



**FERNANDA FERREIRA SALGADO**

**ANÁLISE DA METILAÇÃO NO DNA E ACÚMULO DE  
AUXINA DURANTE A INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE  
SOMÁTICA EM *Eucalyptus grandis***

**LAVRAS - MG**

**2019**

**FERNANDA FERREIRA SALGADO**

**ANÁLISE DA METILAÇÃO NO DNA E ACÚMULO DE AUXINA DURANTE A  
INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. LUCIANO VILELA PAIVA

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Salgado, Fernanda Ferreira.

Análise da Metilação no DNA e Acúmulo de Auxina Durante a  
Indução da Embriogênese Somática em *Eucalyptus grandis* /

Fernanda Ferreira Salgado. - 2019.

66 p.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Embriogênese somática. 2. Epigenética. 3. Hipometilação do  
DNA. I. Paiva, Luciano Vilela. II. Título.



**FERNANDA FERREIRA SALGADO**

**ANÁLISE DA METILAÇÃO NO DNA E ACÚMULO DE AUXINA DURANTE A  
INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Eucalyptus grandis*  
ANALYSIS OF METILATION IN DNA AND AUXINE ACUMULUS DURING THE  
INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2019

Dr. Thiago Alves Magalhães

Dr. Raphael Ricon de Oliveira

Prof. Dr. LUCIANO VILELA PAIVA

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2019**

## AGRADECIMENTOS

Sempre que cumprimos nossos objetivos merecemos ser aplaudidos, mas nunca podemos esquecer de dar louvor a quem nos deu a oportunidade de vencermos. Por isso, hoje quero te agradecer muito, meu Deus, por ter conseguido alcançar a meta que tanto sonhei. A ti, Senhor, dedico essa etapa da minha vida, confiando que continuarás a conduzir meus passos em direção à tua vontade perfeita e soberana.

Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o ser humano jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém se faz sozinho: sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor.

Agradeço o apoio e o amparo dos meus pais, Carlos Magno e Deniara, sem vocês jamais estaria aqui, em busca dos meus sonhos e acreditando que todo sofrimento no fim valera a pena. Como minha mãe sempre disse, você está aí para isso. Amo vocês!

Agradeço a minha irmã, Amália, que mesmo tão longe se tornou mais presente em minha vida, do que quando estávamos perto. Agradeço a cada momento de preocupação, cada palavra de carinho e preocupação em me ajudar e amparar. Te amo, mala!

Agradeço a todos os meus amigos, que se tornaram minha família. Obrigada em especial a Dri por aturar minhas neuras, ciúmes e mania de limpeza, obrigada por ser minha companhia nos momentos de desespero. Obrigada a Samira e o Bruno, nosso trio, que sempre nos amparamos uns aos outros. Obrigada a Tati, minha consultora financeira, amiga que sempre me socorre quando estou quase perdendo a cabeça, e por fim, mas não menos importante a minha amiga Thais Martins, irmã que Deus me deu, que mesmo distante sempre esteve presente em minha vida.

Agradeço a família LCBM, que sempre que precisei, estavam dispostos a me ajudar. Obrigado pelas companhias, aviso do nosso colega de trabalho otimista, que sempre me falou que tudo dará errado. Mas no final, tudo dará certo. Obrigado por cada momento e ensinamento que esses dois anos me proporcionou ao lado de vocês!

Obrigada aos pós-doc Rafaeli e Wesley, por todo o suporte e ensinamento durante minha pesquisa. Por sempre estar disponível e disposta a me ajudar.

Obrigada aos técnicos Fabrício e Ricardo que suportaram os meus surtos com o HPLC, e a secretária Rossilvania que sempre foi muito mais que isso para mim, minha conselheira, minha mãe adotada.

Obrigada ao Luciano Paiva, que me deu essa oportunidade de aprendizagem, que acreditou em mim. Obrigada pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos e pelos ensinamentos.

Obrigada ao setor de microscopia eletrônica, ao Prof. Eduardo e ao Silvino, por me ceder e auxiliar as minhas análises.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todosque, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

**OBRIGADA!**

“I was taught that the way of progress was  
neither swift nor easy. “(Marie Cure)

## RESUMO

A embriogênese somática (ES) é um processo de grande importância para a micropropagação clonal *in vitro*, apresentando benefícios quando aplicada a espécies arbóreas, como alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação, obtenção de planta geneticamente igual à planta-mãe e possibilidade de transferência de genes. Especialmente para a espécie *Eucalyptus*, visto ser recalcitrante a regeneração por meio de embriões somáticos. Vem sendo proposto que, durante a ES, a desdiferenciação das células alvo e a aquisição da competência embriogênica podem ser moduladas pela metilação do DNA e por fitohormônios, como o picloram. O presente trabalho teve como objetivo (1) analisar o efeito do inibidor da metilação do DNA 5-Azacitidina (5-AzaC) na indução de calogênese em *Eucalyptus grandis*, testando diferentes concentrações do agente desmetilante e (2) identificar marcadores precoces do processo de ES, através do acúmulo de auxina e de metilação do DNA nas células, testando diferentes concentrações da auxina picloram. Para a realização dos experimentos, foram utilizados hipocótilos, aos 20 dias de germinação. Os resultados mostraram que a concentração de 0,5 µM do agente desmetilante 5-AzaC foi mais eficiente em promover a hipometilação do DNA global dos calos sem causar toxicidade celular aos explantes, promovendo uma redução de 76,5% dos níveis de metilação após 60 dias de exposição a 5-AzaC. A concentração de 40 µM de picloram foi mais eficiente na indução de calos embriogênicos, com 19,80% de formação de calos friáveis aos 60 dias, sendo possível visualizar, aos 180 dias, os primeiros agrupamentos de divisões celulares, dando origem aos proembriões. Os resultados revelaram que o acúmulo de auxina e a hipermetilação do DNA foram induzidos durante o início da ES e diferencialmente encontrados em células embriogênicas dos calos, enquanto não estiveram presentes em células não embriogênicas após o início da indução a ES. Pressupõe que esses fatores representam processos que podem ser interligados e estar envolvidos na regulação da reprogramação celular.

**Palavras-chave:** 5-Azacitidina. Metilação do DNA. Toxicidade.

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis (SE) is a process of great importance for clonal micropropagation in vitro, presenting benefits when applied to tree species, especially for the *Eucalyptus* species, since its regeneration by somatic embryos is recalcitrant. It has been proposed that during SE, de-differentiation of target cells and acquisition of embryogenic competence can be modulated by DNA methylation and by phytohormones, such as picloram. The objectives of this study was (1) to analyze the effect of the 5-Azacytidine (5-AzaC) DNA methylation inhibitor on the induction of calogenesis in *Eucalyptus grandis* by testing different concentrations of the demethylating agent, and (2) to identify early process markers of SE, through the accumulation of auxin and DNA methylation in the cells, testing different concentrations of auxin picloram. For the experiments, hypocotyls were used after 20 days of germination. The results showed that the concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  of the 5-AzaC demethylating agent was more efficient in promoting hypomethylation of the overall DNA of the calli without causing cellular toxicity to the explants, promoting a reduction of 76.5% in methylation levels after 60 days of exposure to 5-AzaC. The concentration of 40  $\mu\text{M}$  picloram was more efficient in the induction of embryogenic callus, with 19.80% of friable callus formation at 60 days, and it was possible to visualize, at 180 days, the first groupings of cell divisions, giving rise to the proembryos. The results revealed that auxin accumulation and DNA hypermethylation were induced during the early stages of SE, differently found in embryogenic cells of the callus, whereas they were not present in non-embryogenic cells after the onset of SE induction. It assumes that these factors represent processes that can be interconnected and involved in the regulation of cellular reprogramming.

**Keywords:** 5-Azacytidine. Methylation of DNA. Toxicity

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2. REFERÊNCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Informações Gerais sobre o Eucalipto .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Embriogênese Somática.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Mecanismos epigenéticos .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5 Métodos para determinação da metilação do DNA .....</b>	<b>14</b>
<b>SEGUNDA PARTE .....</b>	<b>20</b>
<b>ARTIGO 1: 5-AZACITIDINA INDUZ A HIPOMETILAÇÃO NO DNA EM <i>Eucalyptus grandis</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>ARTIGO 2: O INÍCIO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA ENVOLVE ACÚMULO DE AUXINAS E HIPERMETILAÇÃO DO DNA EM <i>Eucalyptus grandis</i>. .....</b>	<b>36</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **Introdução Geral**

## 1. INTRODUÇÃO

O eucalipto é uma espécie nativa da Austrália e regiões de Nova Guiné, Indonésia e Filipinas, altamente diversificado e comercialmente importante, e sua utilização vai desde como fonte de madeira industrial, combustível, óleos essenciais e, principalmente, matéria-prima para a produção de celulose e papel. Os plantios de eucalipto ocupam 5,7 milhões de hectares da área de árvores plantadas no Brasil, ocupando o segundo lugar como maior fonte de celulose no mundo, com uma produção de 18,8 milhões de toneladas, estando atrás somente dos Estados Unidos (NAKHOODA; MANDIRI, 2016; IBÁ, 2017).

A aplicação da biotecnologia tornou-se de extrema importância para a indústria florestal, proporcionando o aumento da produtividade e da qualidade dos produtos. As técnicas biotecnológicas como o uso de marcadores moleculares, aplicação de cultura de tecidos para micropropagação e engenharia genética têm sido empregadas para o desenvolvimento do eucalipto, entretanto uma das dificuldades está na ausência de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* a partir de embriões somáticos (CORREDOIRA et al., 2015; OUYANG et al., 2012).

A regeneração de plantas via embriogênese somática é um método muito utilizado em várias espécies, devido a possibilidade de investigar os mecanismos reguladores da formação de embriões zigóticos a partir de tecidos somáticos, além de ser um sistema que apresenta altos níveis de regeneração *in vitro* (PINTO et al., 2013). Contudo, algumas espécies arbóreas, como por exemplo o eucalipto, apresentam recalcitrância à embriogênese somática, levando à baixa eficiência de regeneração e tornando a sua aplicação limitada (CORREDOIRA et al., 2017; PINTO et al., 2013).

A embriogênese somática em plantas é resultante de mudanças fisiológicas, bioquímicas e genéticas em células assexuadas em resposta a uma série de fatores, entre eles o estresse hormonal. Condições estressantes, como altas concentrações de hormônios, são capazes de induzir a embriogênese somática pela reorganização da cromatina que libera regiões gênicas responsáveis pela indução da embriogênese somática (JIN et al., 2014; KRISHNAN; SIRIL, 2017).

Os mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, modificação das histonas e desmetilação de DNA realizam um papel importante nas mudanças

morfológicas e fisiológicas celulares, alterando a regulação da expressão gênica e contribuindo para a plasticidade fenotípica e a capacidade adaptativa das espécies arbóreas florestais (JIN et al., 2014). Estudos mostram evidências de que os mecanismos epigenéticos são fundamentais para a resposta ao estresse e à adaptação das plantas (AVRAMOVA, 2015).

Apesar dos avanços na compreensão do processo de embriogênese somática, os mecanismos epigenéticos que ocorrem durante este processo não estão completamente elucidados, mas é sabido que estas modificações ocorrem extensivamente durante a diferenciação e desenvolvimento celular (NIC-CAN et al., 2013).

Durante o processo de embriogênese somática, em algumas espécies como a *Daucus carota* (LOSCHIAVO et al., 1989) e a *Cucurbita pepo* (LELJAK-LEVANIĆ et al., 2016), ocorre um aumento nos níveis de metilação no DNA, enquanto que em outras espécies como *Pinus nigra* (NOCEDA et al., 2009) e *Rosa x hybrid* (XU; LI; KORBAN, 2004) o mesmo processo causa uma diminuição dos níveis de metilação, sendo possível observar que a quantificação da metilação do DNA é consideravelmente variável (NIC-CAN et al., 2015).

Existem substâncias, como a pirimidina 5-azacitidina (azaC) e a 5-aza-2' desoxycitidina (decitabina), que são capazes de inibir a metilação do DNA. Estas enzimas são análogas das citosinas e se incorporam no DNA evitando a ligação do grupo metil no mesmo, o que causa a hipometilação do genoma. Trabalhos na literatura demonstraram que a diminuição dos níveis de metilação pelo tratamento com 5-AzaC favoreceram a formação de calos embriogênicos em algumas espécies, como *Quercus alba* (CORREDOIRA et al., 2017).

Além das modificações epigenéticas que ocorrem durante o processo de embriogênese somática, foram observados os efeitos estimulantes de reguladores exógenos de crescimento de plantas, como as auxinas, durante a indução de ES. Entretanto são escassos os estudos sobre os níveis endógenos da auxina AIA (ácido indol-3-acético) nos estágios iniciais da embriogênese (CORREDOIRA et al., 2015).

A auxina ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina endógena que está presente no tecido vegetal em maior quantidade, podendo ser sintetizada em baixos níveis por quase todos os tecidos, e em maior quantidade pelos ápices meristemáticos, células jovens, sementes e tecidos em desenvolvimento. A sua biossíntese ocorre em tecidos com rápido crescimento e desenvolvimento celular (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O AIA apresenta grande importância na regulação do desenvolvimento da planta, onde controla processos celulares tão importantes quanto a divisão celular, expansão e diferenciação (GRONES; FRIML, 2015).

A utilização de anticorpos anti-AIA vem apresentando eficiência para a análise do acúmulo celular de auxina durante o processo de desenvolvimento embrionário (CORREDOIRA et al., 2015; RODRÍGUEZ-SANZ et al., 2015). Um estudo realizado em *Quercus alba* mostrou que durante o processo de embriogênese somática ocorre o acúmulo de auxina e desmetilação do DNA, constituindo-se marcadores iniciais do processo (CORREDOIRA et al., 2017).

Devido a inexistência de estudos relacionando os níveis de metilação durante o processo de embriogênese somática em espécies de eucalipto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento dos calos da espécie *Eucalyptus grandis* durante o processo de embriogênese somática, analisando a influência dos níveis de metilação e auxina endógena nos estágios iniciais da embriogênese com auxílio do agente inibidor da metilação (5-AzaC) e análise de imunolocalização.

## 2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2.1 Informações Gerais sobre o Eucalipto

O *Eucalyptus* é um gênero pertencente à família Myrtaceae, cuja as espécies são conhecidas pelo nome de eucalipto. Este gênero possui mais de 800 espécies nativas da Austrália, Tasmânia e ilhas próximas. Nos anos de 1800, os eucaliptos foram inseridos no sul da Europa e no norte da África, desde então tem ocorrido um aumento crescente da sua importância econômica. Atualmente, encontram-se plantações de eucaliptos em regiões tropicais e subtropicais em mais de 90 países, sendo que os responsáveis pelas maiores plantações são o Brasil, a Índia e a China (COCHRANE; COCHRANE, 2017; CORREDOIRA et al., 2015).

O eucalipto apresenta alto valor comercial para produção de madeira industrial, combustível, óleos essenciais, celulose e papel. As espécies do gênero que predominam nas plantações comerciais são *Eucalyptus grandis* Hill, *E. globulus* Labill., *E. camaldulensis* dehn, *E. urophylla* Blake e seus híbridos (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008; POTTS; DUNGEY, 2004). O híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* é altamente valorizado devido a produção de madeiras superiores, apresentar eficiência de enraizamento e resistência a doenças, fornecendo matéria prima de alta qualidade para celulose, papel, madeira e energia (OUYANG et al., 2012; PRAKASH; GURUMURTHI, 2010).

No ano de 2016 houve um crescimento de 0,5% da área total de árvores plantadas no Brasil em comparação com o ano anterior, totalizando 7,84 milhões de hectares. Esse aumento deve-se exclusivamente a expansão da produção de eucalipto que alcançou 5,7 milhões de hectares plantadas, as quais estão localizadas principalmente nos estados de Minas Gerais (24%), São Paulo (17%) e Mato Grosso do Sul (15%) (IBÁ, 2017).

O Brasil ocupa o segundo lugar como maior produtor de celulose no mundo, estando atrás somente dos Estados Unidos. Sua produção em 2016 foi de 18,8 milhões de toneladas, sendo que 16,2 milhões de toneladas de celulose foram obtidas a partir do eucalipto. O clima favorável no Brasil é um importante componente do alto rendimento florestal, sendo que uma árvore de eucalipto adequada para o corte leva, em média, 7 anos, enquanto no Chile, por exemplo, ela só estará pronta para corte

aos 18 anos (IBÁ, 2017; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2015).

O aumento da produtividade das florestas de eucalipto e a qualidade dos produtos obtidos a partir do emprego das tecnologias transgênicas estão tornando-se cada vez mais importante para a indústria florestal. Diante disso o seu cultivo *in vitro* passa a representar uma etapa essencial para propagação clonal, principalmente quando se leva em conta a utilização de genótipos elite nos programas de melhoramento genético (PINTO et al., 2013). Algumas espécies já foram regeneradas via organogênese, porém ocorre uma baixa formação de raízes além da formação de plantas quimeras durante a regeneração de tecidos transformados (OUYANG et al., 2012).

## **2.2 Embriogênese Somática**

A embriogênese somática *in vitro* (ES) é uma das rotas de expressão genética pela qual células isoladas ou um pequeno grupo de células somáticas dão origem a embriões (TAUTORUS et al., 1991). Neste processo, células somáticas diferenciadas podem recuperar o potencial embriogênico e originar novos embriões viáveis, através da reprogramação da expressão gênica (MARSONI et al., 2008).

A embriogênese somática é um processo de grande importância para a regeneração *in vitro*, apresentando benefícios significativos quando utilizada em espécies arbóreas. Este processo é identificado quando células haplóides ou somáticas desenvolvem-se, por meio de diferentes estágios embriogênicos, dando origem a uma planta sem que ocorra a união de gametas. É um procedimento comumente utilizado em protocolos de transformação, pois apresenta a vantagem de uma única origem celular, reduzindo a formação de quimeras (CORREDOIRA et al., 2015; PINTO et al., 2013).

A competência embriogênica pode ser adquirida após a mudança de uma ou mais condições de cultivo, como fitohormônios, meio de cultura, fonte de carboidrato, potencial osmótico, dentre outras. Após essas mudanças, células ou tecidos induzidos alcançam a segunda fase, 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, como as auxinas e as citocininas, que foram postuladas como as duas classes hormonais que agem conjuntamente, controlando o desenvolvimento vegetal e atuando diretamente na definição dos meristemas e, portanto, no tipo de órgão a ser formado (GUERRA;TORRES; TEIXEIRA, 1999; SKOOG; MILLER, 1957).

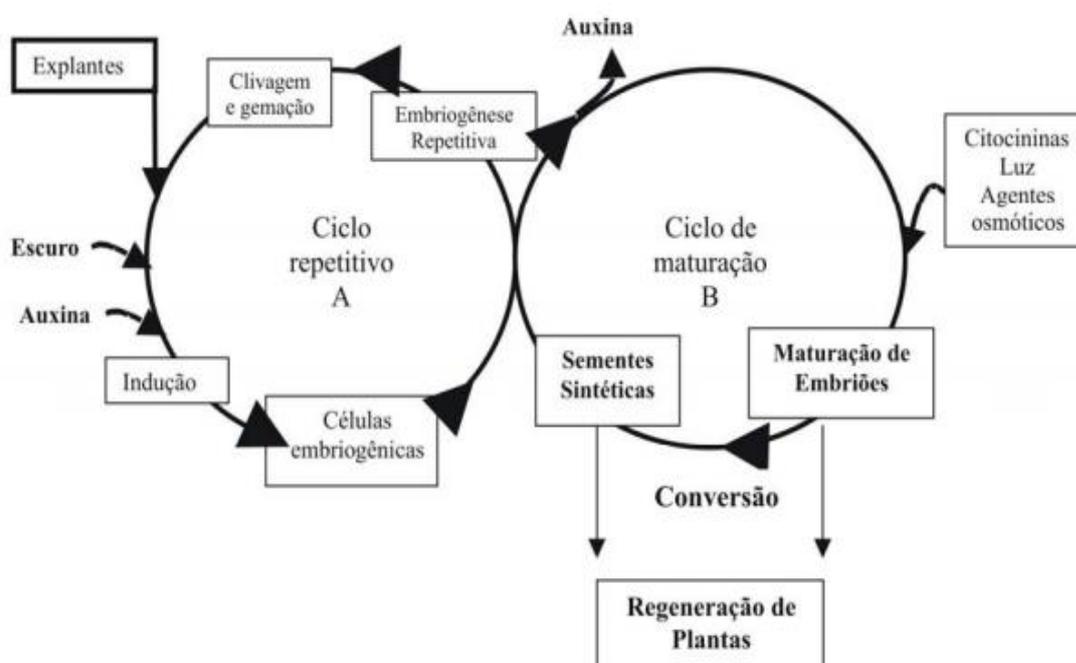
A metodologia básica para o desenvolvimento de embriogênese somática em angiospermas consiste em dois ciclos repetitivos. No primeiro, de embriogênese repetitiva, culturas embriogênicas são induzidas em meios de cultura geralmente suplementados com auxinas, sendo que a mais utilizada é o ácido 2,4 diclorofenóxiacético (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). O segundo ciclo consiste na fase de maturação, em que 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) e citocininas, sendo que nesta fase os materiais vegetais são mantidos sob influência da luz, dependendo da espécie. Ao fim deste ciclo, os embriões somáticos maduros podem ser convertidos em plantas em condições *in vitro* e *ex vitro*, podendo ser utilizados para a obtenção de sementes sintéticas (STEINER et al., 2008) (Figura 1).

A propagação do eucalipto via embriogênese somática visa superar alguns déficits encontrados ao se utilizar técnicas como estaquia e organogênese. Os embriões somáticos são produzidos a partir de tecidos somáticos do material de origem, sendo associada a altas taxas de propagação de plântulas, permitindo a produção de clones utilizados para tecnologias de transferência de genes, além de ser passível como fonte de explante para a criopreservação (NAKHOODA; MANDIRI, 2016; PINTO et al., 2013).

A obtenção de embriões somáticos já foi alcançada nas espécies *E. grandis*, *E. citriodora hook*, *E. gunnii hook*, *E. dunnii maiden*, *E. nitens*, *E. tereticornis Smith*, *E. camaldulensis* e *E. globulus*(CORREDOIRA et al., 2015; PINTO et al., 2008). No entanto, estudos mostram que é necessário a avaliação cuidadosa dos explantes por exame microscópico, pois além de apresentar baixa taxa de regeneração, alguns protocolos, quando analisados por exame microscópico, mostraram vias de regeneração organogênicas, em vez de embriogênicas, possibilitando a formação de

plantas quiméricas (DOBROWOLSKA et al., 2017; OUYANG et al., 2012; PRAKASH; GURUMURTHI, 2010).

**Figura 1:** Processo esquemático de dois ciclos para indução e modulação da embriogênese somática.



Fonte: Adaptado de Guerra et al (1999).

Na maioria dos estudos que apresentaram resultados satisfatórios quanto a regeneração de plantas a partir de embriões somáticos, as culturas foram obtidas a partir de embriões zigóticos imaturos ou maduros, mas também de mudas jovens. Porém, não há relato sobre a indução de embriões somáticos a partir de plantas em fase adulta (CORREDOIRA et al., 2015).

As diferentes respostas entre as espécies e progênies sugerem a existência de fatores genéticos que controlam os processos de desenvolvimento *in vitro*. É também de grande importância os nutrientes básicos, como sais e minerais, que participam da regulação morfológica, e os reguladores de crescimento que determinam o potencial de regeneração (DAVID; BRAVO; VENCOSKY, 2008).

### 2.3 Mecanismos epigenéticos

Epigenética é o estudo de mudanças mitogenéticas e / ou hereditárias na função do gene que não podem ser explicadas por mudanças na sequência do DNA” (Russo et al. 1996). Os fenômenos epigenéticos são medidos por marcas reversíveis que incluem a metilação do DNA, rearranjos de cromatina, modificação nas histonas e por pequenos RNAs que podem alterar a regulação da expressão de genes ou regiões genômicas (AVRAMOVA, 2015; BONASIO; TU; REINBERG, 2010).

Condições ambientais estão diretamente relacionadas às várias marcas e mecanismos epigenéticos diferentes, incluindo a metilação do DNA, sendo que mudanças nos níveis de metilação do DNA genômico em resposta a diferentes tipos de estresse biótico (patógeno, herbívoros) e abiótico (alto teor de sal e baixas concentrações nutrientes) já foram observados em algumas espécies como *Taraxacum officinale*, *A. thaliana* e *Antirrhinum* (BRÄUTIGAM et al., 2013).

A metilação do DNA em plantas comumente ocorre nas citosinas (CG, CNG e CNN onde N = A, T ou C), através da adição de um grupo metil na posição 5' do anel de pirimidina da citosina no DNA (5mC) (HENDERSON; JACOBSEN, 2007). Sendo catalisada por DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2), um homólogo das Dnmt3 metiltransferases e mantida por três diferentes vias: metilação por CG pela DNA METILTRANSFERASE 1 (MET1), o homólogo vegetal de Dnmt1, metilação de CHG pela CROMOMETHYLASE (CMT3), uma DNA metiltransferase específica de planta e metilação de CHH assimétrica através de metilação persistente *de novo* por DRM2 (LAW; JACOBSEN, 2010).

Os mecanismos epigenéticos possuem uma importante função de modificação do desenvolvimento morfológico e fisiológico de um organismo, sofrem influência de fatores ambientais, resultando em mudanças na expressão gênica e na formação do fenótipo. A compreensão dos mecanismos regulatórios envolvidos nas respostas epigenéticas auxilia na identificação da melhor via para a multiplicação *in vitro* de plantas, especialmente as espécies arbóreas florestais de vida longa e recalcitrantes (BRÄUTIGAM et al., 2013).

Marcas epigenéticas estão envolvidas na regulação de programas globais de expressão gênica no genoma (FINNEGAN et al., 2000). A metilação do DNA, por DNA

metiltransferases, consiste em uma modificação epigenética proeminente da fibra da cromatina, que está relacionada ao silenciamento gênico. Essa marca epigenética muda durante os processos de diferenciação e proliferação das células vegetais e regula a expressão gênica (MEIJÓN et al., 2010). Estudos mostraram que modificações na metilação global do DNA conduzem a mudanças no programa de desenvolvimento do micrósporo em direção à embriogênese, indicando uma reprogramação epigenética após a indução do micrósporo para um estado totipotente e início da embriogênese (SOLÍS et al., 2012). Essa reprogramação epigenética envolveu uma redução do nível global da metilação do DNA com a ativação da proliferação celular seguida do aumento da metilação do DNA com diferenciação embrionária, em espécies vegetais muito diferentes, como *Brassica napus* (TESTILLANO et al., 2013), *Hordeum vulgare* (EL-TANTAWY et al., 2014) e *Quercus suber* (RODRIGUEZ-SANZ et al., 2014).

Em plantas um dos mecanismos de regulação epigenética mais estudado é a metilação do DNA, sendo relacionado com atividade na floração, desenvolvimento de endospermas, resposta ao estresse, manutenção do genoma, silenciamento de genes, controle de elementos transponíveis e impressão genômica, o que contribuiu para entender processos regulatórios importantes (NIC-CAN et al., 2013).

O estresse é uma das razões que levam a uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e genéticas em células assexuadas, e estas condições estressantes podem induzir a embriogênese somática pela reorganização da cromatina e alteração da metilação do DNA, que leva à liberação "acidental" do programa embriogênico (KRISHNAN; SIRIL, 2017).

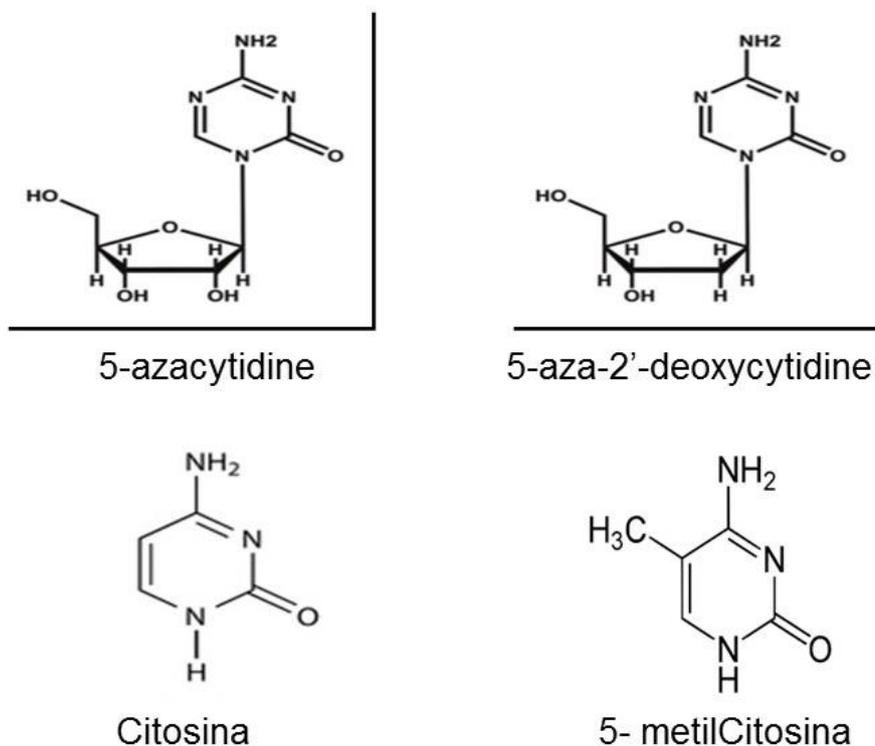
Para obtenção de células embriogênicas em espécies como *Daucus carota* e *Cucurbita pepo* aumento dos níveis de metilação global do DNA, enquanto que em outras espécies como *Eleuterococcus senticosus* e *Castanea sativa* uma diminuição dos níveis de metilação global é observada para que ocorra a formação de calos embriogênicos e posterior desenvolvimento dos embriões somáticos (NIC-CAN et al., 2013, 2015).

## 2.4 Inibidores da metilação

Existem algumas enzimas que podem alterar um conjunto de compostos que interferem em diferentes etapas do processo de metilação, diminuindo a dose e o tempo de ação da metiltransferase. A pirimidina 5-azacitidina (azaC) e a 5-aza-2' desoxycitidina (decitabina) são análogos da citosina que, em vez do átomo de carbono na posição 5', possuem um átomo de nitrogênio (Figura 2). Estes compostos podem ser incorporados durante a replicação do DNA, evitando que ocorra a metilação e resultando na hipometilação geral do genoma (NIC-CAN et al., 2015;FRAGA et al., 2012). O agente de desmetilação azaC leva a uma diminuição dos níveis de metilação a cada ciclo de replicação celular, e dependendo do tempo da atividade da metiltransferase do DNA, ocorre a formação de DNA hipometilado. A habilidade de um explante para reestabelecer seu programa genético e epigenético para suportar um ambiente hormonal artificial determina sua capacidade para cultivo in vitro, sendo que reduções dos níveis de metilação estão sempre associados ao início de qualquer programa de diferenciação, como a embriogênese.

Além desses compostos, a 2-amino5-etoxi-carbonil-pirimidina-4(3H)-one é um análogo de pirimidina que também é utilizado na inibição da metilação do DNA e por fim o ácido etionino (ácido 2-amino-4-etilsulfanilbutírico) que é utilizado pelas células para produzir S-adenosil-L-metionina, que funciona como um inibidor competitivo da metilação do DNA (Figura 2) (NIC-CAN et al., 2015).

**Figura 2:** Estruturas de alguns inibidores da metilação do DNA e da citosina metilada



Fonte: Adaptado de DE-LA-PEÑA et al., (2015)

O mecanismo de ação proposto por análogos de pirimidina pode ocorrer através de uma ligação covalente entre um sítio nucleófilo catalítico das metiltransferases, onde a posição reativa 6 da azaC substitui a citosina no DNA. A substituição do carbono pelo nitrogênio na posição 5' altera a reatividade do carbono na posição 6, evitando a reversibilidade da ligação entre o carbono e a citosina no local ativo da enzima (NIC-CAN et al., 2015).

## 2.5 Métodos para determinação da metilação do DNA

Uma ampla variedade de métodos precisos e eficientes foram desenvolvidos para estudar os padrões epigenéticos e suas modificações. Esses métodos determinam o conteúdo de metilação do DNA genômico e os locais específicos de metilação e podem ajudar a explicar o seu papel em processos biológicos, como a embriogênese somática. Os métodos podem ser divididos em pelo menos seis grupos gerais: metilação do DNA global, metilação regional do DNA, análise do genoma em toda a largura, análise de metilação de DNA por sequenciamento, detecção de

padrões específicos de metilação, análise CpG individual e análise da metilação *in situ* utilizando imunolocalização (BRÄUTIGAM et al., 2013; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2010).

A análise da metilação do DNA pelo sequenciamento genômico de bisulfito é baseado sobre a conversão de citosina em DNA fita simples em uracila por bisulfito de sódio, que é reconhecido como timina em subsequente amplificação e sequenciamento de PCR. Os 5-metildeoxicitosina (5mCs) não reagem a esta transformação e permanece citosina, permitindo distinguir os 5mCs a das citosinas não metiladas. É um método tanto quantitativo como qualitativo, utilizado para definir o estado de metilação em determinados *locus* de genes (SPILLANE; MCKEOWN, 2014; BRÄUTIGAM et al., 2013).

A quantificação de metilação de DNA global é frequentemente utilizada para analisar se as mudanças nos níveis de metilação do DNA ocorrem devido ao crescimento e desenvolvimento do organismo, ou se foi induzido por diferentes sinais ambientais. Os níveis globais de 5mC podem ser detectados por diversas técnicas analíticas, como: fase invertida cromatografia líquida de alta performance (RP-HPLC), eletroforese capilar, plasma de massa indutivamente acoplado em espectrometria de massa (ICP-MS), acoplamento de cromatografia líquida, espectrometria de massa por ionização por eletro pulverização e ensaios baseados em ELISA (NIC-CAN et al., 2015).

Outra técnica muito utilizada é a amplificação de polimorfismo sensível a metilação (MSAP), utilizada para identificar variações epigenéticas do genoma. É uma técnica baseada na utilização de um par de enzimas de restrição sensíveis a metilação, HpaII e MspI, onde ambas reconhecem a sequência 5-CCGG-3. No entanto, sua ação é afetada pelo padrão de metilação em citosina interna ou externa.

Com o avanço dos estudos sobre a importância da metilação para diferentes processos biológicos, estão crescendo o número e a sensibilidade de técnicas para medir a 5mC. A análise da metilação *in situ* utilizando imunolocalização acoplada a microscopia confocal, permite uma análise mais sensível para identificar a localização e distribuição exata das 5mC. É uma técnica que se utiliza anticorpos e um microscópio confocal, sendo possível detectar o sinal de fluorescência com alta sensibilidade e boa reprodutibilidade (KATHIRIA; KOVALCHUK, 2010).

## REFERÊNCIAS

- AVRAMOVA, Z. **Transcriptional “memory” of a stress: Transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes.** *Plant Journal*, v. 83, n. 1, p. 149–159, 2015.
- BONASIO, R.; TU, S.; REINBERG, D. **Molecular Signal of Epigenetic States.** *Science*, v. 330, n. 6004, p. 612–616, 2010.
- BRÄUTIGAM, K. et al. **Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment.** *Ecology and Evolution*, v. 3, n. 2, p. 399–415, 2013.
- COCHRANE, A.; COCHRANE, A. **Modelling seed germination response to temperature in *Eucalyptus L' Her.* ( Myrtaceae ) species in the context of global warming.** p. 99–109, 2017.
- CORREDOIRA, E. et al. **Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees.** p. 678–690, 2015.
- CORREDOIRA, E. et al. **Initiation of leaf somatic embryogenesis involves high pectin esterification, auxin accumulation and DNA demethylation in *Quercus alba*.** *Journal of Plant Physiology*, v. 213, p. 42–54, 2017.
- DAVID, C.; BRAVO, V.; VENCOVSKY, R. **Controle genético da regeneração.** p. 2181–2185, 2008.
- DOBROWOLSKA, I. et al. **Histological analysis reveals the formation of shoots rather than embryos in regenerating cultures of *Eucalyptus globulus*.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 128, n. 2, p. 319–326, 2017.
- EL-TANTAWY, A.A., SOLIS, M.T., RISUENO, M.C. and TESTILLANO, P.S. (2014) **Changes in DNA methylation levels and nuclear distribution patterns after microspore reprogramming to embryogenesis in barley.** *Cytogenet. Genome Res.* 143: 200–208
- FINNEGAN, E.J.; KOVAK, K.A. **Plant DNA methyltransferases.** *Plant Mol Biol* 43:189–201, 2000.
- FRAGA, H. P. F. et al. **5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels.** *Plant Cell Reports*, v. 31, n. 12, p. 2165–2176, 2012.
- FRAGA, H. P. F. et al. **DNA methylation and proteome profiles of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures as affected by plant growth regulators supplementation.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 125, n. 2, p. 353–374, 2016.
- GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. ***Eucalyptus* applied genomics: From gene sequences to breeding tools.** *New Phytologist*, v. 179, n. 4, p. 911–929, 2008.
- GRONES, P.; FRIML, J. **Auxin transporters and binding proteins at a glance.** *Journal of Cell Science*, v. 128, n. 1, p. 1–7, 2015.

Henderson, I.R.; Jacobsen, S.E. **Epigenetic inheritance in plants.** *Nature*. p. 447:418–24, 2007.

**BRASILEIRA DE ARVORES** - IBÁ. Relatório 2017.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA** - IBGE. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. Rio de Janeiro: 2015. v. 30

JIN, F. et al. **Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: Evidence for stress response functions in SE development.** *Plant Biotechnology Journal*, v. 12, n. 2, p. 161–173, 2014.

JIMENEZ, V.M. **Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis.** *Plant Growth Regulation*, 47:91–110, 2005.

KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, I. **In Situ Analysis of DNA Methylation in Plants.** p. 41–48, 2010.

KOHLER, C., VILLAR, C.B. **Programming of gene expression by Polycomb group proteins.** *Trends Cell Biol.* 18 (5), 236–243, 2008.

KRISHNAN, S. R. S.; SIRIL, E. A. **Auxin and nutritional stress coupled somatic embryogenesis in Oldenlandia umbellata L.** *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 23, n. 2, p. 471–475, 2017.

LAW, J.A.; JACOBSEN. S. E. **Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals.** *Nature* ver.11,204-220, 2010.

LELJAK-LEVANIĆ, D. et al. **Hormonal and epigenetic regulation during embryogenic tissue habituation in Cucurbita pepo L.** *Plant Cell Reports*, v. 35, n. 1, p. 77–89, 2016.

LOSCHIAVO, F. et al. **DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs.** *Theoretical and Applied Genetics*, v. 77, n. 3, p. 325–331, 1989.

MEIJÓN, M., FEITO, I., VALLEDOR, L., RODRÍGUEZ, R., and CANÁL, M. J. **Dynamics of DNA methylation and Histone H4 acetylation during floral bud differentiation in azalea.** *BMC Plant Biol.* 10:10. doi: 10.1186/1471-2229-10-10, 2010.

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.

NAKHOODA, M.; MANDIRI, E. **Using synergistic exogenous phytohormones to enhance somatic embryogenesis from leaf explants of a Eucalyptus ...** n. May, 2016.

NIC-CAN, G. I. et al. **New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 Are Epigenetically Regulated in Coffea canephora.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, 2013.

- NIC-CAN, G. I. et al. **Somatic Embryogenesis : Identified Factors that Lead to Embryogenic Repression . A Case of Species of the Same Genus.** p. 1–21, 2015.
- NOCEDA, C. et al. **DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn.** cell culture. *Trees - Structure and Function*, v. 23, n. 6, p. 1285–1293, 2009.
- OUYANG, L. et al. **Efficient Regeneration of *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* from Stem Segment.** v. 55, n. June, p. 329–334, 2012.
- PINTO, G. et al. **Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.** *Plant Cell Reports*, v. 27, n. 6, p. 1093–1101, 2008.
- PINTO, G. et al. **Plant regeneration by somatic embryogenesis in *Eucalyptus* spp.: current status and future perspectives.** *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, v. 75, n. 2, p. 59–69, 2013.
- POTTS, B. M.; DUNGEY, H. S. **Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists.** *New Forests*, v. 27, p. 115–138, 2004.
- PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. **Effects of type of explant and age , plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*.** p. 13–20, 2010.
- RODRÍGUEZ-SANZ, H., MORENO-ROMERO, J., SOLIS, M.T., KOHLER, C., RISUENO, M.C. and TESTILLANO, P.S. **Changes in histone methylation and acetylation during microspore reprogramming to embryogenesis occur concomitantly with BnHKMT and BnHAT expression and are associated with cell totipotency, proliferation, and differentiation in *Brassica napus*.** *Cytogenet. Genome Res.* 143: 209–218, 2014.
- RODRÍGUEZ-SANZ, H. et al. **Auxin biosynthesis, accumulation, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in *Brassica napus*.** *Plant and Cell Physiology*, v. 56, n. 7, p. 1401–1417, 2015.
- RUSSO, V. E. A.; MARTIENSSEN, R. A.; RIGGS, A. D. **Epigenetic mechanisms of gene regulation.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1996.
- SOLÍS, M.-T. et al. **5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley** *Frontiers in Plant Science*, 2015.
- SPILLANE, C., MCKEOWN, P. C. **Plant Epigenetics and Epigenomics**, 2014.
- 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.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** In: ARTMED (Ed.). 5ª ed. 2013.
- TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. **Somatic embryogenesis in conifers.** *Can. J. Bot.*, 69:1873-1899, 1991.
- TESTILLANO, P.S., SOLIS, M.T., RISUENO, M.C. **The 5-methyl-deoxy-cytidine**

**(5mdC) localization to reveal in situ the dynamics of DNA methylation chromatin pattern in a variety of plant organ and tissue cells during development.** *Physiol. Plant.* 149 (1), 104–113, 2013.

XU, M.; LI, X.; KORBAN, S. S. **DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.).** *Theoretical and Applied Genetics*, v. 109, n. 5, p. 899–910, 2004.

SEGUNDA PARTE  
**Artigos**

**ARTIGO 1: 5-AZACITIDINA INDUZ A HIPOMETILAÇÃO NO DNA EM *Eucalyptus grandis***

## RESUMO

A metilação do DNA é um mecanismo regulador epigenético da expressão gênica, podendo estar associado a fases de desenvolvimento e competência genética *in vitro* de plantas. O presente estudo objetivou analisar o efeito do inibidor da metilação do DNA 5-Azacitidina (5-AzaC) na indução de calogênese em *Eucalyptus grandis*. Foram testados diferentes concentrações do agente desmetilante e quantificados os níveis globais de metilação do DNA por espectrometria de massa acoplada com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC /DAD). Foram utilizados hipocótilos de *Eucalyptus grandis*, com 20 dias após a germinação, sendo seccionados longitudinalmente e inoculados em meio de indução de calos. Após 180 dias de indução, esses calos foram cultivados em meios suplementados com o agente desmetilante 5-AzaC nas concentrações de 0 (controle); 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu\text{M}$  e avaliados aos 30 e 60 dias após a exposição ao agente. Após 30 dias, os tratamentos suplementados com 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC no meio de cultura apresentaram sintomas de toxicidade celular e necrose do tecido. Aos 60 dias, no tratamento com 0,5  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC foi possível obter duas linhagens de calos distintas, denominadas Linhagem 1 (L1) e Linhagem 2 (L2). A L1 apresentou uma redução de 76,5% dos níveis de metilação global do DNA dos calos, enquanto a L2, apresentou um aumento de 13,6% dos níveis globais de metilação e visualmente início de oxidação nos calos. A análise HPLC / DAD mostrou uma diminuição gradativa nos níveis de metilação nos calos da L1. A medida que estes resultados pressupõem que 0,5  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC é uma concentração próxima da ideal para aplicação em tratamentos visando a desmetilação do DNA, afim de causar uma reprogramação celular para uma possível aquisição de totipotência celular em *Eucalyptus grandis*.

**Palavras-chave:** Hipometilação do DNA. Toxicidade. 5-Azacytidina

## ABSTRACT

DNA methylation is an epigenetic regulatory mechanism of gene expression and may be associated with developmental stages and in vitro genetic competence of plants. The present study aimed to analyze the effect of 5-Azacytidine (5-AzaC), DNA methylation inhibitor, on the induction of callogenesis in *Eucalyptus grandis*. Different concentrations of the demethylating agent were tested and the overall levels of DNA methylation were quantified by mass spectrometry coupled with high performance liquid chromatography (HPLC / DAD). *Eucalyptus grandis* hypocotyls were used 20 days after germination and were longitudinally sectioned and inoculated in callus induction medium. After 180 days of induction, these calli were cultured in media supplemented with the 5-AzaC demethylating agent at concentrations of 0 (control); 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0  $\mu\text{M}$ , and evaluated at 30 and 60 days after exposure to the agent. After 30 days, treatments supplemented with 1.0; 2.0 and 4.0  $\mu\text{M}$  5-AzaC in the culture medium showed symptoms of cellular toxicity and tissue necrosis. At 60 days, in the treatment with 0.5  $\mu\text{M}$  of 5-AzaC, it was possible to obtain two different calli strains, named Line 1 (L1) and Line 2 (L2). L1 showed a reduction of 76.5% in global DNA methylation levels of calli, while L2 showed a 13.6% increase in global methylation levels and visually a beginning of callus oxidation. HPLC / DAD analysis showed a gradual decrease in methylation levels in L1 calli. Therefore, it can be presumed that 0.5  $\mu\text{M}$  of 5-AzaC is a near-ideal concentration for application in treatments aiming at the demethylation of DNA, in order to cause a cellular reprogramming for a possible acquisition of cellular totipotency in *E. grandis*.

**Key words:** Hypomethylation of DNA. Toxicity. 5-Azacytidine

## INTRODUÇÃO

Ferramentas biotecnológicas como a clonagem, embriogênese somática e engenharia genética, vêm sendo aplicadas com o intuito de obter árvores de eucalipto de qualidade superior (GERMÁNÁ; LAMBARDI, 2016; NAKHOODA; MANDIRI, 2016). A embriogênese somática (ES) é uma ferramenta de grande importância, que consiste na obtenção de plântulas clonais a partir de um explante somático (folha, hipocótilo, embrião zigóticos, etc.) de uma planta (TESTILLANO; RISUEÑO, 2016; FEHÉR, 2015).

Muitas espécies lenhosas possuem recalcitrância *in vitro*, apresentando um baixo índice de regeneração de plantas (CORREDOIRA et al., 2017; FRAGA et al., 2016; NIC-CAN et al., 2015). Estudos vem sendo desenvolvidos para melhorar a compreensão dos mecanismos bioquímicos, fisiológicos e genéticos que regulam a embriogênese somática em plantas (MAHDAVI-DARVARI et al., 2015; ELHITI et al., 2013; YANG; ZHANG, 2010).

Apesar dos avanços na compreensão do processo de embriogênese somática, os mecanismos epigenéticos que ocorrem durante este processo biológico não estão completamente elucidados, mas é sabido que estas modificações ocorrem extensivamente durante a diferenciação e desenvolvimento celular (NIC-CAN et al., 2013).

Um aspecto recente que tem chamado atenção na comunidade científica é a epigenética. O termo "epigenética" compreende todas as mudanças genéticas e hereditárias na expressão gênica que não se relacionam com mudanças na própria sequência do DNA, mas ainda podem ser herdadas de uma geração à outra (CHEN et al., 2010). Entre as marcas epigenéticas mais estudadas estão a metilação do DNA e metilação da histona-3-lisina-9 (H3K9), as quais estão associadas com funções repressivas de transcrição (NIC-CAN et al., 2013; MIGUEL; MARUM, 2011).

Em plantas, a 5-azacitidina (5-AzaC), um análogo conhecido da 5-citosina, inibe a atividade da metiltransferase do DNA, levando à hipometilação do DNA genômico, podendo assim ser utilizado como um agente desmetilante em vários tecidos de plantas diferentes, levando a uma ampla gama de efeitos sobre o desenvolvimento, dependendo da dose, tempo e processo (SOLÍS et al., 2015).

Neste contexto, marcas epigenéticas e padrões de metilação do DNA têm surgido como um campo de investigação promissor. Sendo assim, neste trabalho

objetivou-se analisar o efeito da 5-azacitidina *in vitro* durante as fases iniciais de calos de *E. grandis* submetidos ao processo da embriogênese somática.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Como material vegetal foram utilizadas sementes de *Eucalyptus grandis* cedidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais – IPEF.

As sementes foram lavadas em solução de etanol a 70% por 30 segundos, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% com duas gotas de detergente comercial e mantidas em agitação manual por 25 minutos. Após este processo, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas a tríplice lavagem com água destilada autoclavada para remoção dos resíduos desinfestantes, secagem em papel filtro estéril, e posterior inoculação em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido com 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol, 4,9 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,8. As sementes foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas por um período de 20 dias.

### **Indução de Calos**

Após 20 dias, os hipocótilos das plântulas foram seccionados em quatro partes de aproximadamente 2 cm e inoculados em placas de Petri contendo 25 mL de meio de indução de calos, composto por sais e vitaminas do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de mio-inositol; 500 mg/L de caseína hidrolisada; 200 µM de picloram; 4,9 g/L de ágar e pH ajustado para 5,8 e cultivados por 120 dias, em sala de crescimento na ausência de luz, em temperatura de 25°C ± 2°C, com subcultivos a cada 21 dias.

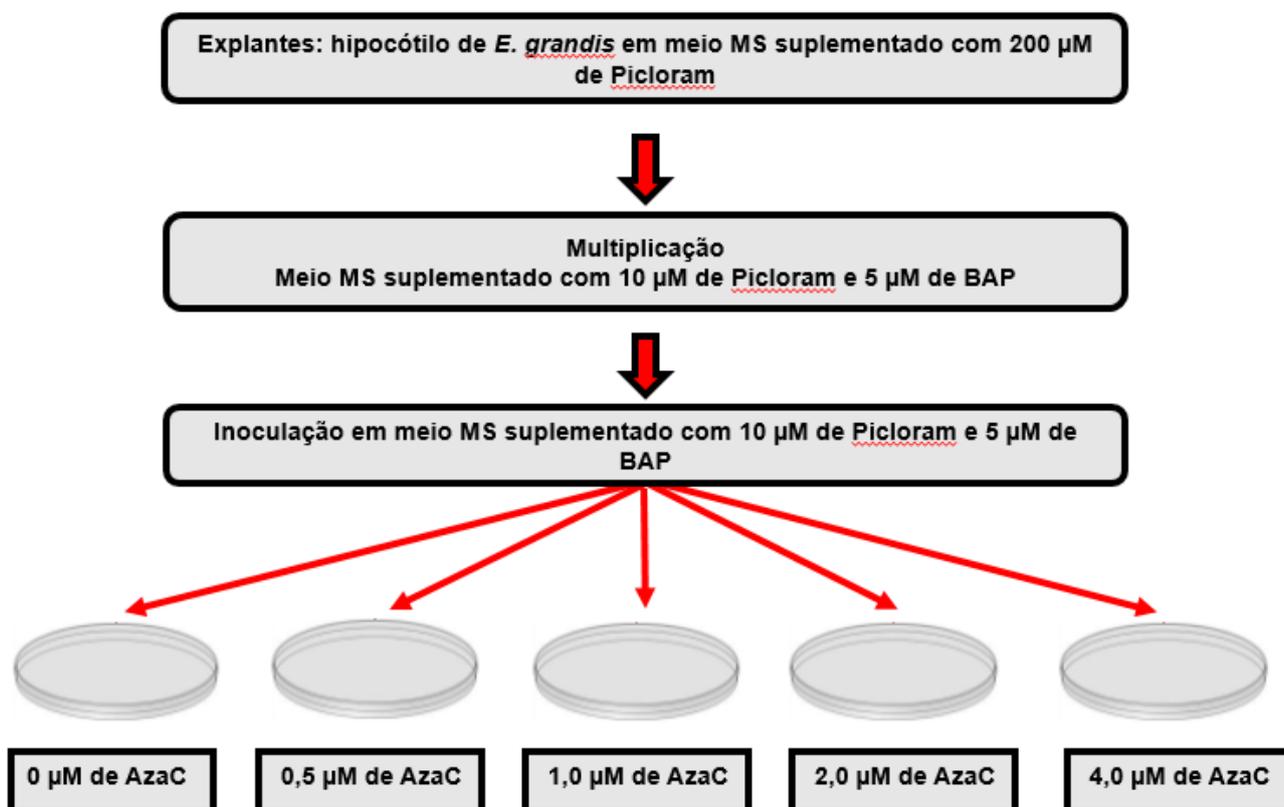
Posteriormente, os calos obtidos foram transferidos para o meio de multiplicação de calos composto por sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g/L de sacarose; 100 mg/L de mio-inositol; 500 mg/L de caseína hidrolisada; 10 µM de picloram; 5 µM de BAP; 4,9 g/L de ágar e pH ajustado para 5,8, os calos foram mantidos em sala de crescimento em

ausência de luz, com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 60 dias, sendo feito a renovação do meio a cada 21 dias.

Após este período, foram testadas 5 concentrações de 5-Azac (0 (controle), 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu\text{M}$ ) adicionadas no meio de multiplicação. As culturas foram mantidas em sala de crescimento em ausência de luz, com temperatura controlada de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sendo realizadas novas transferências a cada 21 dias.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, cuja unidade experimental foi constituída por 4 placas de Petri por tratamento com 9 calos cada placa, totalizando 5 tratamentos, com 4 repetições cada. As análises morfológicas e a quantificação dos níveis de metilação do DNA foram realizadas aos 0, 30 e 60 dias após a exposição ao agente desmetilante 5-Azac.

**Figura 1:** Resumo esquemático do procedimento realizado para o experimento de indução de embriogênese somática.



Fonte: Do autor, 2019

## Extração de DNA

Para a análise de quantificação global da metilação do DNA, amostras de calos foram coletadas no período de 0 e 60 dias após a exposição a 5-Azac.

Para extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de extração CTAB. Aproximadamente 150 mg de calos foram macerados em nitrogênio líquido utilizando o tissuelyser LT (Quiagem Hilden Germany) e transferidos para tubo Eppendorf de 2 mL o qual continha 1 mL de tampão de extração (2% p.v-1 de CTAB; 2,5% p.v-1 de PVP-40; 2M NaCl; 100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0) pré-aquecido a 65°C. Posteriormente foi adicionado 2% (v.v-1) de  $\beta$ -mercaptoetanol, e a solução foi incubada por 40 minutos a 65°C e depois centrifugada (13,4 g) por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v.v-1), seguido de homogeneização e nova centrifugação (13,4 g) por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo onde foi adicionado 4  $\mu$ L de RNase A na concentração estoque de 100 mg.mL<sup>-1</sup> e incubada a 37 °C por 30 minutos. Para a precipitação foi adicionado 240 $\mu$ L de álcool isopropílico PA gelado e incubado a -20 °C por 1 hora. Após a precipitação o material foi centrifugado durante 20 minutos (13,4g). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o pellet lavado em 400  $\mu$ L de etanol absoluto e ressuspendido com 30  $\mu$ L de água ultrapura autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20 °C. O DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop® ND-1000).

## Digestão de Ácidos Nucléicos

As digestões de DNA com nuclease P1 e fosfatase alcalina foram realizadas utilizando 25  $\mu$ g de DNA em 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O deionizada, como descrito por Fraga et al. (2012). Os ácidos nucleicos foram desnaturados por aquecimento a 100°C por 2 minutos e mantidos a 4°C por 5 minutos. Foram adicionados 5  $\mu$ L de ZnSO<sub>4</sub> a 10 mM e 10  $\mu$ L de nuclease P1 (1,0 U.ml<sup>-1</sup> em NaOAc 30 mM (pH 5,4)) seguido da agitação das amostras e incubação para a reação de digestão a 37°C por 17 horas. Após este período, foram adicionados 10  $\mu$ L de Tris 0,5M (pH 8,3) e 10  $\mu$ L de fosfatase alcalina (10 U.ml<sup>-1</sup> em (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M) aos microtubos, sendo agitados e incubados por 2h

a 37°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 10.000 × *g* por 5 min e o sobrenadante foi armazenado a -20°C até a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

### **Análise por HPLC**

A análise por HPLC / DAD foi realizada em um sistema HPLC Shimadzu, constituído por duas bombas LC-20AD, desgaseificador DGU-20A<sup>3</sup>, sistema de controle CBM-20A, forno de coluna CTO-20A, detector SPD-M20A e amostrador automático SIL-20AHT.

Utilizou-se o método de eluição por gradiente com coluna de fase reversa C18 UP-ODS 5µm (150 x 4,6mm) à temperatura de 25°C, com comprimento de onda de 276 nm. O volume de injeção utilizado foi de 5 µL e um gradiente de fluxo de eluição de: 0' à 13' - 0,2 mL/min; 13' à 15' - 0,2 a 0,5 mL/min; 15' à 30' - 0,5 mL/min. Para a separação cromatográfica utilizou como fases móveis a mistura A (Tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 50mM) + 0,2% Trietanolamina) e B (Metanol). As corridas foram isocráticas sendo 95% de A e 5% de B.

Os nucleotídeos usados como padrão (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e também o 5mdC foram digeridos por 2 h com fosfatase alcalina (10 U ml<sup>-1</sup>) e Tris-HCl (0,5 M, pH 8,3) a 37 °C, para obter os nucleosídeos. Os nucleosídeos padrão foram preparados em H<sub>2</sub>O deionizada e armazenados a -20 °C. A identificação de cada nucleosídeos foi feita pelo tempo de retenção. A partir das áreas dos respectivos picos nos cromatogramas, foi determinada a concentração de 5mdC em relação à de citosina total, dCTP+5mdC. Os dados foram adquiridos e processados com uso do software LC-Solutions.

## **RESULTADOS**

### **Indução e Multiplicação de Calos**

Após 120 dias da indução, foram selecionados os calos que apresentavam uma coloração amarela intensa. Estes calos com aspecto friáveis (Figura 3), foram utilizados como explantes para testar os efeitos das diferentes concentrações do agente desmetilante 5-AzaC.

**Figura 3:** Calo de *Eucalyptus*



**Legenda:** Após 60 dias de cultivo em meio de multiplicação.

### **Efeitos dos tratamentos com 5-AzaC na multiplicação dos calos**

Após 30 dias de exposição dos calos ao agente desmetilante 5-AzaC foi possível observar que as concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0  $\mu\text{M}$  foram tóxicas aos calos, levando a oxidação e posterior necrose dos mesmos (Figura 4 C, D e E). Entretanto, os calos submetidos à concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC mantiveram alta taxa de multiplicação e mantiveram a coloração amarelada (Figura 4 B).

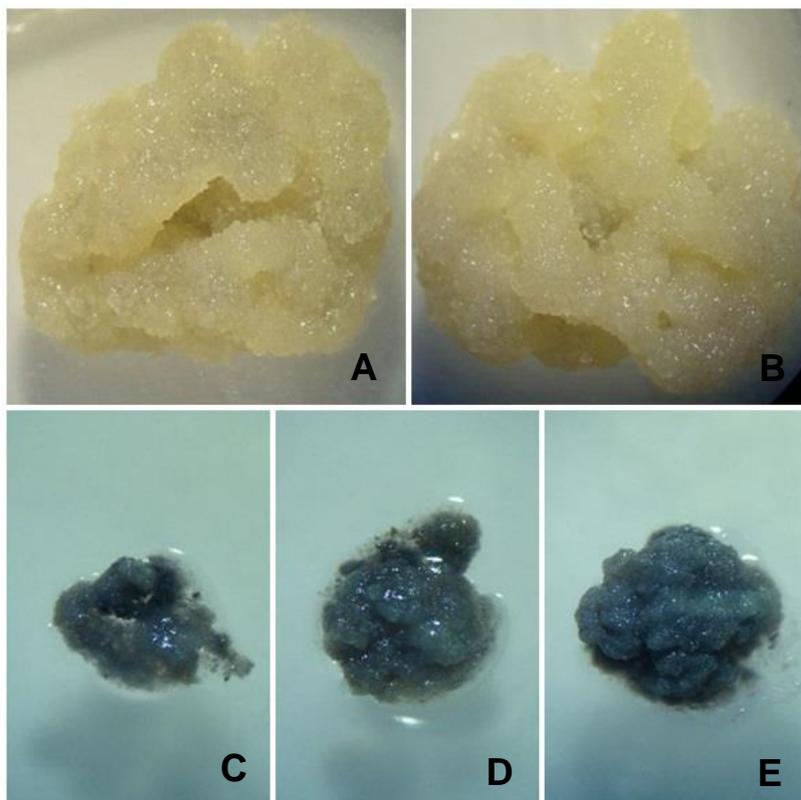
Os calos que necrosaram foram transferidos para meio de cultura livre de 5-AzaC, no entanto, não foi possível observar resposta de reversão do processo de necrose, sendo assim descartados.

Os calos controle (ausência de 5-AzaC) mantiveram coloração amarela após os 60 dias de cultivo.

Aos 60 dias, os calos submetidos à concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC apresentaram a formação de calos esbranquiçados, com características friáveis e alta taxa de multiplicação (Figura 5).

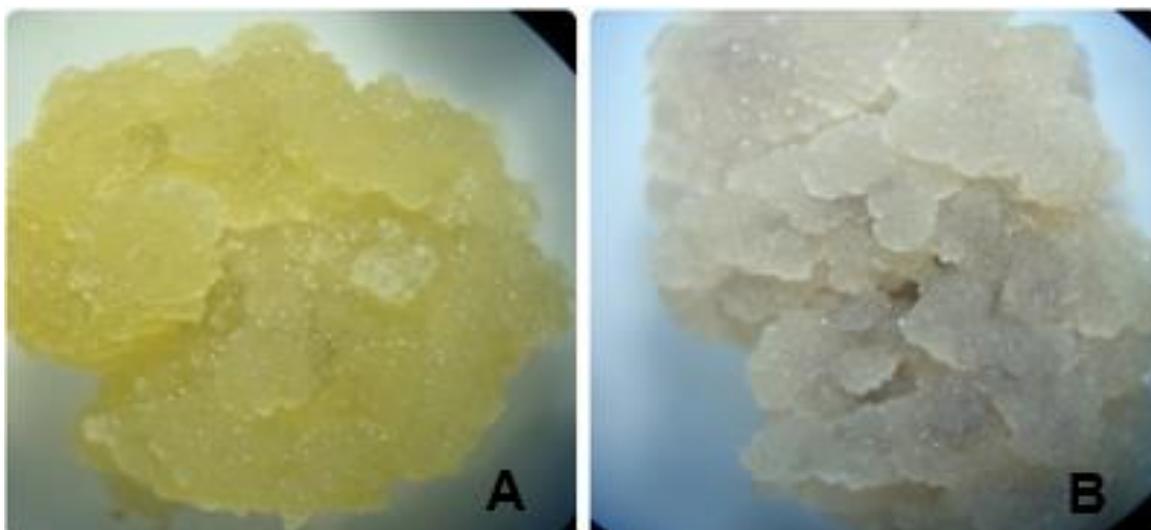
Ambos os tratamentos foram coletados para realizar a quantificação global de metilação do DNA.

**Figura 4:** Calos de *Eucalyptus grandis* submetidos aos tratamentos com o agente desmetilante 5-AzaC, aos 30 dias.



**Legenda:** A corresponde a 0  $\mu\text{M}$  de 5-Azac, B corresponde a 0,5  $\mu\text{M}$  de 5-Azac, C corresponde a 1,0  $\mu\text{M}$  de 5-Azac, D corresponde a 2,0  $\mu\text{M}$  de 5-Azac e E corresponde a 4,0  $\mu\text{M}$  de 5-Azac

**Figura 5:** Calos de *Eucalyptus grandis* obtidos após 60 dias de exposição ao agente desmetilante 5-AzaC.



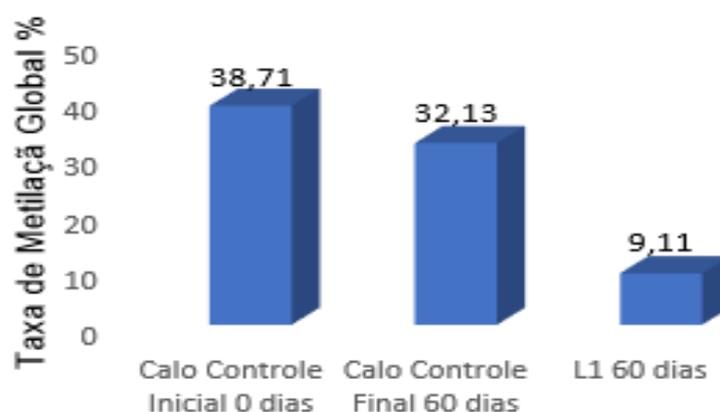
**Legenda:** Meio com ausência de 5-AzaC (A), e em meio contendo 0,5  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC (L1).

## Níveis globais de metilação do DNA de diferentes linhagens de Calos

Após 60 dias de subcultivo, a amostra controle (livre de 5-AzaC) foi analisada e comparada com a % de metilação presente no seu DNA no momento de montagem do experimento. Observou-se uma redução de 17% dos níveis globais de metilação, os quais apresentaram 38,71% de metilação no DNA aos 0 dias, reduzindo para 32,13% de metilação aos 60 dias.

Para o tratamento submetido à concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC, aos 60 dias, foi observado 9,11% de citosinas metiladas, mostrando uma diminuição de 76,5% dos níveis de metilação global, quando comparado com a amostra controle (Figura 6).

**Figura 6:** Taxa de metilação global dos calos de *Eucalyptus grandis*, após 60 dias de contato com a 5-AzaC, em relação a citosina total do DNA.



## DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato sobre a utilização da 5-AzaC promovendo a hipometilação do DNA em *Eucalyptus grandis*. A exposição *in vitro* de explantes ao 5-AzaC impede a incorporação de grupos metil nas citosinas do DNA, causando a hipometilação do DNA. O papel da metilação do DNA na mudança do estágio de desenvolvimento e iniciação da embriogênese somática, sugere que pode ser

possível iniciar a embriogênese em explantes até então recalcitrantes, modificando experimentalmente seu padrão de metilação com, por exemplo, auxinas ou agentes hipometilantes (VON-ADERKAS; BONGO, 2000). Estudos mostram que culturas embriogênicas e não embriogênicas de *Medicago truncatula*, quando induzidas na ausência de 5-AzaC, mostraram desenvolvimento anormal com má formação de raízes, mas mantendo a proliferação. No entanto, quando as culturas embriogênicas foram inoculadas em meio de cultura contendo 5-AzaC, formaram-se embriões somáticos, enquanto a linhagem não embriogênica, quando inoculada no mesmo meio, apresentou oxidação e morte celular (FRAGA et al., 2012).

Os resultados dos tratamentos de 1,0, 2,0 e 4,0  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC demonstraram um efeito negativo do agente desmetilante na multiplicação de calos, provocando toxicidade celular seguida de necrose do tecido (Figura 4). Diversos estudos relatam a utilização do 5-AzaC como aditivo no meio de cultura em várias espécies *in vitro*, com resultados diversos.

O efeito de toxicidade celular provavelmente foi causado devido à utilização de altas concentrações da substância, pois o 5-AzaC foi planejado originalmente para ser utilizada como uma droga citotóxica. A sua incorporação no DNA resulta na formação de ligações entre o DNA e a metiltransferase, enzima responsável pela metilação do DNA, não sendo capaz de ocorrer a replicação do DNA levando a morte celular. Entretanto, descobriu-se que uma dosagem baixa do 5-AzaC as ligações formadas são degradadas, ocorrendo a restauração do DNA e promovendo a desmetilação do DNA por inativação da DNA metiltransferase (MCCABE et al., 2009; STRESEMANN; LYKO, 2008).

Nos estudos citados anteriormente, a faixa de concentração de 5-AzaC tem sido bastante variada (10 a 200  $\mu\text{M}$ ). Conseqüentemente, um efeito dose-resposta com possíveis efeitos secundários e toxicidade celular poderia ocorrer nesses sistemas *in vitro*, como relatado anteriormente (TEYSSIER et al., 2014).

De acordo com as figuras 6, a concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de 5-AzaC testada, mostrou visivelmente alterações dos níveis globais de metilação do DNA global. O tratamento apresentou um calo com características mais embriogênicas, aspecto friável e estruturas arredondadas, sugerindo que nessa concentração o 5-AzaC não teve efeitos tóxicos à cultura de calos, promovendo assim a desmetilação do DNA (Figura 5).

A reprogramação e aquisição de totipotência celular envolve a ativação de inúmeros genes associados ao novo programa de desenvolvimento e / ou repressão de genes do programa celular original. A maneira pela qual diferenciar células vegetais remodelam seu programa de expressão gênica durante a aquisição da totipotência celular é uma questão central que envolve a reorganização da cromatina em larga escala (SOLÍS et al., 2015).

Estudos mostram que o 5-AzaC facilita e/ou promove a hipometilação do DNA e a descondensação da cromatina das células induzindo a reprogramação, a aquisição da totipotência e as divisões do pro-embrião inicial e, conseqüentemente, aumentando a eficiência do início da embriogênese. (ZHENG et al., 2012). Espera-se que a hipometilação do DNA em *Eucalyptus grandis* induzida por 5-AzaC poderia favorecer a desativação do seu programa de expressão gênica, ativando assim, um novo programa de expressão gênica que promova a totipotência de uma célula diferenciadora.

## CONCLUSÃO

O 5-AzaC induziu a hipometilação do DNA em alguns calos de *Eucalyptus grandis* quando utilizado na concentração de 0,5 µM. Concentrações mais elevadas promoveram uma possível toxicidade celular.

## REFERÊNCIAS

- CHEN Q, WESTFALL CS, HICKS LM, WANG S, JEZ JM. **Kinetic basis for the conjugation of auxin by a GH3 family indole-acetic acid-amido synthetase.** J Biol Chem; 285:29780-6, 2010.
- CHRISTMAN JK. **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.
- CORREDOIRA, E. et al. **Initiation of leaf somatic embryogenesis involves high pectin esterification, auxin accumulation and DNA demethylation in Quercus alba.** Journal of Plant Physiology, v. 213, p. 42–54, 2017.
- ELHITI M, STASOLLA C, WANG A **Molecular regulation of plant somatic embryogenesis.** Vitr Cell Dev Biol - Plant 49:631–642.
- MAHDAVI-DARVARI F, NOOR NM, ISMANIZAN I **Epigenetic regulation and gene**

**markers as signals of early somatic embryogenesis.** *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 120:407–422, 2015.

FEHÉR, A. (2015). **Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate.** *BBA Gene Regul. Mech.* 1849, 385–402, 2014.

FRAGA HPF, VIEIRA LN, CAPRESTANO CA, STEINMACHER DA, MICKE GA, Spudeit DA et al **5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acacia sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels.** *Plant Cell Rep* 31:2165–2176, 2012.

FRAGA, H. P. F. et al. **DNA methylation and proteome profiles of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures as affected by plant growth regulators supplementation.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 125, n. 2, p. 353–374, 2016.

GERMÁNÁ, M.A., LAMBARDI, M.x. **In vitro embryogenesis in higher plants.** *Methods in Molecular Biology series*, Vol. 1359. Springer Protocols, Humana Press, p. 1359, 2016.

MIGUEL, C., MARUM, L. **An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond.** *J. Exp. Bot.* 62, 3713–3725, 2011.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** *Physiol. Plant.* 15 (3), 473–497, 1962.

MCCABE MT, BRANDES JC, VERTINO PM. **Cancer DNA methylation: Molecular mechanisms and clinical implications.** *Clin Cancer Res* ;15:3927-3937, 2009.

NAKHOODA, M.; MANDIRI, E. **Using synergistic exogenous phytohormones to enhance somatic embryogenesis from leaf explants of a *Eucalyptus* ...** n. May, 2016.

NIC-CAN, G. I. et al. **New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, 2013.

NIC-CAN, G. I. et al. **Somatic Embryogenesis : Identified Factors that Lead to Embryogenic Repression .** *A Case of Species of the Same Genus.* p. 1–21, 2015.

SOLÍS, M.-T. et al. **5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley** *Frontiers in Plant Science*, 2015.

STRESEMAN C, LYKO F. **Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine.** *Int J Cancer* ;123:8-13, 2008.

TEYSSIER, C., MAURY, S., BEAUFOUR, M., GRONDIN, C., DELAUNAY, A., LEMETTÉ, C., et al. **In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses.** *Physiol. Plant* 150, 271–291, 2014.

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

YANG, X., ZHANG, X. **Regulation of somatic embryogenesis in higher plants.** *Crit. Rev. Plant Sci.* 29, 36–57, 2010.

ZHENG, Z., Li, L., LIU, X., WANG, D., Tu, B., WANG, L., et al. **5-Aza-2'-deoxycytidine reactivates gene expression via degradation of pRb pocket proteins.** *FASEB J.* 26, 449–459, 2012.

**ARTIGO 2:** O INÍCIO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA ENVOLVE ACÚMULO DE AUXINAS E HIPERMETILAÇÃO DO DNA EM *Eucalyptus grandis*.

## RESUMO

A embriogênese somática é considerada uma ferramenta conveniente para investigar os mecanismos reguladores da formação de embriões, sendo um sistema viável para procedimentos de regeneração *in vitro*, com muitas vantagens em espécies lenhosas. No entanto, algumas árvores apresentam recalcitrância à embriogênese somática, e sua eficiência permanece muito baixa em muitos casos. Sendo assim, apesar do claro potencial da embriogênese somática em programas de melhoramento, sua aplicação é limitada, uma vez que os fatores responsáveis pelo início da embriogênese ainda não foram completamente elucidados. No presente trabalho, investigamos alguns fatores celulares envolvidos na mudança do programa de desenvolvimento durante a iniciação da embriogênese somática em *E. grandis*, com o objetivo de identificar possíveis marcadores precoces do processo. Os resultados revelaram que o acúmulo de auxinas e a metilação do DNA foram induzidos durante o início da embriogênese e estão diferentemente encontrados em células embriogênicas. Constituem assim, potenciais marcadores precoces da embriogênese somática, representando processos que podem ser interconectados e envolvidos na regulação da reprogramação celular e do início da embriogênese. Estas descobertas fornecem novos insights sobre os mecanismos subjacentes à reprogramação de células vegetais e aquisição de competência embriogênica, especialmente em espécies arbóreas para as quais a informação é escassa, abrindo assim a possibilidade de manipulação eficiente da indução da embriogênese somática.

**Palavras-chave:** Auxina AIA. Epigenética. Histologia.

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis is considered a convenient tool to investigate the regulatory mechanisms of embryo formation, being a viable system for in vitro regeneration procedures, with many advantages in woody species. However, some trees present recalcitrance to somatic embryogenesis, and their efficiency remains very low in many cases. Thus, despite the clear potential of somatic embryogenesis in breeding programs, its application is limited, since the factors responsible for the onset of embryogenesis have not yet been fully elucidated. In the present work, we investigated the main cellular factors involved in the change of the development program during the initiation of somatic embryogenesis in *E. grandis*, in order to identify early markers of the process. The results revealed that auxin accumulation and DNA methylation were induced during the onset of embryogenesis and differently found in embryogenic cells, being absent in cells before induction or in non-embryogenic cells after the onset of embryogenesis. Thus, they are potential early markers of somatic embryogenesis, representing processes that can be interconnected and involved in the regulation of cellular reprogramming and the onset of embryogenesis. Therefore, these findings provide new insights into the mechanisms underlying plant cell reprogramming and the acquisition of embryogenic competence, especially in woody species for which information is scarce, thus opening up the possibility of efficient manipulation of the induction of somatic embryogenesis.

**Keyword:** Auxin IAA. Epigenetics. Histology.

## INTRODUÇÃO

As árvores florestais cobrem cerca de 30% da superfície terrestre, fornecendo combustível renovável, madeira e principalmente carvão e celulose (RAMAWAT et al. 2014). A cultura mais amplamente plantada nas regiões de clima tropical e subtropical é o eucalipto, uma árvore de rápido crescimento, da família Myrtaceae, nativa da Austrália, Tasmânia e ilhas próximas (CORREDOIRA et al., 2015). Os eucaliptos apresentam uma alta importância econômica e são caracterizados por sua rápida taxa de crescimento e grande produção de biomassa, capacidade de crescer em uma grande variedade de ambientes e solos e sua boa qualidade de madeira para a indústria (BROOKER et al. 2014).

Abordagens biotecnológicas como a clonagem, cultura de tecidos para micropropagação e engenharia genética, são utilizadas com o intuito de obter árvores de eucalipto que possuam uma madeira de melhor qualidade para a indústria de celulose e papel, tolerância ao estresse e resistência a doenças (GERMÁNA; LAMBARDI, 2016; NAKHOODA; MANDIRI, 2016; LABATE et al. 2008). Apesar do claro potencial da engenharia genética, esta tecnologia continua indisponível para a maioria dos eucaliptos, principalmente devido à ausência de um sistema efetivo de regeneração *in vitro* (PRAKASH; GURUMURTHI, 2010).

Para o melhoramento florestal, a embriogênese somática é um sistema extremamente útil, sendo as suas principais aplicações a propagação em larga escala de material selecionado, a transformação genética e a criopreservação de genótipos de elite (CORREDOIRA et al., 2017). Embora alguns poucos trabalhos tenham demonstrado a possibilidade de obter embriões somáticos em eucalipto, na maioria desses relatos, culturas embriogênicas foram iniciadas a partir de embriões zigóticos obtendo assim um material propagado de valor genético desconhecido, devido a utilização de sementes (PRAKASH; GURUMURTHI, 2010).

A identificação de marcadores celulares durante o início da embriogênese somática constitui um importante objetivo para elucidar os mecanismos envolvidos na aquisição da totipotência e início da embriogênese, e distinguir, após a indução, as células responsivas.

Em vários sistemas de embriogênese somática *in vitro*, foi relato o efeito estimulante de reguladores exógenos de crescimento de plantas (BÁRÁNY et al.,

2005; RAGHAVAN, 2004). A auxina ácido indol-3-acético (AIA), é um regulador essencial no crescimento e desenvolvimento de plantas, visto controlar processos celulares como divisão, expansão e diferenciação celular (GRONES; FRIML, 2015; MOCKAITIS; ESTELLE, 2008). Existem poucos estudos sobre os níveis endógenos deste regulador nos estágios iniciais, ou sobre sua localização endógena em sistemas de embriogênese *in vitro* (RODRIGUEZ-SANZ et al., 2015; PREM et al., 2012). Para analisar o acúmulo de auxinas durante os processos de desenvolvimento celular, o anticorpo AIA mostrou ser eficiente em várias espécies de plantas (RODRIGUEZ-SANZ et al., 2014; FORESTAN et al., 2010; KROUK et al., 2010; SCHLICHT et al., 2006).

A iniciação e reprogramação celular durante a embriogênese somática está relacionada com mudanças no programa genético de desenvolvimento celular, afetando a organização global do genoma, sendo assim, as modificações epigenéticas são fatores de grande importância na flexibilidade do genoma (CORREDOIRA et al., 2017).

No presente trabalho, a fim de caracterizar marcadores precoces de embriogênese somática, analisamos as mudanças que ocorrem na organização estrutural celular, o acúmulo de auxinas endógenas e a metilação do DNA durante o início da embriogênese somática em calos de *Eucalyptus grandis*, por meio de um estudo comparativo entre células embriogênicas e não embriogênicas. Os achados deste estudo comparativo entre diferentes células podem fornecer novos insights sobre os processos celulares que governam a indução da embriogênese *in vitro* em *E. grandis*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

As sementes de *E. grandis* utilizadas no experimento foram obtidas no viveiro florestal da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Elas foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar com álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 2,5% por 25 minutos, sob agitação, e posteriormente passaram por tríplice lavagem com água destilada autoclavada.

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 4,9 g L<sup>-1</sup> de ágar). Após 20 dias de cultivo, os hipocótilos foram utilizados como explantes na indução de calogênese.

### Indução de Calos

Hipocótilos das plântulas de *E. grandis* foram seccionados em quatro partes de aproximadamente 2 cm e inoculados em placas de petri contendo 25 mL de meio de indução de calos. Foi testado o meio de cultivo N6 (CHU et al., 1975) com diferentes concentrações da auxina Picloram (0, 10, 20 e 40 µM) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Tratamentos testados nos meios N6 com diferentes concentrações de Picloram.

Meio	Tratamentos	Auxina	mg/L
N6	T1	controle	0,0
	T2	10µM Picloram	2,41
	T3	20µM Picloram	4,82
	T4	40µM Picloram	9,64

Aos 60 dias foi feita a caracterização morfológica das linhagens dos calos, e aos 120 e 180 dias foram realizadas as análises histológicas e de imunolocalização.

Para análise estatística, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, cuja unidade experimental foi constituída de 5 placas de Petri por tratamento com 3 plantas cada, sendo totalizados 15 plantas por tratamento. Foi utilizado o programa Sisvar para a análise de média.

### Análise Histológica

. A fixação do material foi realizada em solução de FAA 70 (Formaldeído, Ácido Acético Glacial e Etanol 70%) por 24h, seguida por desidratação. Este processo consistiu em passar o material em uma sequência crescente de álcool etílico (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%), por 60 minutos em cada etapa. Para a infiltração e inclusão do material em resina, este permaneceu em uma solução de historresina com álcool etílico P.A. durante a noite. A amostra permaneceu por 4h em solução pura de hidroxietilmetacrilato, de onde seguiu para o emblocamento.

Cortes seriados transversais (5  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos em micrótomo rotatório manual, distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida a 40°C. Uma parte dos cortes foram corados com azul de Toluidina, seguido da montagem entre lâmina-lamínula com Entellan. Parte dos resultados foram registrados em fotomicroscópio, acoplado a um sistema digital de captura de imagens, e o restante foi reservado para os ensaios de imunolocalização. Os melhores tratamentos aos 120 dias, foram repetidos aos 180 dias.

### **Análise de Imunofluorescência**

As secções de resina (5  $\mu\text{m}$  de espessura) foram montadas em lâminas e secas a 40 °C. Foram analisadas 3 amostras representativas de cada etapa.

Os cortes foram lavados em solução PBS, para a imunodeteção do 5mdC, o material foi desnaturado com HCl por 45 minutos, e lavado em solução PBS. Em seguida, todos os cortes foram bloqueados com 5% (p/v) de leite em PBS durante 10 minutos, e incubados com os anticorpos primários anti-AIA e anti-5mdC durante 2 horas. Estes foram diluídos em 1:100 para anti-AIA e 1:50 para anti-5mdC, em solução com 2 % de BSA em PBS.

Após a lavagem em PBS, o sinal foi revelado utilizando sondas moleculares, anticorpos anti-rato marcados com Alexa Fluor 488, diluídas 1:25 em PBS durante 45 minutos no escuro, conforme descrito por CORREDOIRA et al., 2017). A lâmina com o material foi contrastada com 1 mg/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) durante 10 minutos, montadas e examinadas.

As análises de fluorescência foram realizadas com o microscópio Laser Confocal LSM780 Zeiss Observer Z.1 utilizando objetiva EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27 e software Zen 2010 pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Ultraestrutura da UFLA. As observações dos marcadores de 5mdc e AIA associados a AlexaFluor 488 foram realizadas utilizando o detector ChS1, Beam splitter MBS 488 nm, pinhole 34  $\mu\text{m}$ , laser Argon 488 nm 10%, Master Gain 540, Digital Offset 0.0, Digital Gain 1.0, e Filtro de Emissão para 500 a 550 nm. Para observar o material genético foi utilizado o marcador DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) (VectaShield® H-1200 Vector®), com o detector Ch1, Beam splitter MBS 405 nm, pinhole 29  $\mu\text{m}$ , laser Argon 405 nm 20%, Master Gain 300, Digital Offset 0.0, Digital Gain 1.0, e Filtro de Emissão para 420 a 470 nm. As imagens de campo

claro foram adquiridas utilizando o detector TPMT ChD, com Master Gain 225, Digital Offset 0.0, e Digital Gain 1.0.

A quantificação relativa de AIA e 5mdc marcados com AlexaFluor488 foi estimada por meio de intensidade de fluorescência (Kask et al., 1999) utilizando software ImageJ (Analyze/Measure/IntDen).

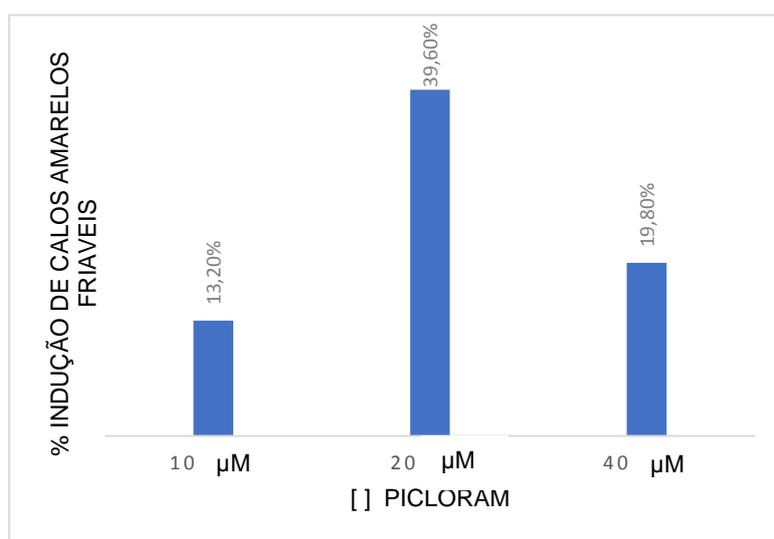
Os tratamentos que apresentaram melhores resultados aos 120 dias, foram repetidos aos 180 dias.

## RESULTADOS

### Indução de Calos Embriogênicos

Após 60 dias de indução, foi observado que os tratamentos com 20 $\mu$ M e 40  $\mu$ M de Picloram proporcionaram um número maior de formação de calos com aspecto friáveis e de cor amarela, apresentando medias de 39,60% e 19,80% respectivamente, enquanto que o tratamento contendo 10 $\mu$ M de Picloram apresentou 13,20% de formação de calos com as mesmas características (Figura 1, Figura 4A).

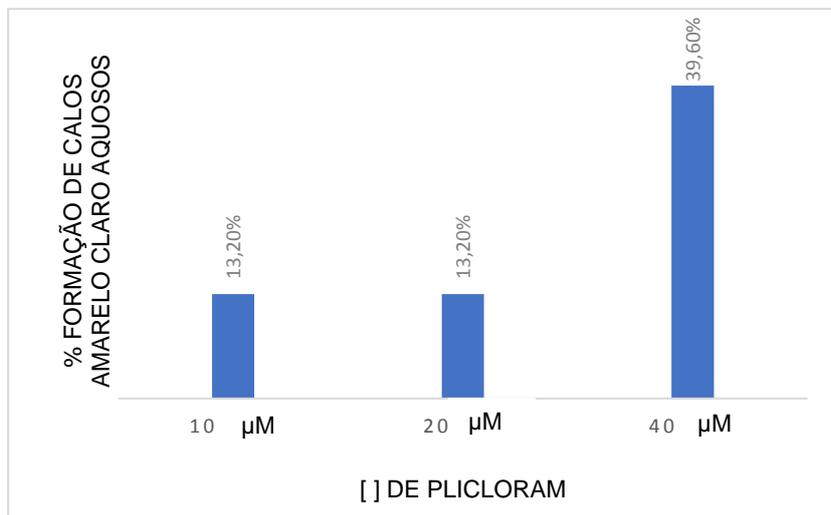
**Figura 1.** Média de formação de calos amarelos friáveis de *Eucalyptus grandis*, após 60 dias de indução.



A presença de calos amarelo claro com aspecto aquoso foi observado com maior frequência no tratamento com 40  $\mu$ M de Picloram, cerca de 39,60%. Já os

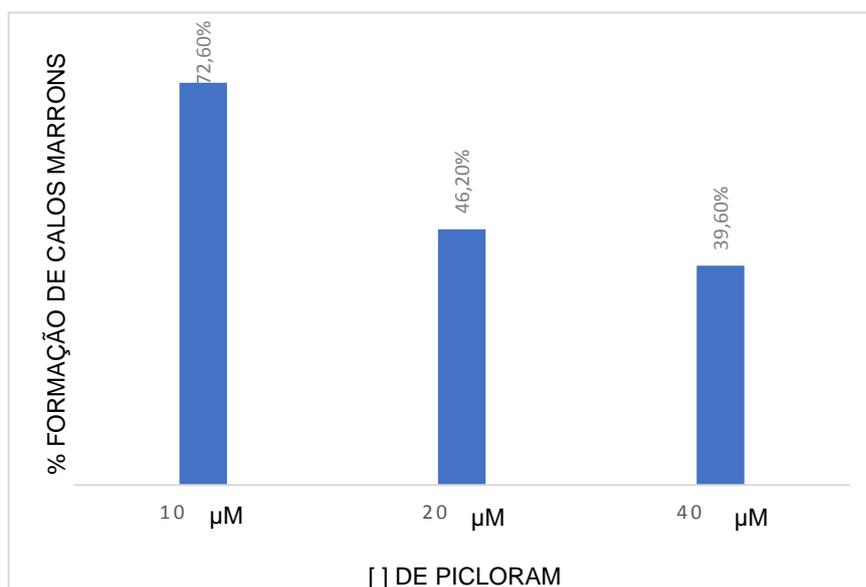
tratamentos com 10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M Picloram, apresentaram uma média de 13,20% de formação de calos amarelo claro aquosos (Figura 2, Figura 4B).

**Figura 2.** Média de formação de calos amarelo claro aquosos de *Eucalyptus grandis*, após 60 dias de indução.

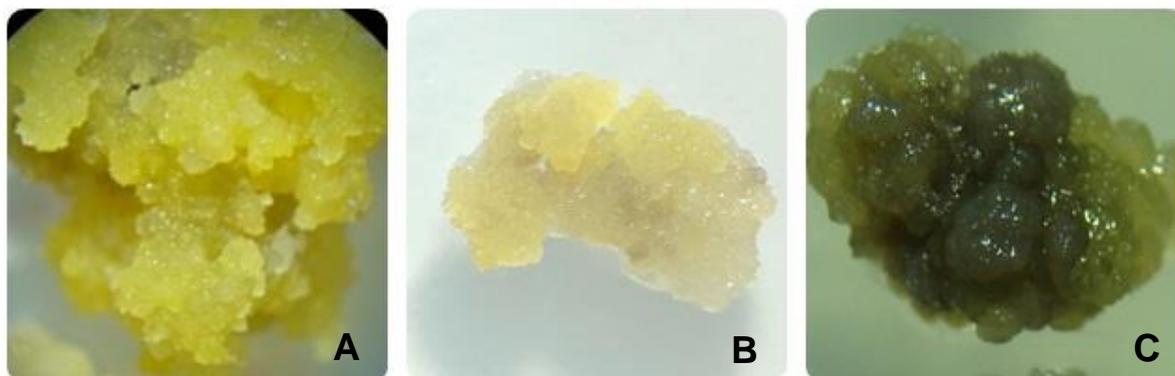


O tratamento com 10 $\mu$ M de Picloram foi o que proporcionou a maior formação de calos marrons (72,60%), seguidos pelos tratamentos contendo 20 $\mu$ M Picloram (46,20%) e o tratamento com 40  $\mu$ M de Picloram a menor porcentagem (39,60%) (Figura 3, Figura 4C).

**Figura 3.** Média de formação de calos marrons de *Eucalyptus grandis* após 60 dias de indução



**Figura 4.** Linhagens de calos obtidos de hipocótilos de *E. grandis* avaliados após 60 dias nos meios de indução.



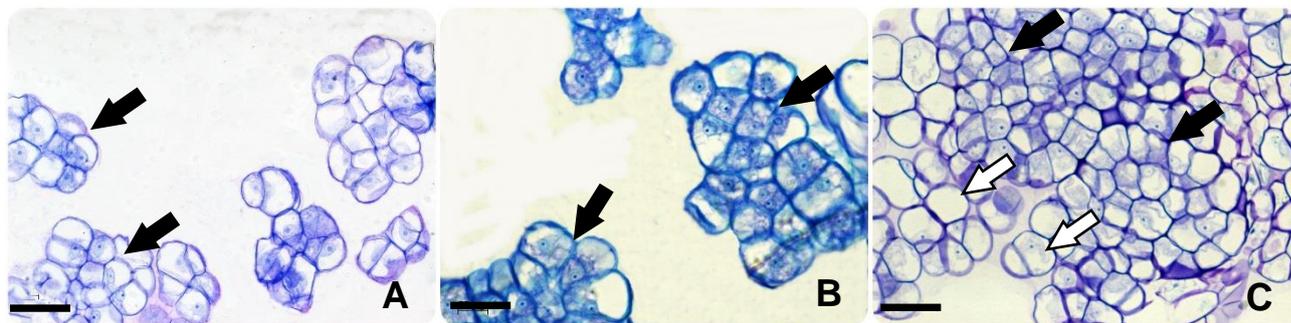
**Legenda:** (A) Calo amarelo friável; (B) calo amarelo claro aquoso; (C) calo marrom.

As análises morfohistológicas realizadas aos 120 dias após indução dos calos de *E. grandis* com aspecto friável e cor amarela, permitiram caracterizar as principais mudanças na organização celular durante o início da indução de embriogênese somática.

O aparecimento de algumas células meristemáticas foi observado no tratamento contendo 10 $\mu$ M de Picloram, sendo possível verificar divisões celulares com agrupamentos de duas células, porém, com baixa frequência (Figura 5A). O tratamento suplementado com 20 $\mu$ M de Picloram favoreceu um maior número de divisão celular, apresentando agrupamentos de duas a quatro células, que exibiam citoplasmas denso e um núcleo localizado centralmente (Figura 5B). Já no tratamento contendo 40 $\mu$ M de Picloram foi observado células vacuoladas nas regiões mais externas do calo, enquanto as células mais internas apresentaram características meristemáticas, com o núcleo e nucléolo evidente e algumas poucas células em divisão (Figura 5C).

Para as posteriores análises histológicas e os experimentos de imunofluorescência com anticorpo, foram escolhidos os tratamentos que mostraram maior potencial para uma possível indução de embriogênese somática, ou seja, aqueles suplementados com 20 $\mu$ M e 40 $\mu$ M de Picloram.

**Figura 5:** Secções transversais de calos amarelo friáveis de *Eucalyptus grandis* aos 120 dias, em meio de indução de embriogênese somática.

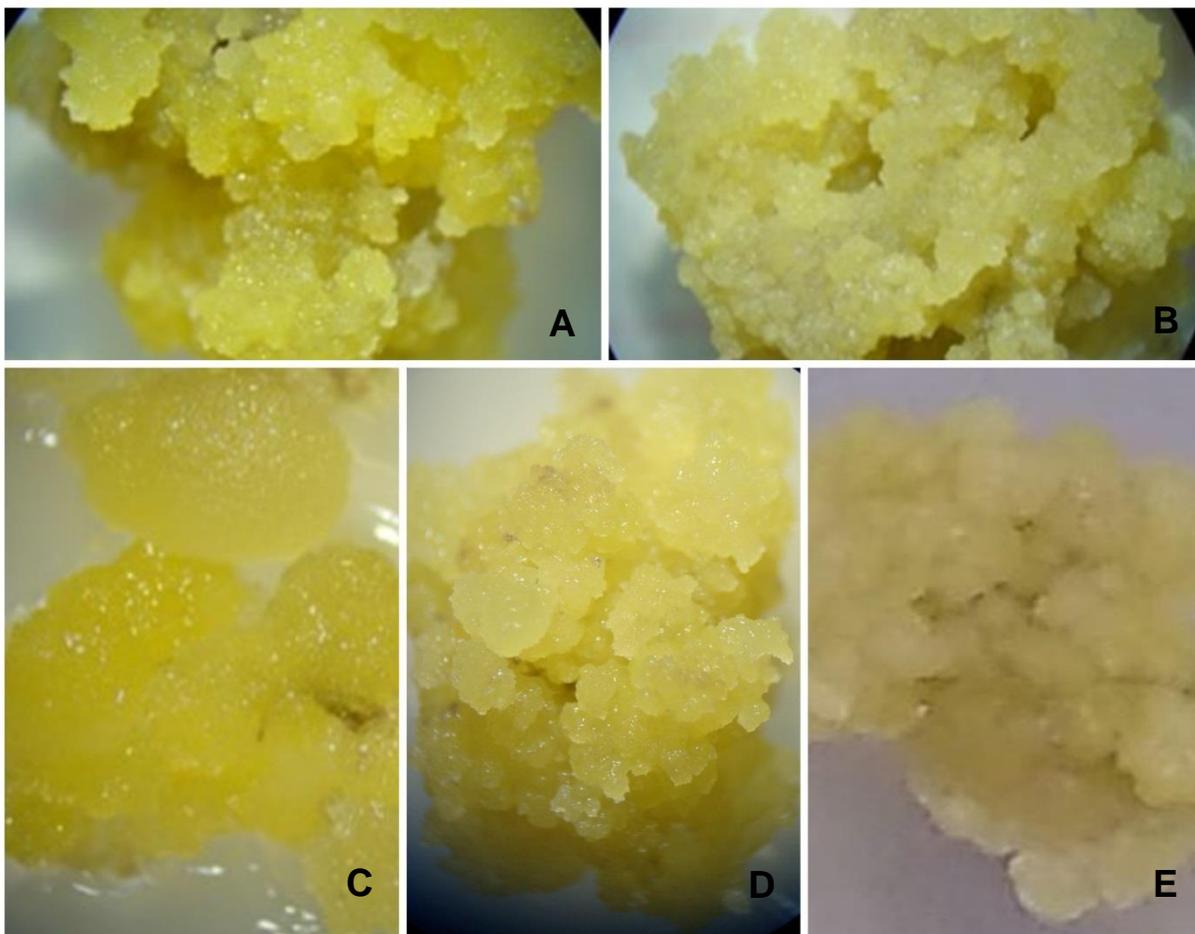


**Legenda:** A: Tratamento N6 contendo 10µM picloram, onde as setas pretas indicam as divisões celulares. B: Tratamento N6 suplementado com 20µM picloram, onde as setas pretas indicam agrupamentos de duas a quatro células. C: Tratamento N6 acrescido de 40µM picloram, onde as setas brancas indicam as células vacuoladas e as setas pretas indicam as células meristemáticas em divisão. As barras representam 50µM.

Após 180 dias de indução de calos, foram obtidas diferentes linhagens de calos nos tratamentos contendo 20µM e 40µM de Picloram. No tratamento suplementado com 20µM de Picloram, foram obtidas duas linhagens de calos distintas, denominadas L20.1 e L20.2. A L20.1 (Figura 6A) apresentou a formação de calos amarelos intensos, com aspecto friável e de rápida multiplicação, enquanto que na L20.2 (Figura 6B) foi observado a formação de calos com as mesmas características, no entanto, com uma coloração amarelo menos intensa (Figura 6A e B).

Para o tratamento suplementado com 40µM de Picloram foram obtidas três linhagens distintas, sendo separadas como L40.1, L40.2 e L40.3. A linhagem L40.1 (Figura 6C) apresentou a formação de calos amarelo intenso, porém com aspecto aquoso e esponjoso. Na L40.2 (Figura 6D) foi possível verificar a formação de calos de cor amarelo intenso e aspecto friáveis, ao passo que se observou a formação de calos de cor amarelo claro com alguns pontos brancos na L40.3 (Figura 6E).

**Figura 6:** Linhagens de calos de *Eucalyptus grandis* aos 180 dias.



**Legenda:** A: Calo da linhagem L20.1, com aspecto friavel amarelo escuro. B: Calo obtido na linhagem L20.2, aspecto friavel amarelo claro. C: Calo da linhagem L40.1, com aspecto aquoso. D: Calo da linhagem L40.2, com característica friavel. E: Calo da linhagem L40.3, friavel com algumas regiões brancas.

Mediante a análise microscópica, das diferentes linhagens, foi possível observar que a L20.1 apresentou células irregulares e núcleo e nucléolo visível, com poucas divisões celulares. As áreas exteriores do calo apresentaram células vacuoladas sem a presença visível de núcleo (Figura 7 A). A L20.2 apresentou células isodiamétricas com citoplasma denso e núcleo e nucléolo evidente ao centro e poucas células alongadas na periferia (Figura 7 B). Foi observado células meristemáticas em divisão e a presença de elementos traqueais, que apresentaram paredes de forma espiralada, indicado pela coloração esverdeada de suas paredes quando coradas com azul de toluidina (Figura 7 B).

Para a linhagem L40.1 foi observada a formação de células isodiamétricas, com núcleo e nucléolo visível e centralizado (Figura 7 C). Em todo o tecido foi

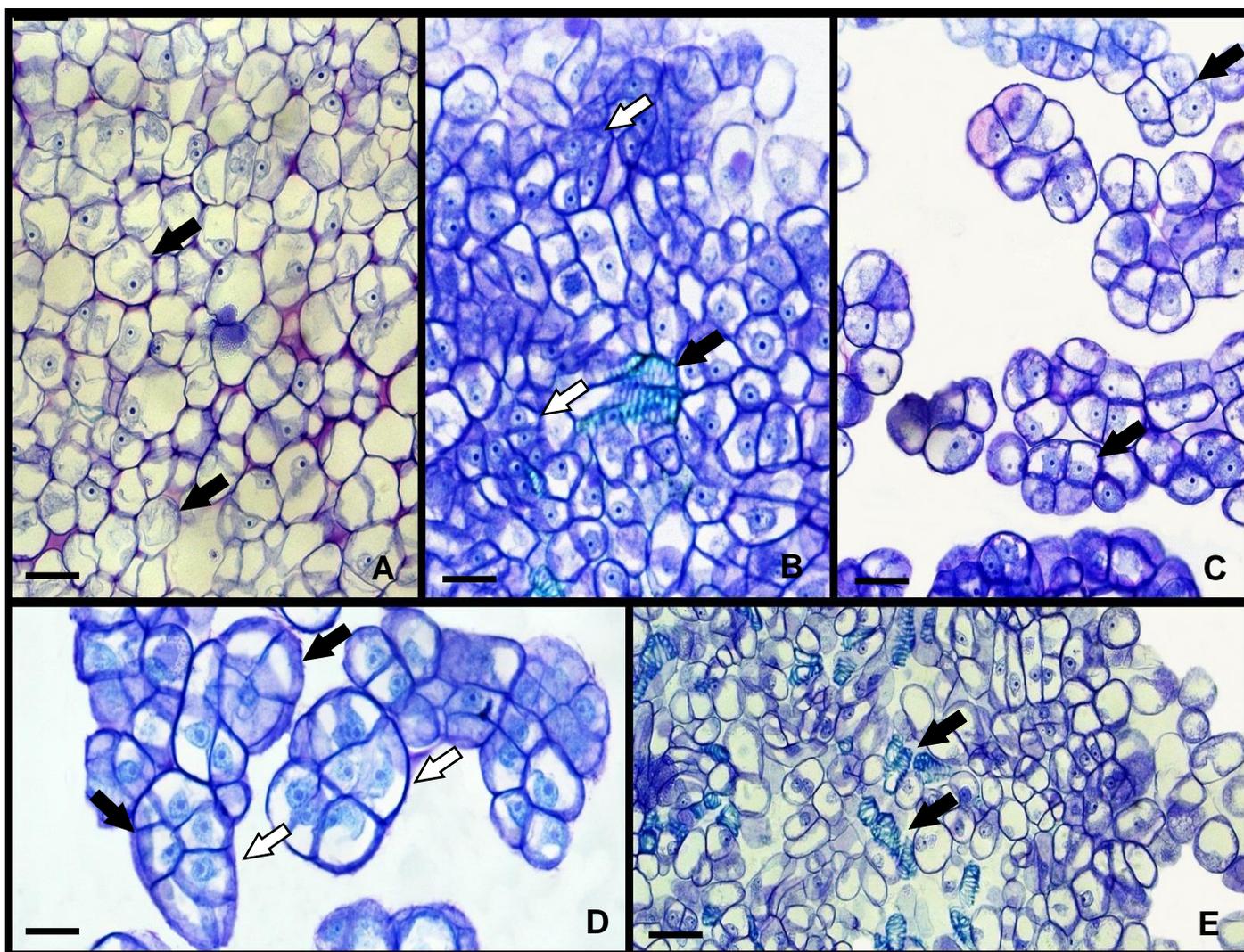
observado células meristemáticas em divisão, agrupamentos de duas a quatro células e formação de próembriões em estágio inicial (Figura 7C).

Presença de células meristemáticas embriogênicas foram observadas na L40.2, com núcleo evidente (Figura 7D). Neste local ocorreram muitos agrupamentos de duas a oito células e a formação de alguns próembriões em fase mais avançada (Figura 7H). Ao redor desses agrupamentos, a parede celular apresentou um aspecto mucilaginoso, o que provavelmente causou o isolamento destes agrupamentos das células que estavam próximas (Figura 7D).

Células vacuoladas sem a presença de núcleo e com o citoplasma menos denso foram observadas na parte externa dos calos da L40.3 (Figura 7E). Formação de elementos traqueais, em grande parte do tecido, apresentando paredes de forma espiralada, indicado pela coloração esverdeada de suas paredes quando coradas com azul de toluidina (Figura 7E).

As análises de imunofluorescência controle realizadas, onde se omitiu o anti-IAA não mostraram marcação sobre qualquer tipo de célula - embriogênica ou não-embriogênica - em qualquer estágio de desenvolvimento (Figura 8A, B e C), suportando a especificidade do sinal de imunofluorescência do AIA.

**Figura 7:** Análises microscópicas de calos de *Eucalyptus grandis*, aos 180 dias, em meio de indução de embriogênese somática.



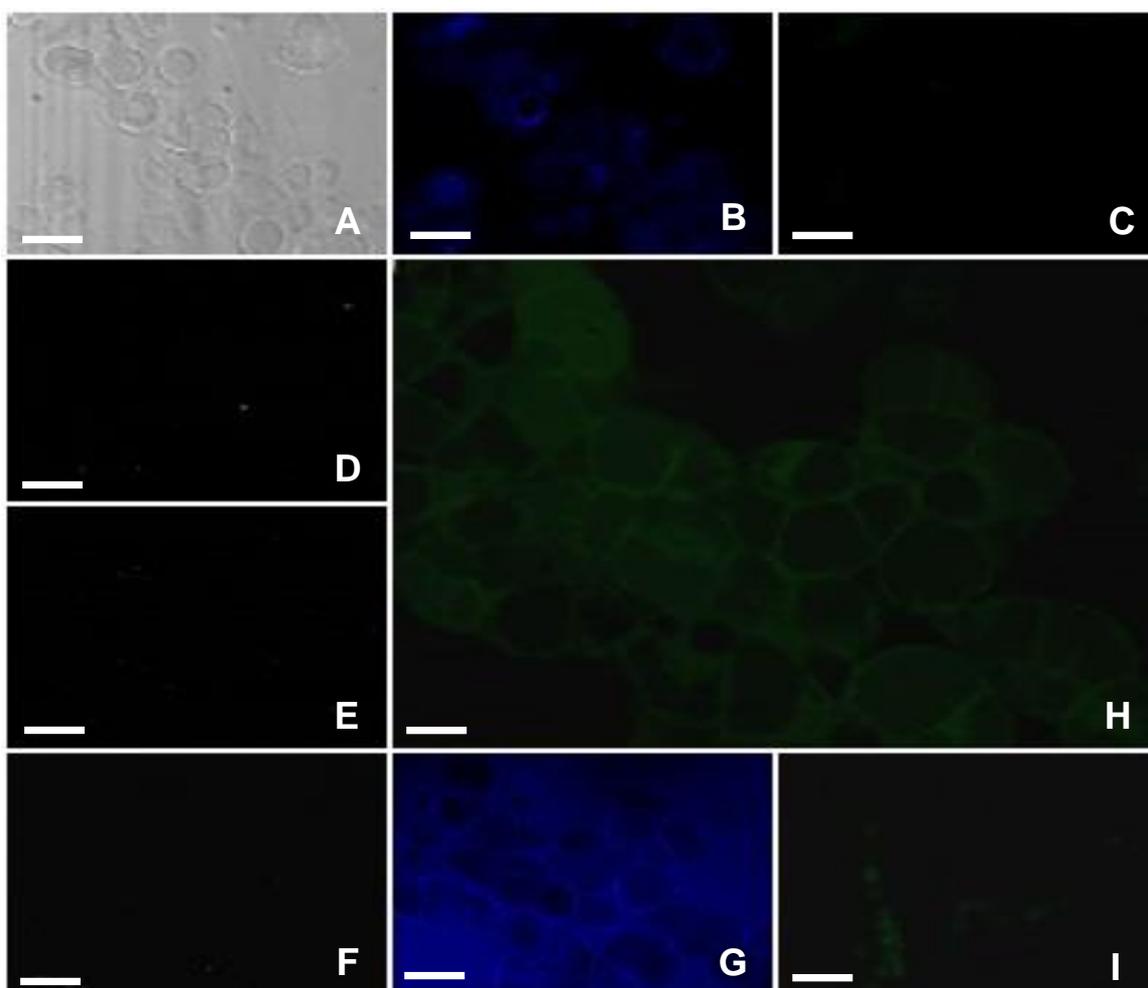
**Legenda:** A: corresponde a linhagem L20.1, a seta preta indica a presença de células irregulares e vacuoladas. B: calo da linhagem L20.2, onde a seta preta indica elementos traqueais e a seta branca indica células meristemáticas em divisão. C: Calo da linhagem L40.1, onde a seta preta indica a formação de pró-embrião em estágios iniciais. D: Calo da linhagem L40.2, as setas pretas indicam o isolamento dos pró-embriões pelo acúmulo de mucilagem e a seta branca indica os pró-embriões. E: Calo da linhagem L40.3, onde as setas pretas indicam os elementos traqueais. As barras representam 20 $\mu$ M.

Análises com anticorpos específicos anti-IAA foi realizada para avaliar as alterações no acúmulo de auxina intracelular *in situ* nos estágios iniciais da indução da embriogênese somática. Após a indução da embriogênese, em amostras de 180 dias, as linhagens L20.1, L20.2 e L40.3 apresentaram um sinal muito baixo de imunofluorescência AIA (Figura 8D, Figura E, Figura I,), com uma frequência de 0,146;

0,061 e 0,167, respectivamente (Figura 6). Leves marcações foram observadas no núcleo das células da linhagem L40.1, em uma frequência de 0,356 (Figura 9).

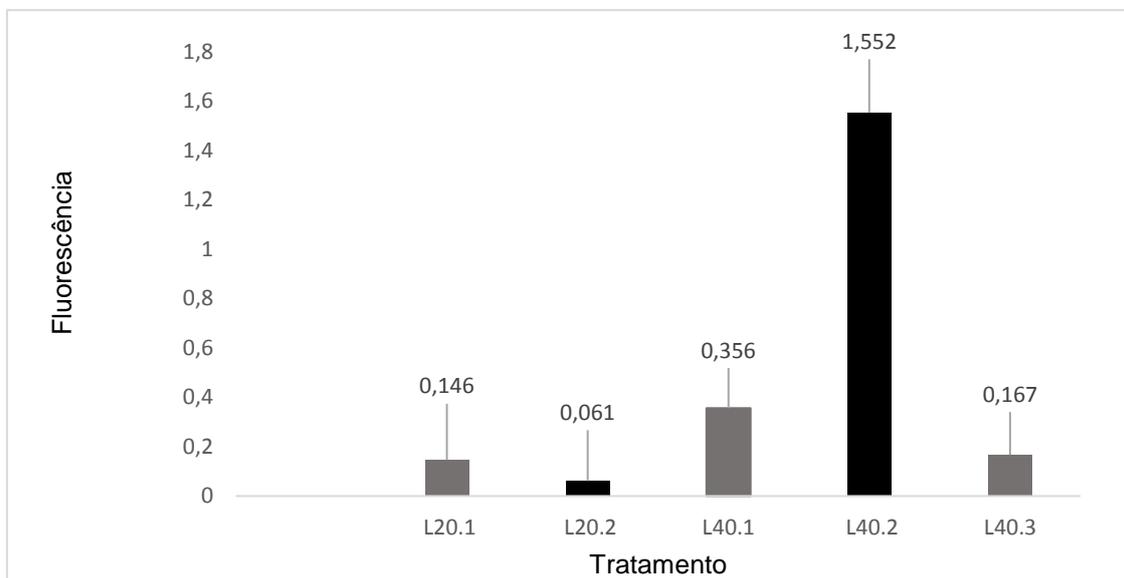
Já na linhagem L40.2, as células embriogênicas e massas pró-embriônicas mostraram intensa marcação com imunofluorescência do AIA (Figura 8H), com uma fluorescência de 1,552 (Figura 9). A marcação foi localizada no citoplasma e núcleo das células, enquanto os vacúolos eram negativos (Figura 8G). Apesar de sua proximidade com células embrionárias, as células não embriogênicas não mostraram marcação com anticorpos anti-IAA indicando que a auxina endógena foi diferencialmente acumulada em células de desenvolvimento de embriões somáticos.

**Figura 8:** Localização in situ da auxina (ácido indolacético, IAA) durante a indução da embriogênese somática, aos 180 dias.



**Legenda:** Controle por imunodepleção com anticorpo pré-bloqueado; campo claro (A), DAPI para núcleos em azul (B) e imagem confocal do sinal de imunofluorescência IAA em sinal verde (C). Imagens confocais do sinal de imunofluorescência IAA em imagens de contraste verde das linhagens L20.1(D), L20.2 (E), L40.1 (F), L40.2 (H), L40.3 (I). A marcação com DAPI para os núcleos e paredes em azul da linhagem L40.2 (G). As barras representam 20  $\mu\text{m}$ .

**Figura 9:** Intensidade de fluorescência com anticorpos específicos anti-AIA, durante a indução da embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*.

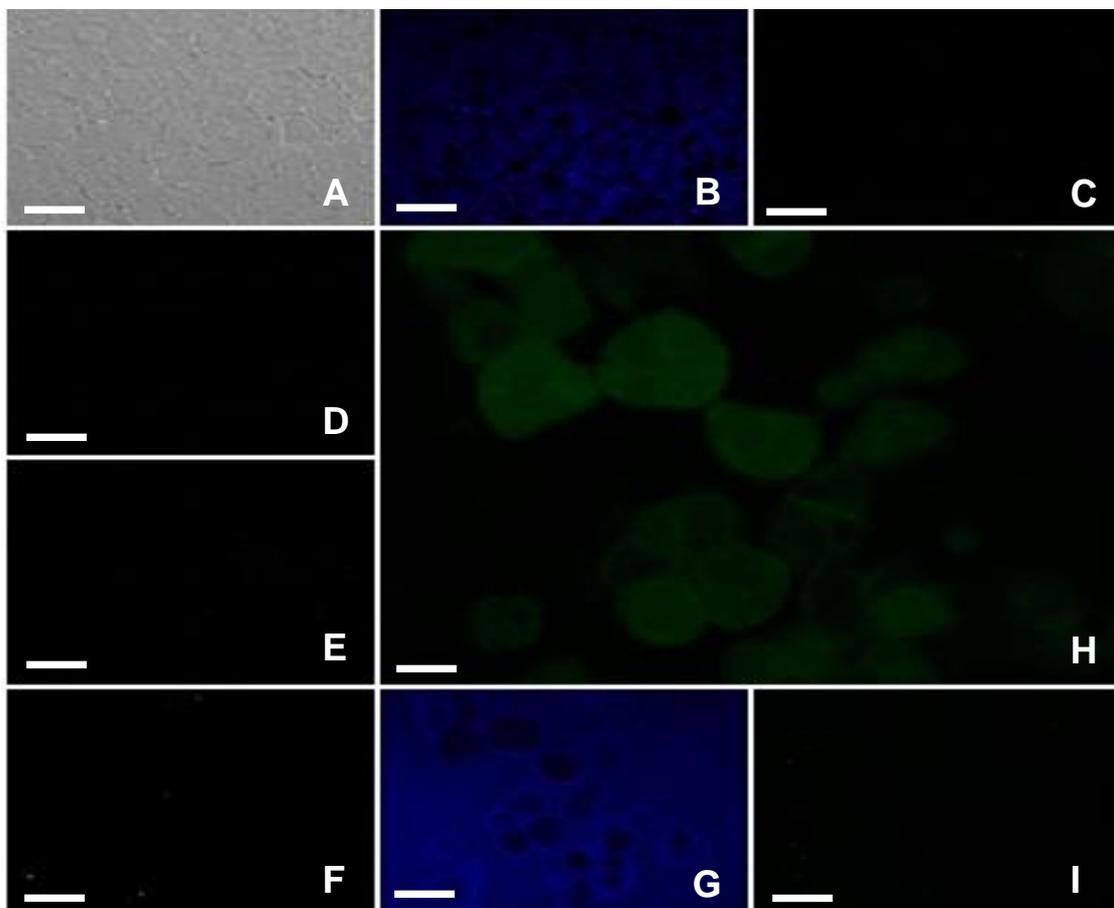


Foi analisado o padrão de localização nuclear do DNA metilado por ensaios de imunofluorescência com anticorpos anti-5-metil-desoxicitidina (5mdC), em amostras com 180 dias. A análise confocal dos ensaios de imunofluorescência de 5mdC mostrou sinais específicos sobre os núcleos com diferentes padrões de distribuição e intensidade, dependendo do tipo de célula.

As linhagens L20.1, L20.2, L40.1 e L40.3 apresentaram baixo sinal de imunofluorescência 5mdC (Figura 10D, Figura 10E, Figura 10F, Figura 10 I), com uma fluorescência na frequência de 0,037; 0,058; 0,171 e 0,085, respectivamente (Figura 11). Foi observado sinais de imunofluorescência de 5mdc de baixa intensidade sobre a maioria de seus núcleos, com alguns pontos pequenos e brilhantes.

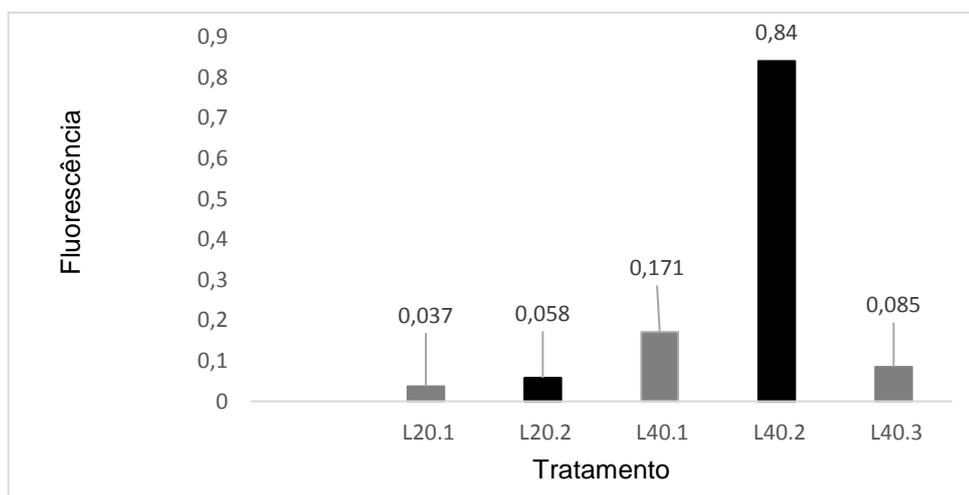
Em contraste, o sinal de 5mdc nos núcleos e citoplasma das células embriogênicas da linhagem L40.2 era muito mais alto em todas as células (Figura 11), com um padrão de distribuição de numerosas manchas intensamente fluorescentes que formavam um retículo espesso em toda a área do núcleo (Figura 10H). Controles omitindo a ausência do primeiro anticorpo não forneceu nenhum sinal.

**Figura 10:** Localização in situ de 5mdC (DNA metilado) durante os estágios iniciais da indução da embriogênese somática, aos 180 dias.



**Legenda:** Controle por imunodepleção com anticorpo pré-bloqueado; campo claro (A), DAPI para núcleos em azul (B) e imagem confocal do sinal de imunofluorescência 5mdc em sinal verde (C). Imagens confocais do sinal de imunofluorescência 5mdc em imagens de contraste verde das linhagens L20.1(D), L20.2 (E), L40.1 (F), L40.2 (H), L40.3 (I). A marcação com DAPI para os núcleos e paredes em azul da linhagem L40.2 (G). As barras representam 20  $\mu$ m.

**Figura 11:** Intensidade de fluorescência com anticorpos específicos anti-5mdC durante a indução da embriogênese somática em calos de *Eucalyptus grandis*



## DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato sobre os estudos de acumulação de auxina endógenas e alterações globais na metilação do DNA em *Eucalyptus grandis*, durante a iniciação da embriogênese somática. Embora tenha sido relatado em outras espécies lenhosas como *Araucaria angustifolia* (Bertol.) (FRAGA et al., 2016) e *Quercus alba* (CORREDOIRA et al., 2017), essas informações são pioneiras para a espécie de eucalipto. Os resultados são de particular relevância, uma vez que foram obtidos em uma espécie lenhosa, extremamente recalcitrante à embriogênese *in vitro*.

Foi utilizado a auxina Picloram foi necessário para a indução de embriogênese somática em *E. grandis*, com o objetivo de estimular seu duplo papel durante a iniciação da embriogênese somática, funcionando como um sinalizador de auxina ou sendo um componente de estresse que também altera o conteúdo endógeno das auxinas (FEHÉR, 2006; JIMÉNEZ, 2005).

A resposta embriogênica do *E. grandis* foi estimulada em meio de indução contendo 20µM e 40µM de Picloram. Essa auxina também foi utilizada para a indução de embriões somáticos em eucalipto utilizando regiões cotiledonares de embriões zigóticos cultivados em meio contendo 50 µM de Picloram ou 100 µM de ácido indolbutírico. No entanto a resposta embriogênica ocorreu em uma frequência muito baixa (1,3%). Em outro trabalho, quando se utilizou dosagens menores de Picloram (40 µM) foi observado uma indução mais satisfatória (68%) da embriogênese somática em *E. globulus* (CORREDOIRA et al., 2015).

A presença de uma camada de revestimento de mucilagem ao redor das estruturas de eucalipto embriogênicas geradas em meio contendo 40 µM de Picloram apresenta grande relevância, já que essa camada de mucilagem não foi observada quando culturas embriogênicas foram induzidas em meio contendo 10 e 20 µM de Picloram, nem foi observado em culturas embriogênicas de *E. globulus* oriunda de embrião zigótico (PINTO et al. 2008, 2002). No entanto, Bandyopadhyay e Hamill (2000) observaram que os embriões somáticos de *E. nitens* pareciam completamente envolvidos em um revestimento fino, estratificado e translúcido que não aparentava ser celular por natureza.

Da mesma forma, o revestimento mucilaginoso, composto que apresenta um papel protetor e nutritivo, é sugerido para o revestimento em torno de estruturas

embriogênicas produzidas nas culturas de eucalipto em meio suplementado com Picloram 40  $\mu\text{M}$  (PINTO et al., 2008, 2002).

Os resultados revelaram mudanças específicas na acumulação endógena de auxinas e metilação global do DNA, em calos de eucalipto induzidos pela ação da auxina Picloram. Apesar de alguns relatos prévios de rearranjos celulares associados à progressão da embriogênese *in vitro* em espécies herbáceas (FEHER, 2015; SMERTENKO; BOZHKOVA, 2014; EL-TANTAWY et al., 2013; TESTILLANO; RISUENÃO, 2009; FORTES et al., 2002), são escassas informações sobre plantas lenhosas (RAMÍREZ et al., 2004, 2003; RODRIGUEZ-SANZ et al., 2015)

Os ensaios de imunofluorescência de auxina mostraram o acúmulo de auxina endógena em células embriogênicas após a indução (Figura 5). O funcionamento das auxinas depende da sua distribuição diferencial nos tecidos vegetais, que é regulada essencialmente pela sua biossíntese local e seu transporte diferencial entre as células (PETRASEK; FRIML, 2009). O equilíbrio entre o estresse e o transporte leva as maiores concentrações de auxina para determinadas regiões da planta, como meristemas apicais, meristemas radiculares e locais de iniciação de raízes laterais (PRASAD; DHONUKSHE, 2013).

Estudos recentes em embriogênese somática do microsporo de *B. napus* mostraram presença de acumulação de auxina nas células embrionárias desde os estágios iniciais. Foi proposto que a biossíntese de auxinas foi ativada com a reprogramação de micrósporos e iniciação da embriogênese (RODRIGUEZ-SANZ et al., 2015; PREM et al., 2012). Em estudos com *Arabidopsis*, a sinalização de auxina foi detectada em células embrionárias, entre o estágio de duas e oito células (ROBERT et al., 2013; MOLLER; WEIJERS, 2009). Os presentes resultados sobre o acúmulo de auxina durante a indução de embriogênese somática são consistentes com a distribuição da sinalização de auxina durante a embriogênese zigótica (RADEMACHER et al., 2012), embriogênese do micrósporo (RODRIGUEZ-SANZ et al., 2015, 2014; PREM et al., 2012) e embriogênese foliar (CORREDOIRA et al., 2017). Eles também indicam que tanto a embriogênese somática quanto a embriogênese dos micrósporos seguem um padrão similar ao da embriogênese zigótica.

A biossíntese da auxina está diretamente relacionada a divisão celular e tecidos em desenvolvimento. Pesquisas mostraram que a ausência de auxina causa perda celular em células de suspensão e cultura de tecidos de diversas espécies

(ADAMOWSKI; FRIML, 2015; SCHALLER et al., 2015; CHEN et al., 2014; PERROT-RECHENMANN, 2010; HIMANEN et al., 2002). As células embriogênicas, são células totipotentes, que podem adquirir uma nova reprogramação celular e iniciar a embriogênese, que é uma via de desenvolvimento que começa com a proliferação celular. Portanto, o presente estudo mostrando acúmulo diferencial de auxina em células embriogênicas indicam que a biossíntese de auxinas endógenas pode estar envolvida na ativação da proliferação celular, como um dos eventos iniciais após a mudança do programa embriogênico.

A aquisição da totipotência celular através da diferenciação de células vegetais é acompanhada pela remodelação de programas de expressão gênica que certamente envolve reorganização em larga escala da cromatina (TESSADORI et al., 2007). Os padrões de nível e distribuição da metilação do DNA mudam durante a diferenciação e proliferação de células vegetais, assim como outras marcas epigenéticas. Mudanças na metilação global do DNA foram descritas na regulação de programas globais de expressão gênica (KOHLENER; VILLAR, 2008).

O presente estudo mostrou padrões de distribuição de metilação do DNA durante a indução da embriogênese somática em *E. grandis*, sendo possível observar que os resultados de imunofluorescência de 5mdC revelaram um aumento na metilação global do DNA nas células embriogênicas.

Alguns relatos em espécies de árvores mostraram que altos níveis de metilação do DNA estavam associados a capacidades morfogênicas e embriogênicas (NIC-CAN et al., 2015). Em *Daucus carota*, uma hipermetilação transitória do DNA foi encontrada durante a indução de embriogênese somática (LOSCHIAVO et al., 1989). Nos estágios iniciais da embriogênese em *Cucurbita pepo*, um aumento na metilação do DNA também foi relatado (LELJAK-LEVANIĆ et al., 2016)

Os resultados aqui apresentados são consistentes com esses relatos e revelaram pela primeira vez em *E. grandis* que a metilação do DNA é induzida com o início da embriogênese somática, também ilustrando que a reprogramação epigenética acompanha a mudança de desenvolvimento do programa de células de calos.

## CONCLUSÃO

Os dois fatores aqui relatados – acúmulo de auxina e hipermetilação do DNA – foram especificamente encontrados em células embriogênicas. No presente relato, essas duas características foram identificadas pela primeira vez durante a indução de embriogênese em calos de *E. grandis* e podem ser usados como marcadores precoces de células com potencial embriogênico.

## REFERÊNCIAS

- ADAMOWSKI, M., FRIML, J. **PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution.** *Plant Cell* 27, 20–32, 2015.
- BÁRÁNY, I., GONZÁLEZ-MELENDI, P., FADÓN, B., MITYKO, J., RISUEÑO, M. C., TESTILLANO, P. S. **Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development.** *Biol. Cell* 97, 709–722, 2005.
- BROOKER, M., SLEE, A. V., CONNORS, J. R., DUFFY, S. M. **EUCLID Eucalypts of Australia.** 3rd edn. Centre for Plant Biodiversity Research. CSIRO Publishing, Melbourne, 2014.
- CHEN, J., LAUSSER, A., DRESSELHAUS, T. **Hormonal responses during early embryogenesis in maize.** *Biochem. Soc. Trans.* 42 (2), 325–331, 2014.
- COCHRANE, A.; COCHRANE, A. **Modelling seed germination response to temperature in *Eucalyptus* L' Her . ( Myrtaceae ) species in the context of global warming.** p. 99–109, 2017.
- CORREDOIRA, E. et al. **Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees.** p. 678–690, 2015.
- CORREDOIRA, E. et al. **Initiation of leaf somatic embryogenesis involves high pectin esterification, auxin accumulation and DNA demethylation in *Quercus alba*.** *Journal of Plant Physiology*, v. 213, p. 42–54, 2017.
- EL-TANTAWY, A.A., SOLIS, M.T., RISUENO, M.C., TESTILLANO, P.S. **Changes in DNA methylation levels and nuclear distribution patterns after microspore reprogramming to embryogenesis in barley.** *Cytogenet. Genome Res.* 143: 200–208, 2014.
- FEHÉR, A. **Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujib A, Samaj J (eds) Plant cell monographs.** Vol. 2. Somatic embryogenesis. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 85–101, 2006.
- FEHÉR, A. **Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate.** *BBA Gene Regul. Mech.* 1849, 385–402, 2015.
- FORESTAN, C., MEDA, S., VAROTTO, S. **ZmPIN1-mediated auxin transport is**

**related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development.** *Plant Phys.* 152 (3), 1373–1390, 2010.

FORTES, A.M., TESTILLANO, P.S., RISUEÑO, M.D., PAIS, M.S. **Studies on callose and cutin during the expression of competence and determination for organogenic nodule formation from internodes of *Humulus lupulus* var. Nugget.** *Physiol. Plant.* 116, 2002.

FRAGA, H. P. F. et al. **DNA methylation and proteome profiles of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures as affected by plant growth regulators supplementation.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 125, n. 2, p. 353–374, 2016.

GERMÁNÁ, M.A., LAMBARDI, M. **In vitro embryogenesis in higher plants.** *Methods in Molecular Biology series*, Vol. 1359. Springer Protocols, Humana Press, p. 1359, 2016.

GRONES, P., FRIML, J. **Auxin transporters and binding proteins at a glance.** *Journal of Cell Science*, v. 128, n. 1, p. 1–7, 2015.

HIMANEN, K., BOUCHERON, E., VANNESTE, S., ALMEIDA E, J., INZE, D., BEECKMAN, T. **Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation.** *Plant Cell* 14 (10), 2339–2351, 2002.

JIMENEZ, V.M. **Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis.** *Plant Growth Regulation*, 47:91–110, 2005.

KASK, P., PALO, k., ULLMANN, D., GALL, K. **Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology.** vol. 96 u no. 24, 1999.

KOHLER, C., VILLAR, C.B. **Programming of gene expression by Polycomb group proteins.** *Trends Cell Biol.* 18 (5), 236–243, 2008.

LABATE, C. A., ASSIS, T. F., ODA, S. *Eucalyptus*. In: Kole CH, Hall TC (eds) **Compendium of transgenic crop plants: transgenic forest trees species.** Blackwell Publishing, Oxford, pp 35–108, 2008.

LELJAK-LEVANIĆ, D. et al. **Hormonal and epigenetic regulation during embryogenic tissue habituation in *Cucurbita pepo* L.** *Plant Cell Reports*, v. 35, n. 1, p. 77–89, 2016.

LOSCHIAVO, F. et al. **DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs.** *Theoretical and Applied Genetics*, v. 77, n. 3, p. 325–331, 1989.

MOCKAITIS, K., ESTELLE, M. **Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm.** *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 55–80, 2008.

MOLLER, B., WEIJERS, D. **Auxin control of embryo patterning.** *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 1 (5), a001545, 2009.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** *Physiol. Plant.* 15 (3), 473–497, 1962.

NAKHOODA, M.; MANDIRI, E. **Using synergistic exogenous phytohormones to**

enhance somatic embryogenesis from leaf explants of a *Eucalyptus*. n. May, 2016.

NIC-CAN, G. I. et al. **Somatic Embryogenesis : Identified Factors that Lead to Embryogenic Repression** . A Case of Species of the Same Genus. p. 1–21, 2015.

PERROT-RECHENMANN, C. **Cellular responses to auxin: division versus expansion**. Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 2 (5), a001446, 2010.

PETRASEK, J., FRIML, J. **Auxin transport routes in plant development**. Development 136 (16), 2675–2688, 2009.

PINTO, G., SANTOS, C., NEVES, L., ARAÚJO, C. **Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill.** Plant Cell Rep 21:208–213, 2002.

PINTO, G. et al. **Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.** Plant Cell Reports, v. 27, n. 6, p. 1093–1101, 2008.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. **Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*.** p. 13–20, 2010.

PRASAD, K., DHONUKSHE, P. **Polar auxin transport: cell polarity to patterning**. In: Chen, R., Baluska, F. (Eds.), Polar Auxin Transport, Signalling and Communication in Plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 25–44, 2013.

PREM, D., SOLÍS, M.T., BÁRÁNY, I., RODRÍGUEZ-SÁNS, H., RISUEÑO, M.C., TESTILLANO, P.S. **A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in *Brassica napus*.** BMC Plant Biol. 12, 127, 2012.

RAGHAVAN, V. **Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D.** Am. J. Bot. 91 (11), 1743–1756, 2004.

RAMAWAT, K. G., MÉRILLON, J. M., AHUJA, M. R. **Tree biotechnology**. CRC Press, Boca Raton, FL, 2014.

RAMÍREZ, C., CHIANCONE, B., TESTILLANO, P.S., GARCÍA-FOJEDA, B., GERMÁNÁ, M.A., RISUEÑO, M.C. **First embryogenic stages of citrus microspore-derived embryos.** Acta Biol. Cracov Ser. Bot. 45 (1), 53–58, 2003.

RAMÍREZ, C., TESTILLANO, P.S., PINTOS, B., MORENO-RISUEÑO, M.A., BUENO, M.A., RISUEÑO, M.C. **Changes in pectins and MAPKs related to cell development during early microspore embryogenesis in *Quercus suber* L.** Eur. J. Cell Biol. 83 (5), 213–225, 2004.

ROBERT, H.S., GRONES, P., STEPANOVA, A.N., ROBLES, L.M., LOKERSE, A.S., ALONSO, J.M., WEIJERS, D., FRIML, J. **Local auxin sources orient the apical-basal axis in *Arabidopsis* embryos.** Curr. Biol. 23 (24), 2506–2512, 2013.

RODRÍGUEZ-SANZ, H., MORENO-ROMERO, J., SOLIS, M.T., KOHLER, C., RISUENO, M.C., TESTILLANO. **Changes in histone methylation and acetylation**

**during microspore reprogramming to embryogenesis occur concomitantly with BnHKMT and BnHAT expression and are associated with cell totipotency, proliferation, and differentiation in Brassica napus.** Cytogenet. Genome Res. 143: 209–218, 2014.

RODRÍGUEZ-SANZ, H. et al. **Auxin biosynthesis, accumulation, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in Brassica napus.** Plant and Cell Physiology, v. 56, n. 7, p.1401–1417, 2015.

SCHALLER, G.E., BISHOPP, A., KIEBER, J.J. **The Yin-Yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development.** Plant Cell 27, 44–63, 2015.

SCHLICHT, M., STRNAD, M., SCANLON, M.J., MANCUSO, S., HOCHHOLDINGER, F., PALME, K., VOLKMAN, D., MENZEL, D., BALUSKA, F. **Auxin immunolocalization implicates vesicular neurotransmitter-like mode of polar auxin transport in root apices.** Plant Signal. Behav. 1 (3), 122–133, 2006.

SMERTENKO, A., BOZHKO, P.V. **Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning.** J. Exp. Bot. 65 (5), 1343–1360, 2014.

TESSADORI, F., SCHULKES, R.K., VAN DRIEL, R., FRANZ, P. **Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in Arabidopsis.** Plant J. 50 (5), 848–857, 2007.