao tratamento apenas com AzaC (21,5%). Como discutido anteriormente, essas diferenças novamente refletem o padrão de resposta morfogênética diferenciada observada nos diferentes tratamentos analisados no capítulo 2, quando então foram estudadas as taxas de indução de ES.

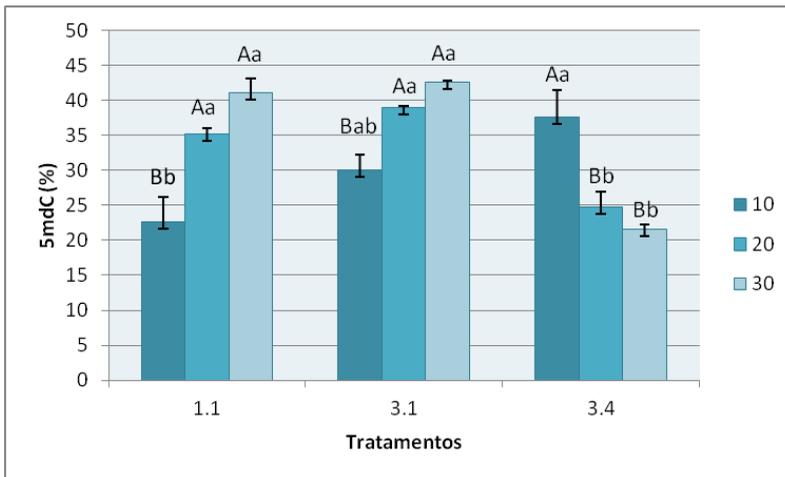
Altos níveis de metilação durante a morfogênese *in vitro* podem ser atribuídos à presença do 2,4-D no meio de cultura. Trabalhando com diferentes tecidos embriogênicos de *Rosa hybrida* L., XU, LI E KORBAN (2004) atribuíram as diferenças observadas na metilação do DNA desses tecidos à presença de reguladores de crescimento, como o 2,4-D, no meio de cultura. O 2,4-D é conhecido por induzir aberrações cromossômicas em plantas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e também exerce pressão de seleção favorecendo mudanças nos níveis de ploidia. Além disso, a recuperação ou eliminação de sequências repetitivas de DNA em um genoma pode levar a um aumento ou queda do conteúdo de DNA por núcleo, resultando em acentuadas mudanças na organização do genoma (XU, LI E KORBAN, 2004). Essas e outras evidências levam a crer que as diferenças na metilação do DNA encontradas no presente trabalho também podem ser resultado de alterações adicionais de polimorfismo.

Estudos recentes envolvendo a caracterização de mutantes epigenéticos de *Arabidopsis thaliana* revelaram que a expressão do gene *WUS* e componentes da sinalização de auxinas, que são cruciais para o início da formação de novos brotos e no processo regenerativo, são reguladas pela metilação do DNA e modificações de histonas (NEELAKANDAN E WANG, 2011). Mutantes para uma DNA metiltransferase (*MET1*) apresentaram redução dos níveis de metilação e, conseqüentemente, maior expressão do gene *WUS*, resultando em uma precocidade na formação de novos brotos em relação ao tipo selvagem

(LI *et al.*, 2011).

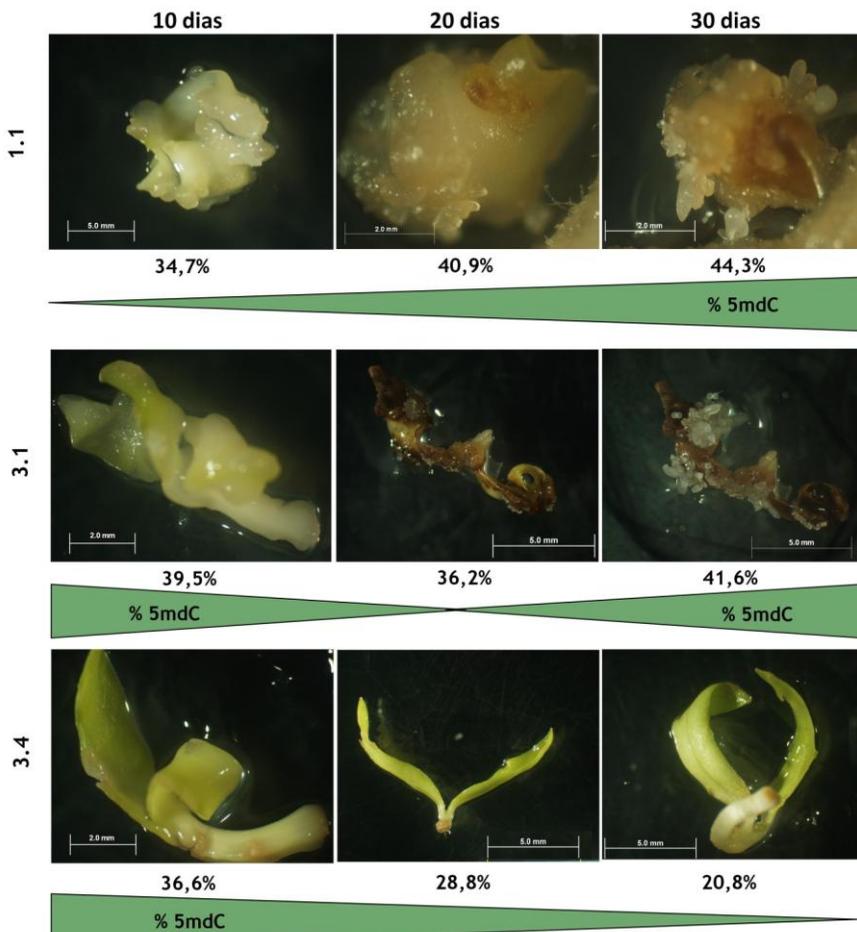
A metilação do DNA também tem um papel importante na estabilidade genética, já que regula a atividade de transposons e outros elementos do tipo. Estes elementos são caracterizados por apresentar ilhas CpNpG durante toda a sua sequência, e quando demetilados, podem “saltar” por todo o genoma e interromper sequências de genes, tornando-os silenciados e podendo causar variabilidade fenotípica. Tem sido demonstrado que elementos de transposição no milho submetidos a ciclos de atividade seguidos por inatividade se correlacionam com mudanças na metilação da citosina (VALLEDOR *et al.*, 2007).

RABINOWICZ *et al.* (2003) mostraram que os transposons são metilados em condições normais, mas que uma diminuição na metilação global, sob condições de cultura de tecidos, estaria intimamente relacionado com a expressão desses elementos de transposição, controlada pelo grau de metilação de suas sequências.

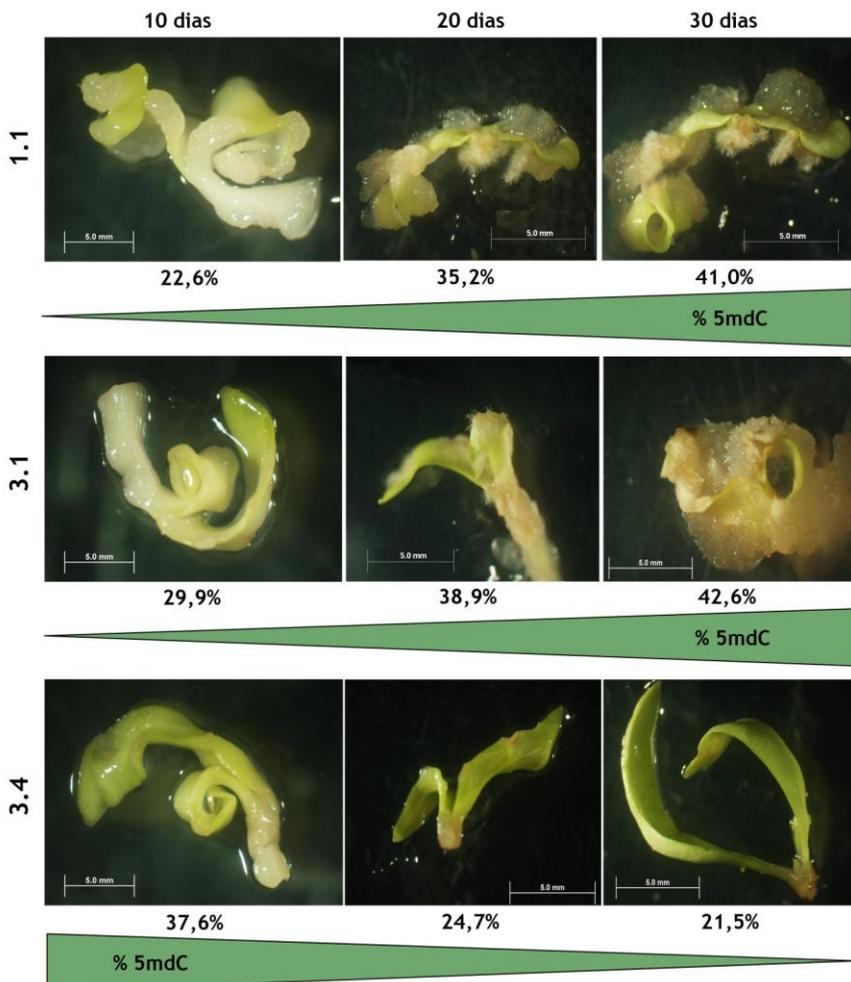


**Figura 4.** Porcentagem de metilação (5mdC) quantificada por HPLC/MS/MS entre os diferentes tratamentos testados para indução da ES do acesso 85 em *Acca sellowiana* em diferentes tempos de cultivo (10, 20 e 30 dias). Letras maiúsculas representam diferenças entre os tempos de avaliação em cada tratamento e letras minúsculas nos tempos de cultivo entre os tratamentos, segundo o teste SNK ( $p < 0,05$ ). Tratamento 1.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100  $\mu$ M de AzaC/50  $\mu$ M AzaC.

Um esquema representativo dos resultados obtidos no presente trabalho é apresentado nas figuras 5 e 6, nas quais é possível observar resumidamente os principais eventos envolvendo a dinâmica da metilação global nos tratamentos analisados. Fundamentalmente, pode ser observado um aumento nos níveis de metilação nos tratamentos em que houve formação de embriões somáticos, exceto no tratamento com pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC do acesso 101X458, onde foi observada uma queda sutil dos 10 para os 20 dias, seguido de um aumento aos 30 dias. O tratamento com pulso AzaC 100 uM/AzaC 50 uM apresentou o mesmo padrão em ambos os acessos, com quedas graduais ao longo dos dias de cultivo.



**Figura 5.** Resumo esquemático das alterações nos padrões de metilação analisados por HPLC/MS/MS observados para o acesso 101X458 de *A. sellowiana* durante a indução a embriogênese somática em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4. Tratamento 1.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/0  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200  $\mu$ M 2,4-D/50  $\mu$ M AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100  $\mu$ M de AzaC/50  $\mu$ M AzaC.



**Figura 6.** Resumo esquemático das alterações nos padrões de metilação analisados por HPLC/MS/MS observados para o acesso 85 de *A. sellowiana* durante a indução a embriogênese somática em resposta aos tratamentos 1.1, 3.1 e 3.4. Tratamento 1.1: Pulso 200 uM 2,4-D/0 uM AzaC; Tratamento 3.1: Pulso 200 uM 2,4-D/50 uM AzaC; Tratamento 3.4: Pulso 100 uM de AzaC/50 uM AzaC.

Em conjunto, esses resultados sugerem a existência de uma progressiva metilação do DNA juntamente com o desenvolvimento dos embriões somáticos, de um modo similar ao que foi descrito ao longo do

desenvolvimento embrionário de mamíferos (HSIEH, 2000). Se essas mudanças na metilação têm um papel na manutenção dos estádios de desenvolvimento da planta, ou refletem um *output* do mecanismo genético de silenciamento de elementos de transposição e outras sequências repetitivas, continua a ser plenamente incompreendido.

## 5.2. Métodos de detecção da metilação do DNA por HPLC

Existem duas grandes classes de métodos utilizados para a detecção da metilação do DNA no genoma de uma planta. Uma classe de métodos é voltada para detectar os níveis globais de citosinas metiladas. O HPLC é um desses métodos, onde procedimento básico é digerir o DNA genômico em nucleotídeos por nuclease P1, convertê-los em nucleosídeos através do tratamento com fosfatase alcalina e, em seguida, separar e quantificar a porcentagem das diferentes formas de citosinas (metiladas ou não metiladas). A outra classe de métodos é examinar a metilação de citosinas em sequências de genes específicos (LU *et al.*, 2006).

O procedimento para análise da metilação do DNA de plantas por HPLC foi primeiramente descrita por WAGNER E CAPESIUS (1981), que relataram os níveis de metilação observados em folhas de *Nicotiana tabacum* estudando os cinco deoxinucleosídeos. Os primeiros estudos por HPLC realizados por GEHRKE *et al.* (1984), recomendavam a utilização de nucleosídeos ao invés de nucleotídeos e bases para este tipo de análise. Esta conclusão foi baseada no fato das bases e nucleotídeos serem mais polares e, conseqüentemente, mais difíceis de separar por HPLC de fase reversa que os nucleosídeos.

Ambas técnicas utilizadas no presente trabalho se baseiam em métodos de separação cromatográficos, com a utilização do HPLC, porém utilizando dois diferentes tipos de detectores, o UV e o espectrômetro de massas. De acordo com os resultados obtidos e apresentados foi possível notar que ambas técnicas de detecção se mostraram adequadas para a quantificação dos nucleosídeos. No entanto, quando analisados os dados obtidos foi possível perceber diferenças críticas quanto a sensibilidade e precisão de detecção.

Os dados obtidos através do detector UV mostraram variações expressivas mesmo entre as replicatas técnicas, aumentando aos desvios da média e prejudicando a análise dos dados. Por outro lado, os dados obtidos pela espectrometria de massas se mostraram mais homogêneos,

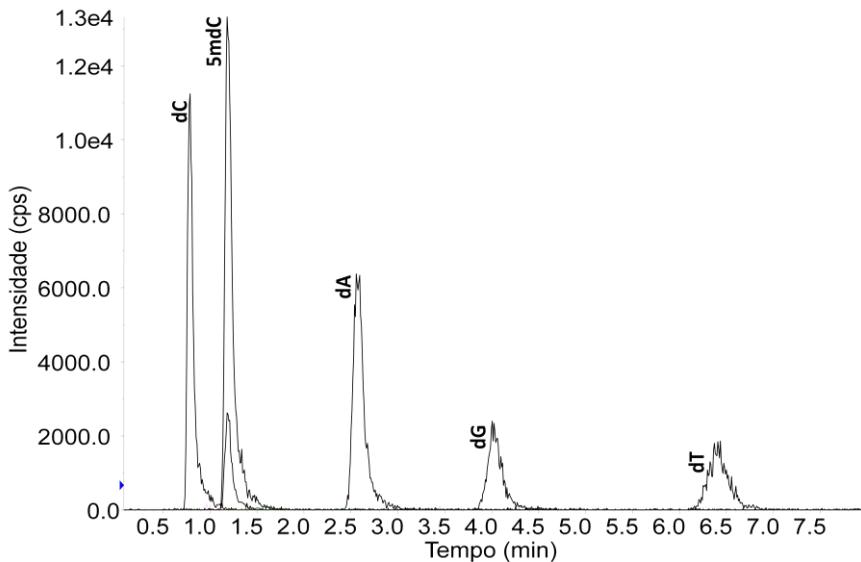
fazendo com que o erro diminuísse e permitindo uma análise mais precisa dos dados.

Além disso, uma questão levantada por JOHNSTON *et al.* (2005), que classifica como desvantajoso a quantificação por HPLC/UV o fato de poder ser superestimado os valores da deoxicidina (dC) e metildeoxicidina (5mdC) através da coeluição de citidina e metilcitina, oriundos do RNA residual, se mostra relevante. Um potencial problema na quantificação de metilação do DNA genômico é a interferência da contaminação por RNA, sendo que a maioria dos métodos baseados em cromatografia depende de um procedimento de purificação de DNA suficiente para eliminar esses interferentes (SONG *et. al.*, 2005).

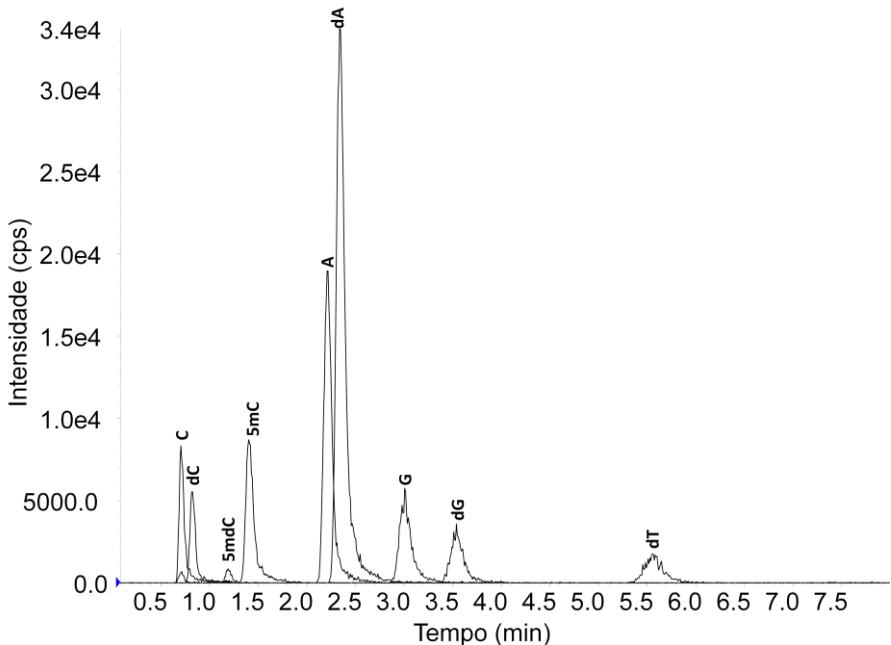
O método baseado na quantificação por HPLC/MS/MS permite uma quantificação precisa da metilação do DNA, mesmo se as amostras estiverem contaminadas por RNA ou se a hidrólise das amostras de DNA for incompleta. Isto se deve a identificação desses compostos por sua massa, reduzindo consideravelmente a possibilidade de se superestimar valores.

As figuras 7 e 8 mostram dois cromatogramas obtidos por HPLC/MS/MS. O primeiro apresenta uma corrida com os padrões externos utilizados, podendo ser notada a presença dos 5 deoxinucleosídeos analisados, e o segundo uma das amostras analisadas no presente trabalho. É possível notar, no último, a presença, além dos compostos estudados, de ribonucleosídeos (A, T, G, 5mC), que puderam ser identificados em picos diferentes também através da sua massa. Esta identificação contribuiu diretamente para uma quantificação mais exata, diminuindo consideravelmente o erro causado pela presença destes ribonucleosídeos.

Também é válido destacar a rapidez na análise quando comparada a por HPLC/UV, sendo a primeira realizada a separação dos analitos em 8 min e a segunda a separação ser realizada em 25 min. Por fim, os dados indicam que o método por HPLC/MS/MS fornece uma quantificação inequívoca do 5mdC, com alta reprodutibilidade e sensibilidade extremamente elevadas.



**Figura 7.** Cromatograma gerado por HPLC/MS/MS do padrão na concentração de 25  $\mu\text{M}$  onde se pode observar a presença dos quatro deoxinucleosídeos (dC, dA, dG e dT) e a 5-metildeoxicitidina (5mdC).



**Figura 8.** Cromatograma gerado por HPLC/MS/MS de uma das amostras da indução da embriogênese somática em *A. sellowiana* analisadas, onde se pode observar a presença dos quatro deoxinucleosídeos (dC, dA, dG e dT), os três nucleosídeos (A, C e G), a 5-metilcitidina (5mC) e a 5-metildeoxicitidina (5mdC).

Os resultados apresentados no presente capítulo mais uma vez indicam que a metilação do DNA possui papel central na embriogênese somática em *Acca sellowiana*. Foi possível observar padrões crescentes de metilação global quando analisadas aquelas culturas que apresentavam formação de embriões somáticos, das quais foram submetidas ao pulso com 2,4-D por uma hora antes da inoculação em meio de cultura, suplementado ou não com AzaC. Por outro lado, aquelas culturas mantidas na ausência de 2,4-D e em um meio de cultura suplementado com o agente hipometilante AzaC que não resultaram na formação de embriões somáticos, indicaram padrões decrescentes de metilação global, em ambos acessos estudados.

Também foi possível observar que, entre os diferentes métodos aplicados para a detecção e quantificação de 5mdC, a quantificação via MS/MS se mostrou mais precisa, com menores tempos de detecção e menor variação de valores entre as replicatas. No entanto, o método por

UV também se mostrou adequado, possibilitando a realização das análises e, de maneira geral, apresentando padrões semelhantes aos encontrados através da detecção por MS/MS.

## 6. Referências bibliográficas

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

CHAKRABARTY, D.; YU, K.W.; PAEK, K.Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). Plant Science, Vol. 165, Issue 1, P. 61-68, 2003.

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

GEHRKE, C.W.; MCCUNE, R.A.; GAMASOSA, M.A.; EHRLICH, M.; KUO, K.C. Quantitative reversed-phase high-performance liquid-chromatography of major and modified nucleosides in DNA. J. Chromatogr. 301:199–219, 1984.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; REIS, M. Somatic embryogenesis in Goiabeira-serrana: Genotype Response, Auxinic shock and synthetic seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13: 117-128, 2001.

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

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

LI, W.; LIU, H.; CHENG, Z.J.; SU, Y.H.; HAN, H.N.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.S. DNA methylation and histone modifications regulate de novo shoot regeneration in *Arabidopsis* by modulating wuschel expression and auxin signaling. Plos Genet 7:E1002243, 2011.

LU, G.; WU, X.; CHEN, B.; GAO, G.; XU, K.; LI, X. Detection of DNA methylation changes during seed germination in rapeseed (*Brassica napus*). Chinese Science Bulletin, 2:182—190, 2006.

MADLUNG, A.; MASUELLI, R.W.; WATSON, B.; REYNOLDS, S.H.; DAVISON, J.; COMAI, L. Remodeling of DNA methylation and

phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiol* 129:733–746, 2002.

NEELAKANDAN, A.K.; WANG, K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep*, DOI 10.1007/S00299-011-1202-Z, 2011.

RABINOWICZ, P.D.; PALMER, L.E.; MAY, B.P.; HEMANN, M.T.; LOWE, S.W.; MCCOMBIE, W.R.; MARTIENSSEN, R.A. Genes and transposons are differentially methylated in plants, but not in mammals. *Genome Res*, 13:2658–2664, 2003.

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

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

TOKUJI, Y.; TAKANO, S.; TONOMURA, M.; TANAKA, S.; IGARI, T.; WATANABE, T. Influence of 5'-azacitidine on promoting recovery of cell competence for shoot organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 106:289–297, 2011.

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

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

VANYUSHIN, B.F. DNA methylation in plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg CTMI 301:67–122, 2006.

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

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

WAGNER, I.; CAPESIUS, I. Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*, 654: 52-56, 1981.

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

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que a metilação do DNA influencia dramaticamente a embriogênese somática em *Acca sellowiana*. A utilização do inibidor da metilação 5-Azacitidina (AzaC) nos tratamentos testados mostrou nítidas respostas durante a morfogênese *in vitro* desta espécie, gerando informações relevantes a respeito dos mecanismos epigenéticos relacionados a esta rota morfogenética *in vitro*.

Foi possível perceber que a presença do 2,4-D associada ao AzaC, em doses específicas, contribui para a formação de embriões somáticos, comparado ao tratamento controle sem o agente hipometilante. Observou-se ainda que a presença do 2,4-D é fundamental para o início deste processo, visto que os tratamentos onde não estava presente não resultaram na formação de embriões somáticos. A resposta genótipo-dependente também deve ser ressaltada, onde um dos acessos estudados, o 85, respondeu melhor ao tratamento com AzaC, gerando as maiores médias de formação de embriões somáticos induzidos.

As análises histológicas realizadas puderam revelar padrões distintos de histomorfogênese. A análise em diferentes tempos de cultivo mostrou uma rápida mudança de padrão naqueles tratamentos que induziram a ES, indicando inúmeras regiões com rápida divisão celular. A formação dos embriões somáticos na superfície dos cotilédones pode corroborar com resultados obtidos anteriormente para esta espécie, mostrando, no entanto, níveis diferentes de formação de embriões. O tratamento sem a presença de 2,4-D mostrou um padrão bastante distinto, fundamentalmente mantendo-se diferenciado e não apresentando competência celular para se desdiferenciar e iniciar o processo de ES.

Os resultados encontrados na etapa de conversão mostraram que apesar de influenciar positivamente a indução da ES, o AzaC exerce um efeito desregulatório na etapa de formação das plantas autotróficas, resultando em porcentagens de conversão significativamente menores que o tratamento controle. Este fato também nos leva a crer que os padrões de metilação dos embriões e futuras plântulas somáticas possuem uma regulação fina do mecanismo epigenético que o envolve, mostrando respostas antagônicas para eventos subsequentes na morfogênese.

A plasticidade da metilação do DNA é um dos principais

fatores envolvidos no desenvolvimento das plantas e suas respostas durante o cultivo *in vitro*. A demetilação normalmente precede o início de novos programas de diferenciação, tais como a embriogênese. A metilação aumenta com a idade, mudança de fase, ou tempo de cultivo, sendo estável, mas não estática, servindo como uma das bases da plasticidade celular.

De fato, os resultados encontrados nas análises da metilação do DNA global indicam essa dinâmica. Foi possível perceber que o 2,4-D exerce forte influência no aumento dos níveis de metilação, visto que nos tratamentos em que ele estava presente o níveis em geral aumentavam. Essa atividade hipermetilante acabou por muitas vezes anulando ou enfraquecendo os efeitos do AzaC, que mostrou seu potencial hipometilante nos tratamentos em que o 2,4-D não estava presente.

O que pode ser percebido é que apesar de apresentar respostas morfogênicas muitas vezes distintas, ambos acessos apresentaram comportamento semelhante quanto aos padrões de metilação, salvo algumas exceções.

Por fim, com relação aos métodos de detecção da 5mdC no presente trabalho, pode ser observado que apesar de se apresentar adequado para tal análise, o HPLC/UV indicou resultados mais variáveis comparado ao HPLC/MS/MS. Além disso, a espectrometria de massas permitiu uma análise rápida e inequívoca do 5mdC, mostrando ser uma técnica bastante robusta e indicada para quantificação da metilação do DNA global.

Os dados gerados apontam algumas direções, no entanto, experimentos envolvendo outros compostos suplementados ao meio de cultura, como os chamados inibidores de metiltransferases, que também se relacionam diretamente ao processo de metilação/demetilação em plantas, podem ser considerados. Além disso, análises utilizando enzimas de restrição sensíveis a sítios ricos em citosina metilada gerariam respostas interessantes quanto as sequências específicas, podendo ser estudados genes que sabidamente atuam no processo de ES em plantas. As análises por MSAP (“*methylation sensitive amplified polymorphism*”) permitiriam estudos mais específicos, sendo uma técnica bastante empregada, assim como a detecção por métodos cromatográficos, para o estudo dos níveis de metilação do DNA.

Análises utilizando anticorpos específicos a 5mdC também tem sido relatados. Esses tipos de análises figuram como uma avaliação

complementar e mais visual dos eventos envolvendo a metilação durante o desenvolvimento embrionário, gerando respostas interessantes quanto às modificações morfológicas associadas às modificações epigenéticas.