

Cláudia Marinho

CARATERIZAÇÃO FUNCIONAL DE METILTRANSFERASES DE TRNA/RRNA DA
FAMÍLIA SPOU EM ARABIDOPSIS THALIANA (L.) HEYHN

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cláudia Daniela Soares Marinho

**CARATERIZAÇÃO FUNCIONAL DE METILTRANSFERASES
DE TRNA/RRNA DA FAMÍLIA SPOU EM ARABIDOPSIS
THALIANA (L.) HEYHN**

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal
orientada pela Doutora Sandra Isabel Marques Correia e pelo Professor Doutor
Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e apresentada ao Departamento de Ciências da
Vida da Universidade de Coimbra

Julho de 2022

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Ciências da Vida

Caraterização funcional de metiltransferases de tRNA/rRNA da família SpoU em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn.

Cláudia Daniela Soares Marinho

Dissertação de mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, sob orientação da Doutora Sandra Isabel Marques Correia e do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia / Departamento de Ciências da Vida.

Julho 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Abstract

Somatic embryogenesis is a micropropagation technique used for plant cloning, but it is also an important system to study embryo development. NEP-TC (Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus, GenBank accession number JQ766254) is a protein belonging to the SpoU family of tRNA/rRNA methyltransferases and previous studies have suggested that it may be involved in the inhibition of somatic embryogenesis in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.), since it has been only found in non-embryogenic cells.

Functional characterization of NEP-TC is an important step to better understand the role of this protein in somatic embryogenesis induction in tamarillo as well as in plant development. However, the lack of genetic and bioinformatic resources for non-model plants makes this task difficult. As an alternative, in the present study, the plant model *Arabidopsis thaliana* was used once that phylogenetic studies have revealed the existence of a NEP-TC's ortholog in *Arabidopsis* as well as other genes belonging to the SpoU family.

Three genes encoding SpoU methyltransferases in *Arabidopsis* were selected for functional characterization, by comparing different T-DNA insertion lines (obtained from Salk Institute Genomic Analysis Laboratory) with wild-type Columbia-0 ecotype. Having into account that genetic redundancy is very common in plant genes families and in order to better characterize SpoU family in *Arabidopsis thaliana*, crossings between single mutant lines were performed and a double mutant was obtained.

Regarding plant development, germination rate, plant growth rate and root and silique development were analyzed. The response of immature seeds to somatic embryogenesis induction was also evaluated.

The obtained results suggest that SpoU methyltransferases in *Arabidopsis* may play a role in plant development, namely, in plant growth rate and root development, but also in somatic embryogenesis induction. However, the results presented here for somatic embryogenesis induction do not sustain this hypothesis that NEP-TC may act as a somatic embryogenesis inhibitor, since the mutant lines revealed a lower rate of explants with somatic embryos formation.

More assays need to be done to confirm these results, namely through the obtention of a triple mutant for the genes studied here, but also through the study of tamarillo knock-out lines for *NEP-TC*, that can be obtained using genome editing techniques such as CRISPR.

Keywords

2'-O-methylation, *Arabidopsis thaliana*, NEP-TC, plant development, phenotype, reverse genetics, somatic embryogenesis, SpoU family, tRNA/rRNA methyltransferases

Resumo

A embriogênese somática não é apenas um método de micropropagação, mas também uma ferramenta crucial para o estudo do desenvolvimento embrionário. NEP-TC (Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus, número de acesso GenBank JQ766254) é uma proteína pertencente à família SpoU de metiltransferases de tRNA/rRNA e estudos prévios sugerem o seu envolvimento na fase de indução de embriogênese somática em tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.), já que apenas se encontra em células não-embriogênicas.

A caracterização funcional da NEP-TC é importante para a compreensão do papel desta proteína na indução de embriogênese somática em tamarilho, assim como no desenvolvimento vegetal. Todavia, esta tarefa é dificultada pela falta de ferramentas genéticas e bioinformáticas para plantas não-modelo. Em alternativa, neste trabalho, usou-se a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, já que estudos filogenéticos revelaram a existência de uma proteína ortóloga à NEP-TC em *Arabidopsis*, assim como outros genes pertencentes à família SpoU.

Três genes codificantes de proteínas SpoU em *Arabidopsis* foram selecionados para caracterização funcional, comparando diferentes linhas com inserções de T-DNA (obtidas através do Salk Institute Genomic Analysis Laboratory) e o ecótipo *wild-type* Columbia-0. Tendo em conta que a redundância genética é bastante comum dentro das famílias de genes das plantas e, afim de melhor caracterizar a família SpoU em *A. thaliana*, fizeram-se cruzamentos entre as linhas mutantes simples e foi obtido um duplo mutante.

Relativamente ao desenvolvimento vegetal, avaliou-se a taxa de germinação, taxa de desenvolvimento, desenvolvimento radicular e desenvolvimento das siliquas. A resposta de sementes imaturas à indução de embriogênese somática foi também avaliada.

Os resultados obtidos sugerem um envolvimento da família SpoU de metiltransferases de tRNA/rRNA no desenvolvimento vegetal, particularmente na taxa de desenvolvimento e no desenvolvimento radicular, assim como na resposta à indução de embriogênese somática. No entanto, os resultados aqui apresentados não sustentam a hipótese de que a proteína NEP-TC poderá atuar como inibidora da embriogênese somática, dado que as linhas mutantes revelaram uma menor taxa de explantes com formação de embriões somáticos.

Ensaio mais profundos são necessários para confirmar os resultados obtidos, nomeadamente através da obtenção de um triplo mutante para os genes aqui estudados, mas também através do estudo de linhas de tamarilho *knock-out* para o gene *NEP-TC*, que poderão ser obtidas através de técnicas de edição genética como a CRISPR.

Palavras-Chave

2'-O-metilação, *Arabidopsis thaliana*, desenvolvimento vegetal, embriogênese somática, família SpoU, fenótipo, genética reversa, metiltransferases de tRNA/rRNA, NEP-TC

Conteúdo

Abreviaturas e acrónimos	ix
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xiv
1 Introdução	1
1.1 Contextualização do trabalho	1
1.2 <i>Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus</i>	2
1.2.1 Filogenia da NEP-TC	2
1.2.2 Expressão da NEP-TC durante a indução de ES em tamarilho	4
1.2.3 Localização celular da NEP-TC	5
1.2.4 Especificidade enzimática da NEP-TC	5
1.2.5 Fenótipo de linhas de tamarilho com subexpressão do <i>NEP-TC</i>	6
1.3 Família SpoU	7
1.4 Metiltransferases de tRNA/rRNA	9
1.5 Modificações do tRNA/rRNA	10
1.5.1 2'-O-metilação	11
1.6 Embriogénese somática	12
1.7 <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo	14
1.8 Motivação	16
1.9 Objetivos	16
2 Materiais e Métodos	19
2.1 Material biológico	19
2.2 Germinação e condições de crescimento	20
2.3 Seleção de plantas homozigóticas para a inserção T-DNA	20
2.3.1 Extração de DNA	20
2.3.2 PCR	21
2.3.3 Eletroforese	21
2.4 Polinização controlada	22
2.5 Cultura <i>in vitro</i> de grãos de pólen	23
2.6 Crescimento <i>in vivo</i> do tubo polínico	23

2.7	Análise do desenvolvimento	24
2.7.1	Taxa de germinação	24
2.7.2	Taxa de desenvolvimento	24
2.7.3	Desenvolvimento radicular	25
2.7.4	Desenvolvimento das siliquis	25
2.8	Indução de embriogénese somática	25
3	Resultados	27
3.1	Seleção de linhas mutantes homozigóticas para a inserção de T-DNA e de duplos mutantes	27
3.2	Viabilidade do pólen e crescimento do tubo polínico	28
3.3	Análise do desenvolvimento	30
3.3.1	Taxa de germinação	30
3.3.2	Taxa de desenvolvimento	31
3.3.3	Desenvolvimento radicular	33
3.3.4	Desenvolvimento das siliquis	35
3.4	Resposta à indução de embriogénese somática	37
4	Discussão	39
4.1	Desenvolvimento do tubo polínico em linhas mutantes para o gene <i>AT4G15520</i>	39
4.2	Envolvimento das SpoU metiltransferases no desenvolvimento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
4.3	Papel das SpoU metiltransferases na embriogénese somática de <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
5	Conclusão	45
5.1	Perspetivas futuras	46
	Referências	46

Abreviaturas e acrónimos

Ψ pseudouridina

C_2H_5OH etanol

CH_3COOH ácido acético

$Ca(ClO)_2$ hipoclorito de cálcio

$CaCl_2$ cloreto de cálcio

H_3BO_3 ácido bórico

K_3PO_4 fosfato de potássio

KNO_3 nitrato de potássio

m^1G metilação do azoto 1 da guanosina

ABI3 *ABAINSENSITIVE 3*

AGL15 *AGAMOUS-LIKE15*

BBM *BABY BOOM*

FUS3 *FUSCA3*

LEC1 *LEAFY COTYLEDON1*

LEC2 *LEAFY COTYLEDON2*

NEP-TC gene codificante da NEP-TC

2,4-D ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ABRC Arabidopsis Biological Resource Center

AdoHcy S-adenosil-homocisteína

AdoMet S-adenosilmetionina

aTrm56 tRNA(cytidine(56)-2'-O)-methyltransferase

B5 meio de cultura de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968)

CE calo embriogénico

Cm56 2'-O-metilação da citosina na posição 56

CNE calo não-embriogénico

Col-0 Columbia

ES embriogénese somática

Gm18 2'-O-metilação da guanosina na posição 18

Gm2270 2'-O-metilação da guanosina na posição 2270

LBa1 *primer* esquerdo da inserção de T-DNA

LP *primer* esquerdo

mRNA RNA mensageiro

MS meio de cultura Murashige e Skoog (1962)

MTA mRNA adenosine methylase

NaOH hidróxido de sódio

NASC Nottingham Arabidopsis Stock Centre

NEP-TC Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus

Nm 2'-O-metilação

ORF *open reading frame*

PCR *polymerase chain reaction*

Pet56 Mitochondrial large ribosomal RNA ribose methylase

RFM *Rossmann-fold* metiltransferases

RP *primer* direito

rpm rotações por minuto

rRNA ácido ribonucleico ribossomal

RT-qPCR PCR quantitativo em tempo real

SFM1 SPOUT family methyltransferase 1

snoRNA *small nucleolar* RNA

snoRNP *small nucleolar* ribonucleoproteína

T-DNA DNA de transferência

TAIR The Arabidopsis Information Resource

TRM4B tRNA-specific methyltransferase 4B

TRM5A tRNA methyltransferase 5A

TrmFO Methylenetetrahydrofolate-tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase

TrmH tRNA (guanosine(18)-2'-O)-methyltransferase

tRNA ácido ribonucleico de transferência

Tsr Thiostrepton-resistance methylase

UTR *untranslated region*

WT *wild-type*

Lista de Figuras

1.1	Árvore filogenética da NEP-TC	2
1.2	Alinhamento das regiões conservadas da NEP-TC e de proteínas homólogas das famílias Solanaceae e Brassicaceae	3
1.3	Previsão da estrutura da NEP-TC	4
1.4	Indução de ES em folhas jovens de tamarilho	4
1.5	<i>Western blot</i> de proteínas extraídas de amostras induzidas, CEs e CNEs	4
1.6	Localização celular da NEP-TC em NEC e em CE	5
1.7	Fenótipo de linhas de tamarilho com subexpressão do <i>NEP-TC</i>	6
1.8	Representação da estrutura das proteínas da família SpoU	8
1.9	Motivos conservados nas proteínas da família SpoU	8
1.10	Reações de metilação catalisadas por metiltransferases	9
1.11	Representação química da metilação da ribose	11
1.12	Embriogênese somática direta e indireta	12
1.13	Eventos morfológicos que ocorrem durante o processo de embriogênese somática	13
1.14	Ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
2.1	Representação esquemática dos genes <i>AT4G15520</i> , <i>AT4G17610</i> e <i>AT5G15390</i> e local de inserção do T-DNA nas linhas mutantes	19
2.2	Emasculação	22
2.3	Polinização	22
3.1	Identificação de linhas mutantes homozigóticas	27
3.2	Identificação de linhas duplo mutantes	28
3.3	Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen da linha mutante NEPA de <i>A. thaliana</i>	29
3.4	Crescimento <i>in vivo</i> dos tubos polínicos em cruzamentos com a linha mutante NEPA	29
3.5	Taxa de germinação de sementes de <i>A. thaliana</i> mutantes para genes da família SpoU	31
3.6	Estádios de desenvolvimento de <i>A. thaliana</i>	32
3.7	Taxa de desenvolvimento de linhas mutantes para genes da família SpoU de <i>A. thaliana</i> para a fase <i>in vitro</i> e para a fase <i>ex vitro</i>	32

3.8	Análise do desenvolvimento radicular de linhas mutantes para genes da família SpoU de <i>A. thaliana</i>	33
3.9	Correlação entre o comprimento da raiz principal e o número de raízes laterais de linhas mutantes para genes da família SpoU de <i>A. thaliana</i>	34
3.10	Pelos radiculares de linhas mutantes para genes da família SpoU de <i>A. thaliana</i>	35
3.11	Síliqua	35
3.12	Análise do desenvolvimento de síliquis de linhas mutantes para genes da família SpoU de <i>A. thaliana</i>	36
3.13	Correlação entre os diferentes parâmetros de análise do desenvolvimento das síliquis de linhas mutantes para genes da família SpoU de <i>A. thaliana</i>	36
3.14	Tipos de resposta à indução de ES em sementes imaturas de linhas mutantes para genes da família SpoU de <i>A. thaliana</i>	37
3.15	Resposta das linhas mutantes para genes da família SpoU de <i>A. thaliana</i> à indução de ES	38

Lista de Tabelas

1.1	Atividade específica da NEP-TC na presença de diferentes substratos	6
2.1	<i>Primers</i> utilizados na genotipagem das linhas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2.2	Parâmetros do programa PCR utilizado para a genotipagem das linhas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2.3	Estádios de desenvolvimento de <i>A. thaliana</i>	25

Capítulo 1

Introdução

1.1 Contextualização do trabalho

A embriogénese somática (ES) é uma técnica de micropropagação *in vitro* que tem sido um importante alvo de estudo no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ecologia Funcional, da Universidade de Coimbra, particularmente em *Solanum betaceum* Cav. (tamarilho), pelo que existem, atualmente, protocolos de indução de ES bem estabelecidos para esta espécie (Correia e Canhoto, 2012). No entanto, apesar de já se conhecerem bastantes marcadores moleculares relacionados com a competência embriogénica das células, os mecanismos moleculares que permitem a transição de células somáticas em células totipotentes são ainda uma incógnita (Su *et al.*, 2021).

Com o objetivo de perceber quais os mecanismos moleculares que estão na base da aquisição de competência embriogénica, fizeram-se estudos comparativos de proteómica em que se identificaram e quantificaram proteínas expressas diferencialmente em calo embriogénico (CE) e calo não-embriogénico (CNE) durante a ES de tamarilho. Os resultados apontaram para um aumento do metabolismo celular e muitas das proteínas identificadas estavam relacionadas com o stresse (Correia *et al.*, 2012). Foi, no entanto, encontrada uma proteína expressa consistentemente em CNEs e ausente em CEs que não foi possível identificar através das bases de dados utilizadas. Essa proteína foi, posteriormente, isolada, sequenciada e identificada como uma possível metiltransferase de ácido ribonucleico ribossomal (rRNA). Designada Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus (NEP-TC) (número de acesso no *GenBank* JQ766254), a proteína possui 26.5 kDa e pensa-se que poderá ser um bom marcador molecular das células não embriogénicas do tamarilho (Correia *et al.*, 2019).

O facto da NEP-TC apenas ser expressa em células não embriogénicas, pode sugerir que esta tem um papel inibidor na aquisição de competência embriogénica. Assim, a sua caracterização funcional pode ser um passo importante na elucidação dos mecanismos moleculares desse processo.

Atualmente, a caracterização funcional de um gene é feita, sobretudo, através de técnicas da

genética reversa, que consiste na mutagênese do gene de interesse e posterior observação do fenótipo. A mutagênese é, normalmente, feita através da inserção do DNA de transferência (T-DNA), que além de impedir a expressão do gene em questão, funciona como marcador e, permitindo a identificação da mutação (Krysan *et al.*, 1999). A grande desvantagem deste método é que as mutações estão disponíveis para um número muito limitado de organismos. Assim, não sendo possível a caracterização funcional da NEP-TC em tamarilho, procurou-se perceber se seria possível fazê-lo utilizando a planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

1.2 Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus

A NEP-TC é uma proteína, presumivelmente uma metiltransferase de rRNA, de 221 aminoácidos (26.5 kDa), encontrada consistentemente em CNEs de tamarilho, derivados de diferentes explantes, e ausente em CEs. Assim, pensa-se que esta poderá ter um papel inibidor na ES, nomeadamente ao nível da aquisição de competência embriogénica (Correia *et al.*, 2019).

1.2.1 Filogenia da NEP-TC

Estudos de filogenia revelaram que a NEP-TC possui proteínas homólogas em espécies de diferentes grupos de plantas e algas, nomeadamente em clorófitas, briófitas, monocotiledóneas e dicotiledóneas. Curiosamente, não foram encontradas homólogas em pteriófitas nem em gimnospermas.

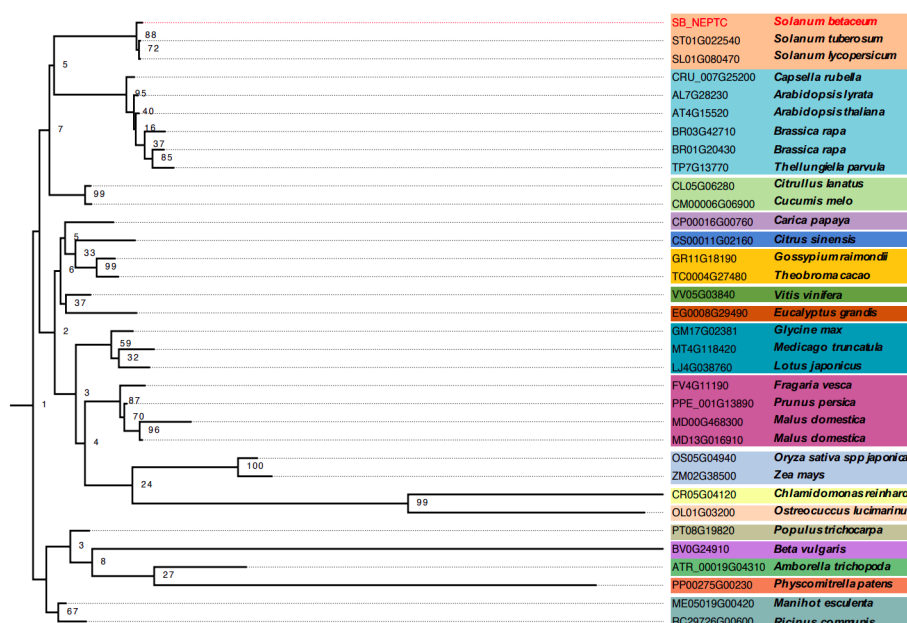


Figura 1.1: Árvore filogenética da NEP-TC (Correia *et al.*, 2019).

A árvore filogenética da NEP-TC, representada na figura 1.1, foi construída usando 34

espécies representativas dos principais grupos de espécies do clado Viridiplantae (Correia *et al.*, 2019).

As sequências das proteínas das espécies filogeneticamente mais próximas (espécies das famílias Solanaceae e Brassicaceae) da NEP-TC foram alinhadas e mostraram ter uma elevada percentagem de motivos conservados entre os resíduos 10 e 150, como se pode observar na figura 1.2, e onde foi identificado um domínio conservado presente nas metiltransferases de rRNA da família SpoU. Esta família de proteínas será abordada em maior detalhe na secção 1.3.

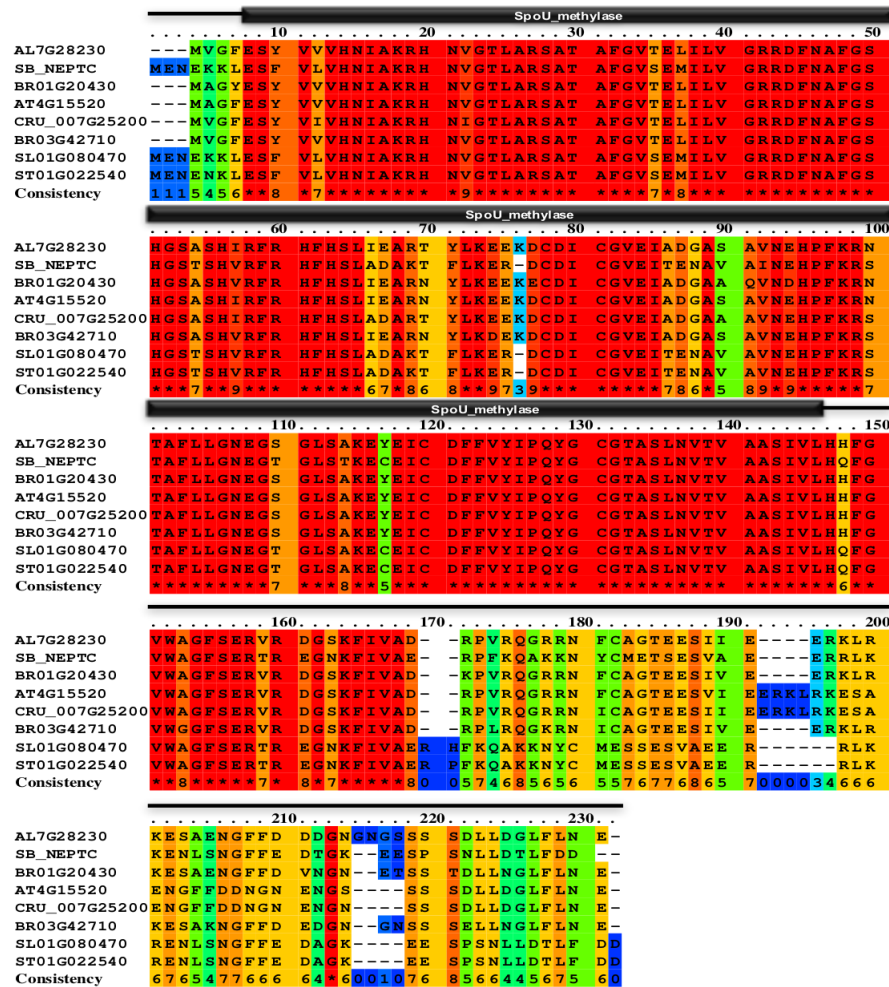


Figura 1.2: Alinhamento das regiões conservadas da NEP-TC e de proteínas homólogas das famílias Solanaceae e Brassicaceae (Correia *et al.*, 2019).

Para além do domínio conservado presente na NEP-TC que indica que esta poderá pertencer à família SpoU de metiltransferases de RNA, a sua estrutura terciária também sustenta esta hipótese. A proteína, cuja estrutura tridimensional se encontra representada na 1.3, apresenta uma estrutura globular que se caracteriza pela presença de um nó trifólio α/β , assim como o terminal amino da (guanina-N1)-metiltransferase de ácido ribonucleico de transferência (tRNA) que também está presente noutras proteínas SpoU (Correia *et al.*, 2019).

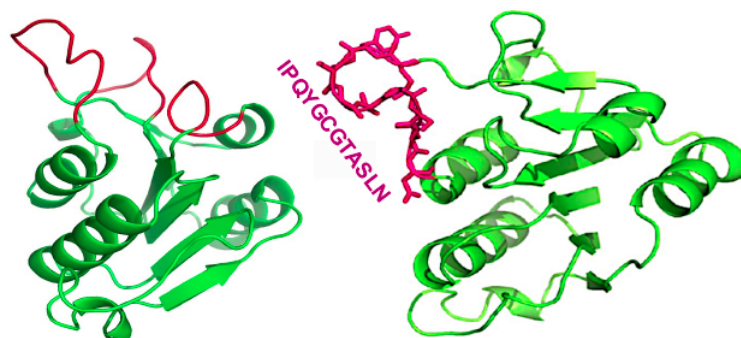


Figura 1.3: Previsão da estrutura da NEP-TC (Correia *et al.*, 2019).

1.2.2 Expressão da NEP-TC durante a indução de ES em tamarilho

Durante a indução de ES em tamarilho, representada na figura 1.4, os explantes como, por exemplo, folhas jovens, passam por um processo de desdiferenciação celular e formam dois tipos de calos: calos embriogênicos, que apresentam uma cor branca e uma textura mais compacta e calos não-embriogênicos, mais escuros e friáveis e com uma taxa de crescimento maior.

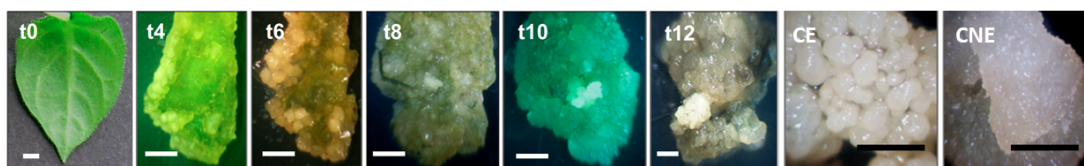


Figura 1.4: Indução de ES em folhas jovens de tamarilho. Folhas (semana t0) e folhas induzidas (semanas t4-t12) foram removidas do meio de indução a cada duas semanas, após 4 semanas em cultura para análise da expressão genética. CEs e CNEs foram obtidos após um período de indução de 12 semanas. (Correia *et al.*, 2019).

A análise da expressão da NEP-TC foi feita através da técnica do *western blot* e revelou que a expressão da proteína não é exclusiva dos CNEs, mas também está presente nas fases iniciais da indução de ES. Porém, a expressão da proteína tem tendência a diminuir à medida que as massas embriogênicas começam a aparecer, estando completamente ausente nos CEs, tal como mostra a figura 1.5.

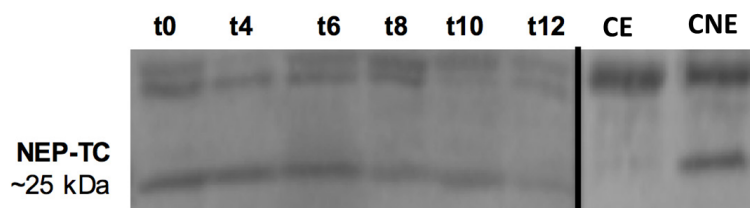


Figura 1.5: *Western blot* de proteínas extraídas de amostras induzidas, CEs e CNEs, na semana t0 e a cada duas semanas após a 4.^a semana em cultura (t4-t12) (Correia *et al.*, 2019).

Também foram feitas análises de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) para perceber os níveis de expressão genética do gene codificante da NEP-TC (*NEP-TC*). Os resultados confirmaram a presença de níveis elevados de transcritos do *NEP-TC* em CNEs. No entanto, apesar dos resultados obtidos para a expressão proteica, esta análise revelou que transcritos do *NEP-TC* também estão presentes em CEs, embora em menor quantidade do que nas últimas fases da indução e do que em CNEs (Correia *et al.*, 2019).

1.2.3 Localização celular da NEP-TC

Estudos feitos para determinar a localização celular da NEP-TC mostraram que esta se encontra sobretudo no citoplasma das células não embriogênicas, embora também possa aparecer no núcleo das mesmas (figura 1.6A). Como seria expectável, a sua presença não foi detetada em células embriogênicas (figura 1.6B). Também foi possível observar que a NEP-TC se encontra normalmente em aglomerados nas células não embriogênicas (figura 1.6C-E).

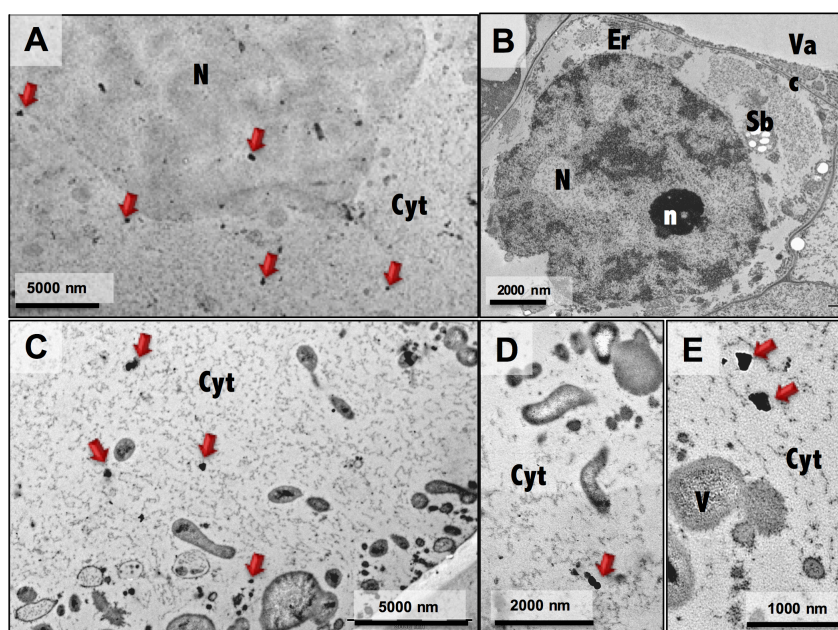


Figura 1.6: Localização celular da NEP-TC em CNE e em CE. (A) Vista geral de uma célula não embriogénica e (B) de células embriogénicas com as setas vermelhas a indicar a presença da NEP-TC; (C-E) Imagens mais detalhadas de células não embriogénicas com aglomerados da NEP-TC maioritariamente presentes no citoplasma. N, núcleo; n, nucléolo; CW, parede celular; Em, matriz extracelular; Cyt, citoplasma; Vac, vacúolo; M, mitocôndria; Sb, amido. (Correia *et al.*, 2019).

1.2.4 Especificidade enzimática da NEP-TC

A análise filogenética da NEP-TC, referida na secção 1.2.1, mostrou que esta poderia ser uma metiltransferase de rRNA. Para confirmar esta hipótese, foram realizados ensaios enzimáticos em que se usaram ribossomas isolados de CNE e rRNA extraído do RNA total

isolado dos mesmos tecidos. Os resultados são apresentados na tabela 1.1.

Tabela 1.1: Atividade específica da NEP-TC na presença de diferentes substratos. Adaptado de Correia *et al.* (2019)

Substrato	Concentração do substrato	Atividade específica
RNA total	238.80 µg/ml	0.0323 ± 0.0245
DNA total	222.14 µg/ml	.0000 ± 0.0228
rRNA	46.00 µg/ml	0.3370 ± 0.1520
Ribossomas	0.54 pmol/ml	0.0393 ± 0.0285

Os resultados dos ensaios enzimáticos permitiram eliminar o DNA como possível substrato uma vez que não se verificou atividade e permitiram também confirmar que a NEP-TC possui atividade de metiltransferase de rRNA (Correia *et al.*, 2019). Não obstante os resultados obtidos, a hipótese da NEP-TC ser simultaneamente uma metiltransferase de rRNA e de tRNA não pode ser eliminada, já que várias metiltransferases de rRNA apresentam essa dualidade, particularmente proteínas pertencentes à família SpoU (Ahn *et al.*, 2011).

1.2.5 Fenótipo de linhas de tamarilho com subexpressão do *NEP-TC*

Para avaliar o papel da NEP-TC na ES em tamarilho, foi feito um ensaio com 3 linhas distintas (TV1, TV2 e TV3) que apresentavam subexpressão do *NEP-TC*, em que se verificou uma redução de cerca de 85% da expressão dos transcritos, e cujos resultados foram comparados com uma linha controlo (TV).

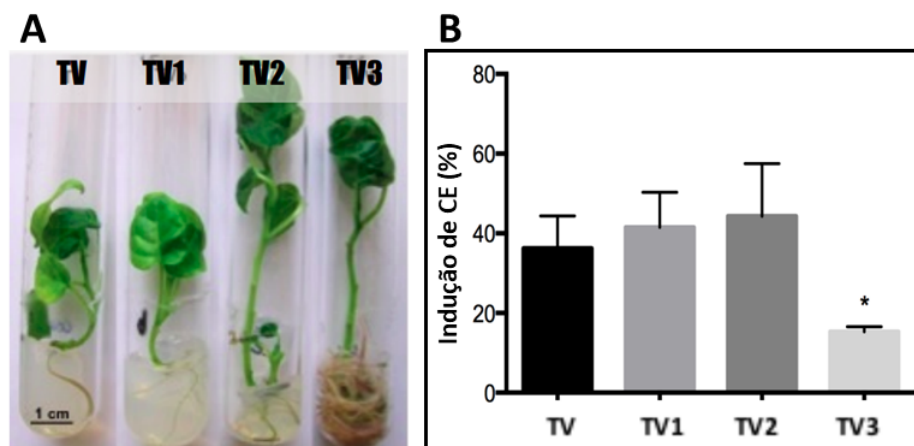


Figura 1.7: Fenótipo de linhas de tamarilho com subexpressão do *NEP-TC*. Ensaios realizados com 3 linhas transformadas (TV1, TV2 e TV3) e uma linha controlo (TV). (A) Linhas transformadas aleatoriamente selecionadas. (B) Percentagem de explantes que formaram CE. Adaptado de Correia *et al.* (2019).

As três linhas selecionadas com subexpressão do gene não apresentaram diferenças fenotípicas consistentes em comparação com a linha controlo. Ainda assim, a linha TV3 apresentou um desenvolvimento mais acentuado das raízes laterais (figura 1.7A) e uma formação de

CE significativamente menor relativamente à linha controlo (figura 1.7B). Por outro lado, as linhas TV1 e TV2 apresentaram uma percentagem de indução de CE ligeiramente superior à linha controlo, o que vai de encontro à hipótese de que a NEP-TC poderá ter um papel inibidor durante a indução de ES.

1.3 Família SpoU

A família de proteínas SpoU está envolvida na metilação de tRNA e rRNA, estando particularmente associada à 2'-O-metilação (Nm).

A proteína que deu nome a esta família foi prevista por Koonin e Rudd (1993) e é codificada pelo quarto *open reading frame* (ORF) do operão *spoT* de *Escherichia coli*. Foi, inicialmente, designada SpoU, mas o seu nome foi atualizado, em 1997, para tRNA (guanosine(18)-2'-O)-methyltransferase (TrmH), quando se descobriu que esta é responsável pela 2'-O-metilação da guanosina na posição 18 (Gm18) do *loop-D* do tRNA (Persson *et al.*, 1997). Para além da proteína TrmH em *E. coli*, já foram caracterizadas outras da mesma família noutros organismos, nomeadamente a Mitochondrial large ribosomal RNA ribose methylase (Pet56), em *Saccharomyces cerevisiae*, que catalisa a 2'-O-metilação da guanosina na posição 2270 (Gm2270) da subunidade ribossomal 21S na mitocôndria, e que é essencial para o acoplamento *in vivo* das subunidades ribossomais maiores nesse organelo (Sirum-Connolly e Mason, 1993) e a tRNA(cytidine(56)-2'-O)-methyltransferase (aTrm56), na arqueobactéria *Pyrococcus abyssi*, que catalisa a 2'-O-metilação da citosina na posição 56 (Cm56) do tRNA (Watanabe *et al.*, 2006). Assim, a distribuição de proteínas da família SpoU estende-se aos três domínios da vida.

Além das proteínas SpoU caracterizadas em organismos unicelulares, já são também conhecidas proteínas desta família em organismos mais complexos, nomeadamente em plantas, como é o caso da proteína VaSpoU1, associada a modificações de tRNA e rRNA em organelos em *Viscum album* (Ahn *et al.*, 2011) e a NEP-TC, associada à aquisição de competência embriogénica através de modificações no rRNA em *Solanum betaceum* (Correia *et al.*, 2019).

A primeira proteína da família SpoU cuja estrutura foi determinada foi a RrmA, por Nureki *et al.* (2002), em *Thermus thermophilus*. Esta família é estruturalmente caracterizada pela presença de seis folhas β paralelas ladeadas por sete α hélices, em que a porção do terminal amino se assemelha à conformação do domínio Rossmann, característico da grande parte das metiltransferases, e a porção do terminal carboxilo possui um nó trifólio profundo característico desta família, tal como está representado na figura 1.8 (Schubert *et al.*, 2003; Nureki *et al.*, 2004). Além do domínio SpoU, e embora existam exceções, a maioria das proteínas desta família apresentam outros domínios que normalmente estão associados à ligação ao substrato (Somme *et al.*, 2014).

O domínio SpoU possui três motivos conservados (figura 1.9), dois dos quais fazem parte

da região do nó, indicando que este é uma estrutura conservada nesta família de proteínas. Além de estar potencialmente envolvido na ligação ao S-adenosilmetionina (AdoMet), já que o motivo 2 do domínio SpoU se assemelha ao motivo de ligação do AdoMet presente noutras metiltransferases (Koonin e Rudd, 1993), o nó trifólio está também envolvido na formação do sítio ativo da proteína. Esta hipótese é sustentada por estudos de cinética que relevaram que a mutação em resíduos específicos dos motivos 2 e 3 suprime totalmente a atividade catalítica das proteínas SpoU (Nureki *et al.*, 2002).

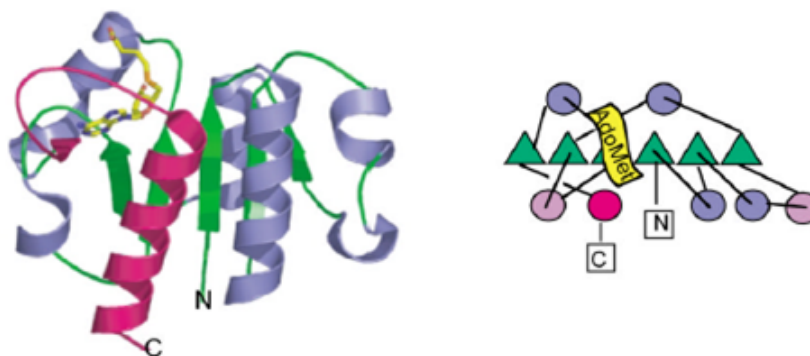


Figura 1.8: Representação da estrutura das proteínas da família SpoU (Schubert *et al.*, 2003).

Estas proteínas encontram-se, normalmente, em dímeros, sendo que a dimerização ocorre através de interações hidrofóbicas entre resíduos de aminoácidos presentes no nó trifólio, formando-se o sítio ativo na interface dos dois monómeros (Nureki *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2003).

Metiltransferases de tRNA	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3
	35 41	124	143 150 152
<i>T. thermophilus</i> TrmH	----H N L S A I L R T----	----V L F G A E K W G V S E ----	----K I P M L G M V Q S L N V----
<i>E. coli</i> TrmH	----H N V S A I I R T----	----V L M G Q E K T G I T Q ----	----V I P M I G M V Q S L N V----
<i>Aquifex aeolicus</i> TrmH	----H N F S A I V R T----	----L V V G N E L Q G V S P ----	----V I P M Y G M A Q S L N V----
<i>E. coli</i> TrmJ	----G N M G S V A R A----	----L V F G R E R V G L T N ----	----A I A A N P E Y S S L N L----
<i>Sulforobus acidocaldarius</i> TrmJ	----Y N L G F I A R L----	----F I F G R E S V G L T R ----	----F I P A N P E Y P V L N L----
<i>Haemophilus influenzae</i> TrmL	----Q N T G N I I R L----	----L M F G P E T R G I P M ----	----R I P M T A N S R S M N L----
<i>E. coli</i> TrmL	----P N T G N I I R L----	----L M F G P E T R G I P A ----	----R I P M V P D S R S M N L----
<i>Pyrococcus abyssi</i> Trm56	----T H V A L T A R A----	----V I V G A E K V P R E V ----	----A I G N Q P H S E V A A L----
<i>Pyrococcus horikoshii</i> Trm56	----T H V A L T A R A----	----I I V G A E K V P R E V ----	----A I G N Q P H S E V A A L----
Metiltransferases de rRNA			
<i>E. coli</i> RlmB	----H N L G A C L R S----	----L V M G A E G E G M R R ----	----S I P M A G S V S S N L ----
<i>S. azureus</i> Tsr	----H N I G A I V R T----	----L L F G S E K G G P S D ----	----S I P M M G Q T E S L N V----

Figura 1.9: Motivos conservados nas proteínas da família SpoU. Adaptado de Hori (2017).

Para além da família SpoU, a estrutura do nó trifólio está também presente nas proteínas TrmD, uma família de metiltransferases responsáveis pela metilação do azoto 1 da guanossina (m^1G) (Anantharaman *et al.*, 2002a). Durante muito tempo, pensou-se que estas duas famílias não estariam relacionadas, no entanto, em 2002, estudos bioinformáticos revelaram que estas apresentam homologia na sequência de aminoácidos, sugerindo uma origem comum. Atualmente, estas duas famílias formam a superfamília SPOUT (Anantharaman *et al.*, 2002b). Esta faz parte das metiltransferases dependentes de AdoMet, integrando a classe IV, a segunda maior classe de metiltransferases dependentes de AdoMet (Schubert *et al.*, 2003).

As proteínas SPOUT estão intrinsicamente ligadas à metilação do tRNA e do rRNA, no entanto, foi identificada uma proteína desta família, a SPOUT family methyltransferase 1 (SFM1), que catalisa a metilação de um resíduo de arginina numa proteína da subunidade ribossomal menor da levedura (Tkaczuk *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2012).

1.4 Metiltransferases de tRNA/rRNA

As metiltransferases formam um grande grupo de enzimas responsáveis pela transferência de um grupo metil de um dador para o DNA, RNA, proteínas ou outras moléculas mais pequenas. O AdoMet é o dador do grupo metil da maioria das metiltransferases, levando à formação de S-adenosil-homocisteína (AdoHcy) (Schubert *et al.*, 2003), como está ilustrado na figura 1.10. Ainda assim, conhecem-se algumas proteínas que usam o N^5,N^{10} -metilenotetrahidrofolato como dador do grupo metil, tal como acontece com a enzima Methylene-tetrahydrofolate-tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase (TrmFO), uma metiltransferase de tRNA (Hamdane *et al.*, 2011).

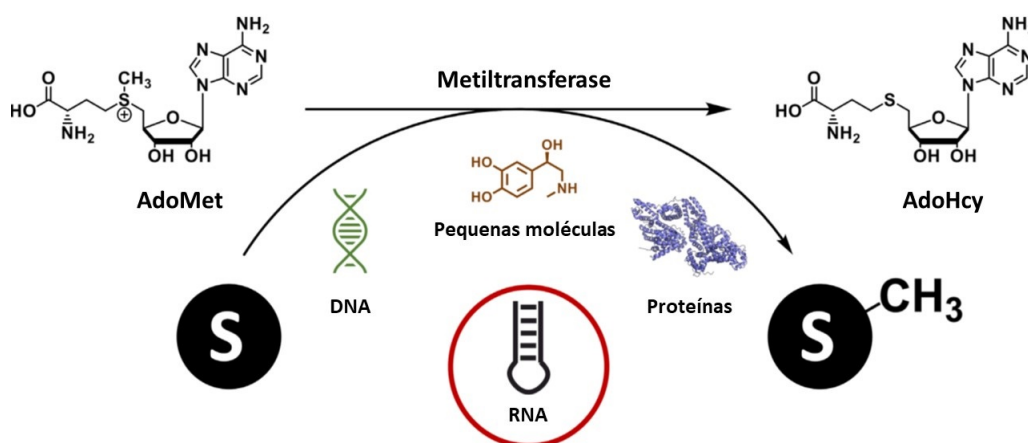


Figura 1.10: Reações de metilação catalisadas por metiltransferases. Adaptado de Fischer *et al.* (2022).

As metiltransferases dependentes de AdoMet estão, atualmente, organizadas em nove classes distintas, de acordo com a sua estrutura tridimensional. Destas, apenas as classes I,

IV, VII, VIII e IX incluem metiltransferases de RNA (Fischer *et al.*, 2022) e a grande maioria das metiltransferases de tRNA e de rRNA pertencem às classes I e IV (Swinehart e Jackman, 2015).

A classe I é a maior e mais abrangente de todas, à qual pertencem as *Rossmann-fold* metiltransferases (RFM), que se caracterizam pela presença de sete folhas β , ladeadas por três α hélices de cada lado (Schubert *et al.*, 2003). Para além de metiltransferases de RNA, esta classe incluiu também a maioria das metiltransferases de DNA. A classe IV é a segunda maior e da qual fazem parte as enzimas pertencentes à superfamília SPOUT, que já foi abordada anteriormente na secção 1.3 (Kozbial e Mushegian, 2005; Boschi-Muller e Motorin, 2013; Krishnamohan e Jackman, 2019).

1.5 Modificações do tRNA/rRNA

A modificação do RNA ocorre durante a maturação dos transcritos e é um processo universal que está presente em todos os tipos de RNA e em todos os organismos dos três domínios da vida, assim como em RNA viral, pelo que é uma importante fonte de diversidade química e estrutural dos RNA (Boccaletto *et al.*, 2021). Todos os resíduos modificados derivam dos quatro nucleótidos resultantes do processo de transcrição (adenosina, guanosina, citosina, uridina) e as modificações mais comuns são a formação de pseudouridina (Ψ) e a Nm (Decatur e Fournier, 2002). A alteração de um nucleótido pode ir de uma modificação simples, como uma metilação, até uma complexa cadeia de modificações em diferentes posições da molécula, levando à formação de nucleótidos hipermodificados (Chen *et al.*, 2010).

O tipo de RNA com mais modificações é o tRNA, em que cerca de 17% do número total de resíduos são modificados, enquanto no rRNA são apenas cerca de 2% (Jackman e Alfonzo, 2013). Para além disso, o número de nucleótidos modificados aumenta com a complexidade dos organismos, sendo, portanto, menor nas bactérias e maior nos organismos eucariotas superiores (Decatur e Fournier, 2002).

As modificações são normalmente encontradas em posições conservadas, tanto no tRNA como no rRNA, formando aglomerados em regiões funcionalmente importantes (Decatur e Fournier, 2002). No rRNA as modificações encontram-se, sobretudo, na interface entre as duas subunidades ribossomais na zona correspondente aos sítios P e A (Sharma e Lafontaine, 2015; Sloan *et al.*, 2017). No caso do tRNA, as modificações são, maioritariamente, encontradas no centro estrutural e no *loop* do anticodão (Motorin e Helm, 2011).

As evidências relativas às funções biológicas das modificações do tRNA e do rRNA são ainda bastante escassas, particularmente nas plantas. Ainda assim, alguns estudos em organismos unicelulares, como a levedura, apontam para um papel destas modificações na resposta ao stresse celular (Chan *et al.*, 2010).

A nível bioquímico estas modificações estão associadas a um ajuste da estrutura tridimen-

sional do RNA, aumentando a sua estabilidade e permitindo uma interação mais eficiente com os ligandos (Liang *et al.*, 2009; Motorin e Helm, 2011). Deste modo, a ausência das modificações pode levar a uma redução da eficiência na tradução, podendo afetar a regulação da expressão genética e o metabolismo celular (Chen *et al.*, 2010). A ausência de uma única modificação, normalmente, não afeta a funcionalidade do RNA. Por outro lado, a ausência de várias modificações simultaneamente tende a ter um efeito cumulativo negativo na estrutura e função do mesmo, pelo que as modificações do rRNA e do tRNA parecem funcionar cooperativamente (Lapeyre, 2004). Ainda assim, são conhecidas algumas exceções a este facto, como acontece em *Streptomyces azureus*, em que uma única metilação do resíduo de adenosina na posição 1067 da subunidade ribossomal 23S, catalisada pela proteína Thiostrepton-resistance methylase (Tsr), lhe confere resistência ao antibiótico tiostreptona (Cundliffe e Thompson, 1979; Thompson *et al.*, 1982).

1.5.1 2'-O-metilação

Aproximadamente dois terços de todas as modificações de RNA envolvem a adição de um grupo metil, fazendo da metilação a modificação mais abundante, tanto em tRNA como em rRNA (Motorin e Helm, 2011). Dentro das metilações, a Nm, em que um grupo metil é adicionado ao grupo hidroxilo na posição 2' da ribose (figura 1.11), é a mais comum (Dimitrova *et al.*, 2019).

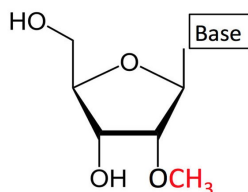


Figura 1.11: Representação química da metilação da ribose (Dimitrova *et al.*, 2019).

A Nm confere ao RNA propriedades químicas e estruturais que diferem substancialmente do RNA no seu estado não modificado. A nível estrutural, a adição do grupo metil estabiliza a conformação 3'-*endo* da ribose que está tipicamente presente nas cadeias de RNA tipo-A. A nível químico, a Nm elimina o carácter nucleofílico do oxigénio, o que resulta numa maior resistência à hidrólise alcalina e à ação de nucleases, assim como à oxidação (Motorin e Marchand, 2018; Höfler e Carlomagno, 2020). A natureza hidrofóbica do grupo metil contribui também para a prevenção de interações indesejadas com, por exemplo, com proteínas (Dimitrova *et al.*, 2019).

A Nm pode ser catalisada por enzimas específicas, ou seja, metiltransferases que atuam sozinhas e que, portanto, além de catalisarem a reação fazem também o reconhecimento do substrato. Todavia, o tRNA e o rRNA no domínio Archea e o rRNA no domínio Eukarya podem também ser metilados por *small nucleolar* ribonucleoproteínas (snoRNPs), em que a metilção é catalizada por uma enzima, mas o reconhecimento do substrato é feito por um

small nucleolar RNA (snoRNA) guia da classe *C/D Box* (Reichow *et al.*, 2007; Bujnicki *et al.*, 2008; Motorin e Marchand, 2018).

1.6 Embriogênese somática

A ES, descrita pela primeira vez por Stewart *et al.* (1958) e Reinert (1958), em *Daucus carota* L., é um método de micropropagação clonal que, mediante determinadas condições de cultura, leva à formação embriões somáticos, estruturas bipolares semelhantes a embriões zigóticos, e que, conseqüentemente, permite a obtenção de plantas, a partir de células somáticas, sem que haja a necessidade de fertilização. Durante este processo, ocorre uma reprogramação celular que resulta na desdiferenciação das células somáticas que, conseqüentemente, adquirem totipotência e, assim, capacidade embriogênica (Hussein *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2021).

Com está ilustrado na figura 1.12, os embriões somáticos podem ser obtidos através de ES direta ou indireta, ou seja, podem derivar de uma única célula somática ou de múltiplas células, respetivamente (Su *et al.*, 2021). No primeiro caso, uma única célula somática divide-se, adquirindo totipotência e desenvolvendo-se num embrião somático. No segundo caso, a ES começa com a formação de um CE, que pode ser definido como uma massa de células indiferenciadas que têm a capacidade de adquirir totipotência. Dependendo da espécie com que se está a trabalhar, a ES pode ser induzida a partir de diferentes explantes como embriões zigóticos, folhas jovens ou segmentos de hipocótilos (Hussein *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2021).

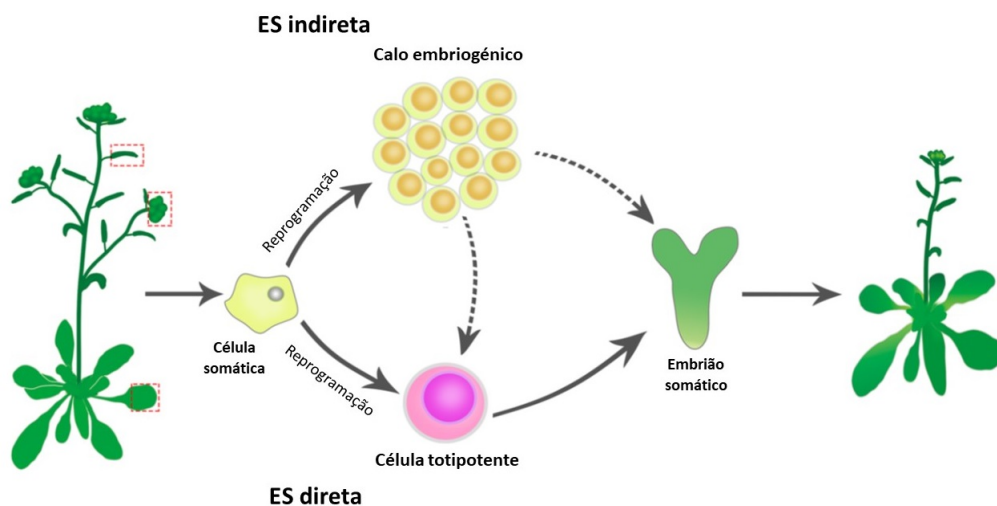


Figura 1.12: Embriogênese somática direta e indireta. Adaptado de Su *et al.* (2021)

Os embriões somáticos desenvolvem-se num ambiente bastante diferente dos embriões zigóticos, tanto do ponto de vista físico como fisiológico, no entanto, eles passam pelas mesmas fases de desenvolvimento (globular, *heart*, torpedo e cotiledonar), representadas

na figura 1.13, o que demonstra que o programa genético que leva ao desenvolvimento do embrião é independente dos tecidos maternos. Ainda assim, é possível que as condições do meio em que é induzida a ES, de alguma forma, simulem os sinais naturais que desencadeiam o início da embriogênese zigótica (Zimmerman, 1993).

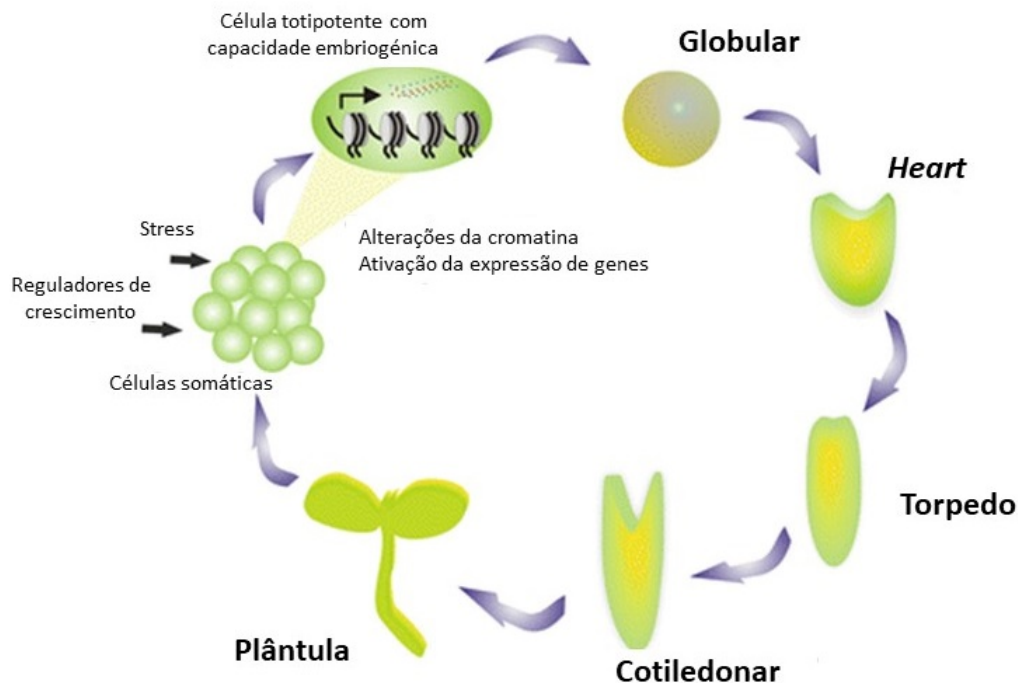


Figura 1.13: Eventos morfológicos que ocorrem durante o processo de embriogênese somática. Adaptado de Nic-Can e De la Peña (2014)

O processo que leva as células somáticas a formarem embriões começa com a fase de indução, em que ocorre a desdiferenciação celular e, conseqüentemente, a aquisição de competência embriogénica. Para isso, os explantes são sujeitos a fatores de stress (lesões, stress osmótico, temperatura, hipóxia, radiação ultravioleta, iões de metais pesados, tratamentos químicos ou mecânicos) e/ou a altas concentrações de reguladores de crescimento (auxina, citocinina ou, em alguns casos, ácido abscísico), como indicado na figura 1.13. Na verdade, a ES pode ser vista como uma resposta extrema das células em cultura ao stress, em que estas são obrigadas a mudar o seu programa de desenvolvimento para garantir a sobrevivência (Zavattieri *et al.*, 2010). Existem várias vias de regulação que podem levar à formação de embriões somáticos e a sua ativação depende do explante utilizado assim como dos fatores exógenos aplicados (Tang *et al.*, 2020).

O indutor de ES mais utilizado é a auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que não só atua como regulador de crescimento, mas também como fator de stress químico (Fehér, 2015). As altas concentrações de 2,4-D do meio levam ao aumento dos níveis endógenos de auxina, o que é considerado um dos pontos cruciais para a aquisição de competência embriogénica, já que é criado um transporte polar da auxina, importante para a formação do embrião. No entanto, para que seja possível o desenvolvimento do embrião,

muitas vezes, é necessário transferir as células para um meio sem 2,4-D (Zavattieri *et al.*, 2010).

Para além disso, os fatores exógenos levam também a uma reorganização estrutural da cromatina que resulta numa alteração do padrão de expressão genética, passando a haver expressão de genes, inativos em células diferenciadas, que são importantes para o desenvolvimento embriogénico. Vários fatores epigenéticos contribuem para as alterações na cromatina, destacando-se a acetilação das histonas e a metilação do DNA (Fehér, 2015).

Alguns genes expressos durante a indução de ES codificam para fatores de transcrição que também são importantes para a regulação do programa embriogénico e que, para além disso, são utilizados como marcadores moleculares das células embriogénicas. Alguns dos mais estudados e que já foram reportados para várias espécies são o *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* e o *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)*, o *FUSCA3 (FUS3)*, o *ABAINSENSITIVE 3 (ABI3)*, o *BABY BOOM (BBM)* e o *AGAMOUS-LIKE15 (AGL15)*. Os fatores de transcrição codificados por estes genes fazem parte da via ativada pela auxina exógena e que, de forma geral, aumentam ou ativam a expressão de outros genes pertencentes à via biossintética da auxina, aumentando a sua concentração endógena (Tang *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2021).

As vias que regulam a embriogénese somática são complexas e ainda pouco compreendidas. No entanto, a sua elucidação é bastante importante, tendo em conta as várias aplicações da ES. Do ponto de vista biotecnológico, a ES apresenta-se como um meio com grande potencial para a rápida propagação clonal em larga escala, mas também para a melhoria de espécies, transformação genética e criopreservação de linhas com determinados genótipos (Correia *et al.*, 2011). Além disso, este método é também um ótimo modelo de estudo para a totipotência das células somáticas, assim como para a elucidação dos mecanismos moleculares da embriogénese zigótica, dadas as semelhanças entre o desenvolvimento dos embriões somáticos e zigóticos (Su *et al.*, 2021).

1.7 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo

Apesar de não possuir valor a nível agronómico, a espécie *Arabidopsis thaliana* é um modelo de estudo largamente utilizado e que já contribuiu enormemente para o conhecimento dos processos moleculares do desenvolvimento das plantas, biologia celular, metabolismo, fisiologia, genética e epigenética. Esta espécie é uma pequena dicotiledónea anual pertencente à família Brassicaceae e com distribuição natural na Europa, Ásia e América do Norte. As suas plântulas desenvolvem-se em rosetas e reproduz-se por autopolinização, originando siliquis. Dependendo das condições de crescimento, o seu ciclo de vida pode ser completo em cerca de 6 semanas (figura 1.14). Embora existam inúmeros ecótipos disponíveis para investigação, os mais comumente usados para estudos de biologia molecular e genética são o Columbia e o Landsberg (Meinke *et al.*, 1998; Krämer, 2015).

O ciclo de vida, o tamanho e a forma de reprodução são algumas das características que fazem de *Arabidopsis* um bom modelo de estudo, no entanto as suas vantagens vão muito além disso. Desde o início da década de 80, altura em que a espécie começou a ganhar popularidade no meio da comunidade científica, o seu genoma foi exaustivamente estudado e, em 2000, *Arabidopsis* tornou-se a primeira planta angiospérmica a ter o seu genoma nuclear totalmente sequenciado e publicado. Com apenas 5 cromossomas (no estado haploide), esta planta possui mais de 25 000 genes que codificam para mais de 11 000 famílias de proteínas (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Para além da sequenciação, houve também um esforço para que se saturasse o genoma da espécie com inserções de T-DNA e, assim, se tornasse mais fácil o estudo funcional de genes de interesse, através de metodologias de genética reversa (Parinov e Sundaresan, 2000). Foram criadas mais de 225 000 inserções de T-DNA e os mutantes, cuja localização exata já foi determinada, podem ser obtidos através do Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) e do Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (Alonso *et al.*, 2003; Krämer, 2015). A alta densidade genética da espécie foi um dos fatores que contribuiu para o sucesso deste projeto (Parinov e Sundaresan, 2000).

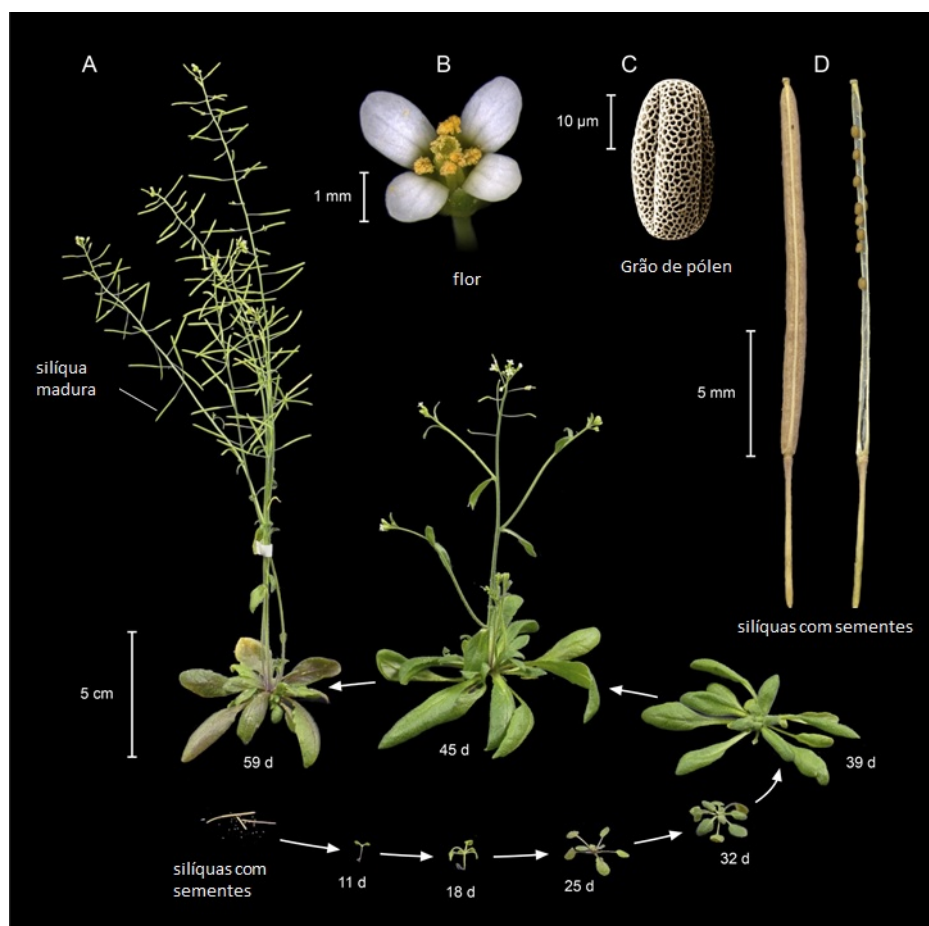


Figura 1.14: Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. (A) *A. thaliana* do ecótipo Columbia em diferentes fases do desenvolvimento. (B) Flor. (C) Grão de pólen. (D) Silíquas maduras. Adaptado de Krämer (2015).

Uma outra vantagem deste modelo de estudo, é o facto de três em cada quatro famílias de genes presentes em *Arabidopsis* estarem também presentes noutras angiospérmicas. Assim, funções de genes estudadas e determinadas nesta espécie poderão ser similares noutras espécies de maior interesse (Woodward e Bartel, 2018). Um exemplo disso são as vias de sinalização da maioria das fitohormonas que foram elucidadas em *Arabidopsis* (Provart *et al.*, 2015).

Para além de todas as vantagens acima descritas, existe atualmente uma enorme quantidade de dados relativos à biologia celular e molecular de *Arabidopsis* disponibilizados em diversas bases de dados *online*, entre as quais se destacam The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (Huala *et al.*, 2001), ePlant (Waese *et al.*, 2017) e Araport11 (Cheng *et al.*, 2017).

1.8 Motivação

A biotecnologia vegetal pode ser definida como o conjunto de tecnologias que permitem manipular as plantas de forma a obter novas características, novos produtos ou a realização de determinadas funções (Canhoto, 2010).

Deste modo, a ES é uma ferramenta biotecnológica fundamental, que não só permite a propagação clonal em larga escala, mas também a melhoria de espécies e a transformação genética. Uma grande vantagem da ES relativamente a outros métodos de propagação é a possibilidade de se usarem os embriões somáticos na produção de sementes artificiais (Canhoto, 2010).

No caso específico do tamarilho, segundo Canhoto *et al.* (2005), a ES aliada à transformação genética pode desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de novos cultivares, mais tolerantes a fatores bióticos e abióticos.

Assim sendo, e de forma a otimizar o método e, até mesmo, torná-lo possível para espécies atualmente recalcitrantes, é de extrema importância conhecer a forma como a ES é regulada, nomeadamente, ao nível da aquisição de competência embriogénica.

1.9 Objetivos

O presente trabalho vem na sequência de trabalhos anteriores, em que foi identificada uma metiltransferase de rRNA pertencente à família SpoU, designada NEP-TC, consistentemente presente em CNEs e ausente em CEs, prevendo-se um possível papel inibidor na ES, além de poder ser usada como marcador molecular das células não embriogénicas.

A caracterização funcional desta proteína pode contribuir bastante para a elucidação do seu papel na ES. Atualmente, este tipo de estudos é feito, sobretudo, através de métodos de genética reversa, pelo que normalmente são utilizadas espécies modelo como *Arabidopsis*

thaliana, para a qual está disponível um elevado número de mutantes, assim como várias ferramentas bioinformáticas.

Estudos de filogenia revelaram a existência de um gene em *Arabidopsis* que codifica uma proteína ortóloga da NEP-TC, assim como outros genes pertencentes à mesma família. Posto isto, e dada a escassez de ferramentas e recursos genéticos para o tamarilho, a planta modelo *Arabidopsis thaliana* será utilizada neste trabalho.

O objetivo é fazer a caracterização funcional de metiltransferases de tRNA/rRNA da família SpoU, através de técnicas de genética reversa, para perceber o seu envolvimento no desenvolvimento vegetal, assim como na resposta à indução de ES, uma vez que os resultados aqui obtidos poderão contribuir para a compreensão do papel da NEP-TC na indução de ES em tamarilho.

Serão utilizadas linhas mutantes para três dos genes que codificam para proteínas SpoU em *Arabidopsis* e serão avaliados diferentes aspetos do desenvolvimento das plantas, nomeadamente a taxa de germinação, a taxa de desenvolvimento, o desenvolvimento radicular (comprimento da raiz principal, número de raízes laterais e densidade de pelos radiculares) e o desenvolvimento das siliquas (área da siliqua, número total de sementes e número de sementes potencialmente viáveis). A resposta de embriões zigóticos imaturos à indução de ES será outro dos parâmetros avaliados.

Além disso, tendo em conta que a redundância genética é bastante comum nas famílias de genes das espécies vegetais, é também um objetivo deste trabalho a obtenção de duplos mutantes e posterior análise dos parâmetros acima referidos.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Material biológico

Para este trabalho foram utilizadas sementes *wild-type* (WT) de *Arabidopsis thaliana* do ecótipo Columbia (Col-0) e sementes mutantes para genes da família SpoU. Embora esta família possua, pelo menos, 5 genes em *Arabidopsis*, aqui serão estudados apenas 3: *AT4G15520* (codifica a proteína ortóloga da NEP-TC), *AT4G17610* e *AT5G15390*. Esta escolha deve-se a informações disponíveis na base de dados ePlant (Waese *et al.*, 2017), relativas à expressão destes genes ao longo do tempo nas diferentes partes da planta. Deste modo, foram escolhidos os genes cujas expressões se sobrepõem significativamente, tanto temporal como espacialmente e, portanto, é expectável que os efeitos fenotípicos em duplos e triplos mutantes sejam mais evidentes.

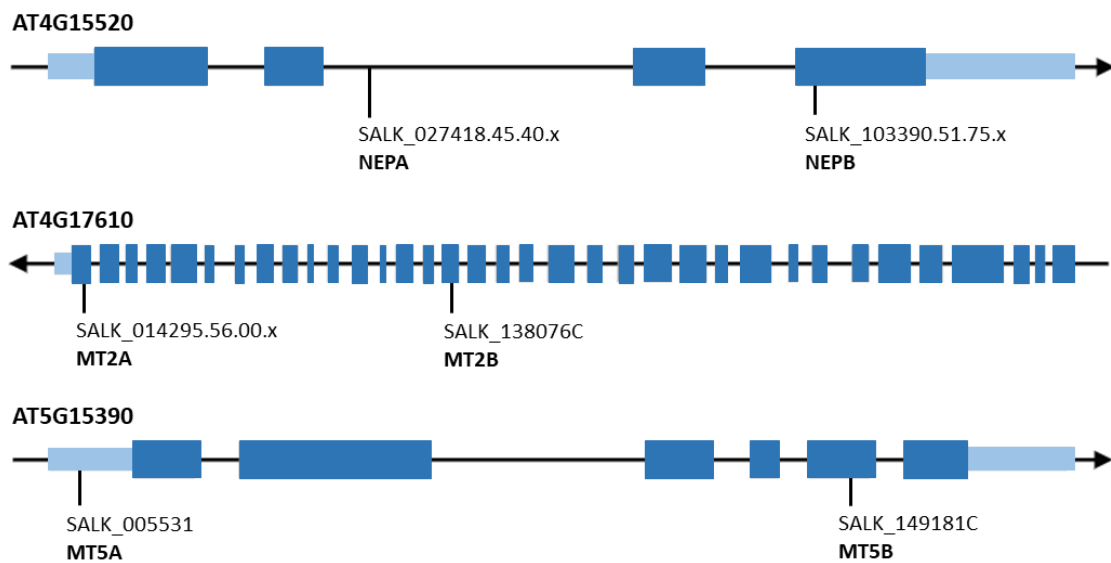


Figura 2.1: Representação esquemática dos genes *AT4G15520*, *AT4G17610* e *AT5G15390* e local de inserção do T-DNA nas linhas mutantes. A azul escuro estão representados os exões, a azul claro as *untranslated regions* (UTRs) e a linha preta representa os intrões.

As linhas mutantes foram obtidas através do Salk Institute Genomic Analysis Laboratory. Para o gene *AT4G15520*, foram utilizadas as linhas SALK_027418.45.40.x (NEPA) e SALK_103390.51.75.x (NEPB), com a inserção de T-DNA num intrão e num exão, respectivamente. Para o gene *AT4G17610*, as linhas utilizadas foram a SALK_014295.56.00.x (MT2A) e a SALK_138076C (MT2B), com ambas as inserções num exão. E, por fim, para o gene *AT5G15390*, foram usadas as linhas SALK_005531 (MT5A) e SALK_149181C (MT5B), com a inserção numa UTR e num intrão, respectivamente. Os locais aproximados das inserções de T-DNA nas linhas mutantes estão representados na figura 2.1.

2.2 Germinação e condições de crescimento

As sementes foram desinfetadas numa solução de etanol (C₂H₅OH) 70% (v/v), sob agitação, durante 3 minutos. A germinação foi feita *in vitro*, em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS) (Duchefa), suplementado com 3% (m/v) sacarose (Duchefa) e 0.7% (m/v) agar (Duchefa), ou 1.2% para crescimento vertical. Após serem plaqueadas, sob condições estéreis, e devidamente seladas, as sementes foram colocadas a 4 °C e na ausência de luz durante 3 dias, para que se desse a quebra da dormência. Após esse período de estratificação, foram transferidas para condições controladas de crescimento (fotoperíodo com 16h de luz, com uma intensidade de 150 µmol/m²/s, a 21 °C e com 70% de humidade). Passadas três semanas, as plantas foram transplantadas para substrato Siro Royal (Siro) e areia, numa proporção 4:1, e mantidas nas mesmas condições de crescimento.

2.3 Seleção de plantas homozigóticas para a inserção T-DNA

Para a identificação de plantas homozigóticas para a inserção de T-DNA foi feita extração de DNA de folhas de plantas com 3 semanas, seguindo-se a técnica *polymerase chain reaction* (PCR) e eletroforese.

2.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita com base no protocolo descrito em Kasajima *et al.* (2004). Começou-se por retirar uma folha de cada planta para tubos de plástico e adicionou-se, a cada tubo, 200 µl de tampão de extração, que consiste numa diluição de 10x da solução Edwards (200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA e 0.5% SDS) (Edwards *et al.*, 1991) em tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 8) e 1 mM EDTA). Posteriormente, esmagou-se a folha contra as paredes do tubo, com um pilão de plástico, e fez-se uma centrifugação a 14 000 rotações por minuto (rpm), na microcentrífuga Sorvall Legend Micro 17 (Thermo Scientific), durante 5 minutos, para eliminar tecidos residuais. Recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo.

2.3.2 PCR

Para a reação de PCR foram utilizados *primers* específicos para cada gene, *primer* esquerdo (LP) e *primer* direito (RP), assim como um *primer* específico para a inserção de T-DNA, *primer* esquerdo da inserção de T-DNA (Lba1), tal como descrito por Alonso e Stepanova (2003). Todos os *primers* utilizados estão discriminados na tabela 2.1.

Para cada planta prepararam-se duas reações de PCR, uma com os *primers* LP, RP e outra com os *primers* Lba1, RP. Cada reação era composta por 10 µl de NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTech), 2 µl de cada *primer*, 1 µl da solução de DNA e 5 µl de água ultra pura autoclavada, perfazendo um volume final de 20 µl, com exceção do controlo negativo em que o volume de DNA foi substituído por água ultra pura autoclavada.

Tabela 2.1: *Primers* utilizados para a genotipagem das linhas mutantes de *Arabidopsis thaliana*.

Linha	<i>Primer</i>	Sequência
MT2A	SALK_014295LP	5'-GGAGGTCGAAAGGTTGAAATC-3'
	SALK_014295RP	5'-TTCGCGATTTGGAAATTTATG-3'
MT2B	SALK_138076LP	5'-GCCAAGTCTTTATCATGCACC-3'
	SALK_138076RP	5'-GCTGAAATCTGTCAGACTCGC-3'
MT5A	SALK_005531LP	5'-GAAGTTGCACTCCATCGACTC-3'
	SALK_005531RP	5'-ACTCTTCCGTTAAGCTCTCCG-3'
MT5B	SALK_149181LP	5'-ATTTTAGGGCTTGCTTTCCAC-3'
	SALK_149181RP	5'-ATGGCTGGACATTGAGTTTTG-3'
NEPA	SALK_02748LP	5'-TCGTAAATTGAAATGAACCGG-3'
	SALK_02748RP	5'-GCCCAAACCTTGGTCCTTTAG-3'
NEPB	SALK_103390LP	5'-GTTGTTGTTGTTGCAGGGTTC-3'
	SALK_103390RP	5'-CTAAAGGACCAAGTTTTGGGC-3'
Todas	Lba1	5'-CTAAAGGACCAAGTTTTGGGC-3'

O termociclador utilizado foi o Arktik (Thermo Scientific) e o programa de PCR realizado está descrito na tabela 2.2.

Tabela 2.2: Parâmetros do programa PCR utilizado para a genotipagem das linhas mutantes de *Arabidopsis thaliana*.

Fase do ciclo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	3 minutos	1
Desnaturação	94 °C	30 segundos	35
<i>Annealing</i>	55 °C	30 segundos	
Extensão	72 °C	34 segundos	
Extensão final	72 °C	5 minutos	1

2.3.3 Eletroforese

Os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose 1.5% (m/v) corado com 3 µl/100 mL de GreenSafe Premium (NZYTech), com uma voltagem de 130 V. Utilizou-se como

marcador de peso molecular o NZYDNA Ladder III (NZYTech). O gel foi depois visualizado no aparelho de imagiologia molecular Gel Doc XR+ (Bio-Rad) com o auxílio do *software* Image Lab (Bio-Rad).

2.4 Polinização controlada

Para a obtenção de duplos mutantes, foram feitas polinizações controladas entre plantas de diferentes linhas mutantes, homozigóticas para a inserção de T-DNA em diferentes genes. Os botões florais utilizados encontravam-se, de acordo com o definido em Smyth *et al.* (1990), no estágio 11 do desenvolvimento (aparecimento das papilas estigmáticas) aquando da emasculação e no estágio 12 (alongamento dos estames - estigma desenvolvido) na polinização.

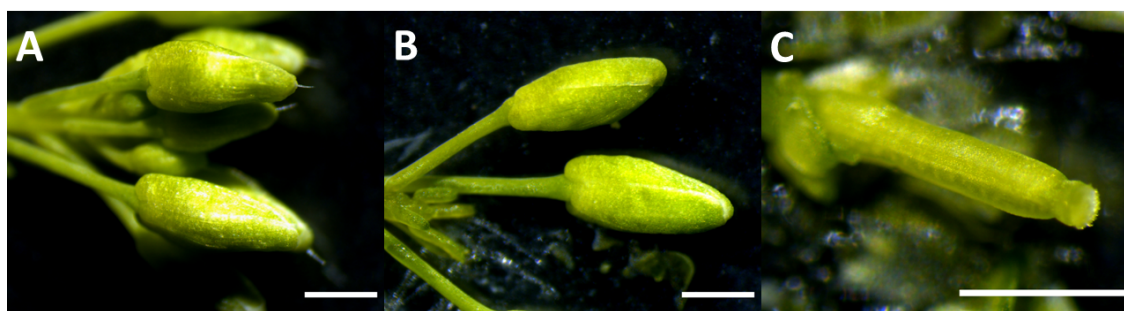


Figura 2.2: Emasculação. (A) Inflorescência. (B) inflorescência apenas com os botões que serão emasculados. (C) pistilo de botão emasculado com estilete pouco desenvolvido. Escala: 1 mm.

O primeiro passo foi fazer a emasculação, representada na figura 2.2, das plantas que iriam, posteriormente, ser polinizadas. Começou-se por remover todas as siliquis e flores de cada inflorescência. As inflorescências foram, depois, observadas à lupa e foram retirados, com o auxílio de uma pinça, os botões florais demasiado pequenos assim como aqueles que já estavam abertos. Para os restantes botões, removeram-se as anteras imaturas. As pétalas e as sépalas também foram retiradas durante o processo. Por fim, envolveu-se o pistilo em película aderente, para prevenir polinizações não controladas.



Figura 2.3: Polinização. (A) Flor com anteras com pólen visível. (B) pistilo com estigma recetivo ao pólen. (C) antera em contacto com o estigma. Escala: 1 mm.

Aproximadamente 2 dias após a emasculação, quando o estigma já se encontrava receptivo ao pólen, procedeu-se à polinização. Para isso, retirou-se, com uma pinça, uma flor aberta da planta dadora de pólen e, utilizando um lupa, uma antera aberta com pólen visível foi colocada em contacto com o estigma (figura 2.3). Usou-se, novamente, película aderente para envolver o pistilo e as síliquas demoraram entre 15 a 25 dias até estarem maduras e prontas para a colheita.

2.5 Cultura *in vitro* de grãos de pólen

A viabilidade do pólen foi testada através da germinação *in vitro* de grãos de pólen, baseada no descrito em Li *et al.* (1999).

Começou-se por preparar meio de cultura com uma concentração de sacarose de 12%, contendo 5 mg/l de ácido bórico (H_3BO_3), 15 mg/l de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e 15 mg/l de nitrato de potássio (KNO_3), adicionando também 1% de agar (Duchefa) para o meio gelidificar. Após acertar a solução a pH 7, esta foi aquecida até o agar derreter e, posteriormente, distribuída em placas de Petri, em pequenas quantidades (1-2 mm de espessura).

De seguida, com o auxílio de uma pinça, pegou-se em flores, previamente colhidas, que foram passadas no meio de cultura, ficando os grãos de pólen espalhados nas caixas. Taparam-se as caixas e deixaram-se *overnight* à temperatura ambiente.

Para a visualização da germinação dos grãos de pólen, começou-se por cortar, com um bisturi, cerca de 0.5 cm^2 de meio de cultura, onde se colocaram previamente os grãos de pólen, e colocou-se esse meio numa lâmina de microscópio. Adicionou-se uma ou duas gotas de carmim acético sobre o meio e colocou-se a lamela. Por fim, aqueceu-se à chama cuidadosamente até o agar derreter e as preparações foram então observadas ao microscópio ótico Leica DM1000 (Leica).

Fizeram-se 3 preparações para cada linha e em cada preparação contaram-se 100 grãos de pólen, registando a percentagem de grãos de pólen germinados.

2.6 Crescimento *in vivo* do tubo polínico

Com o objetivo de observar o crescimento do tubo polínico, alguns dos pistilos sujeitos à polinização controlada foram utilizados no presente protocolo, baseado no descrito em Pereira *et al.* (2016), que foi realizado 48h após a polinização.

Os pistilos foram, inicialmente, fixados numa solução de C_2H_5OH 96% (v/v) e ácido acético (CH_3COOH), numa proporção 9:1, durante 24h, a $4\text{ }^\circ\text{C}$. De seguida, foram lavados com água destilada, durante 5 minutos, repetindo-se este passo três vezes, após o qual

se adicionou uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 8 M, novamente, durante 24h e a 4 °C. Voltaram-se a lavar os pistilos com água destilada três vezes, desta vez, durante 20 minutos cada lavagem. Adicionou-se, de seguida, uma solução de azul de anilina 0.1% (m/v) em fosfato de potássio (K_3PO_4) 0.01 M, durante cerca de 60 minutos.

Colocaram-se os pistilos numa lâmina de vidro para microscopia e, com o auxílio de duas agulhas, abriram-se ligeiramente para que o tubo polínico ficasse mais exposto. De seguida, colocou-se uma gota da solução de azul de anilina e os pistilos foram esmagados com uma ligeira pressão exercida sobre a lamela.

As observações foram feitas no microscópio Leica DM4000B, com uma fonte de luz externa para aquisição de imagens de fluorescência (Leica EL6000), usando um filtro UV (350-400 nm). As imagens foram obtidas com o *software* LAZ EZ (Leica).

2.7 Análise do desenvolvimento

Para a análise do desenvolvimento, as sementes foram germinadas como descrito na secção 2.2, em placas de Petri quadradas de 12 cm e na posição vertical. Foram feitas 10 réplicas biológicas, cada uma com 10 sementes.

Este ensaio foi baseado no descrito em Boyes *et al.* (2001) e foram avaliados diferentes aspetos do desenvolvimento das plantas, nomeadamente, a taxa de germinação, a velocidade de desenvolvimento, o desenvolvimento radicular e o desenvolvimento das síliquas.

Para todas as análises estatísticas, assim como para o tratamento e visualização gráfica dos dados, utilizou-se a linguagem de programação R. Já as imagens foram processadas no *software* ImageJ.

2.7.1 Taxa de germinação

A taxa de germinação foi avaliada através da análise da evolução da taxa de germinação ao longo do tempo em que se registou a germinação das sementes todos os dias até ao 14^o dia após a sementeira, assim como através da análise da taxa de germinação ao fim dos 14 dias, com o objetivo de se proceder a uma análise estatística.

2.7.2 Taxa de desenvolvimento

Esta parte do ensaio foi dividida em duas fases: a fase *in vitro* e a fase *ex vitro* (em substrato).

Na fase *in vitro*, as amostras foram observadas todos os dias, desde o dia em que foram colocadas em condições de crescimento até ao 14^o dia após a sementeira, e, em cada dia,

registou-se o estágio de desenvolvimento de cada plântula. Na fase *ex vitro*, os registos foram feitos em intervalos de 2 dias, até todas as plantas possuírem flores abertas.

Todos os estádios de desenvolvimentos considerados para cada uma das fases estão descritos na tabela 2.3. Note-se que, as amostras que ao 14^o dia se encontravam no estágio 0.10, não foram consideradas para esta análise.

Tabela 2.3: Estádios de desenvolvimento de *A. thaliana* considerados para as fases *in vitro* e *ex vitro* durante a análise da taxa de desenvolvimento. Baseado em Boyes *et al.* (2001).

Fase	Estádio	Descrição
<i>In vitro</i>	0.10	Embebição da semente
	0.50	Emergência da radícula
	0.7	Emergência do hipocótilo e dos cotilédones
	1.0	Cotilédones totalmente abertos
	1.02	2 folhas da roseta >1 mm
	1.04	4 folhas da roseta >1 mm
<i>Ex vitro</i>	5.10	Primeiro botão floral visível
	6.00	Primeira flor aberta

2.7.3 Desenvolvimento radicular

Para avaliar o desenvolvimento radicular, os parâmetros considerados foram o comprimento da raiz principal, o número de raízes laterais e a densidade de pelos radiculares. Os registos foram feitos ao 14^o dia após a sementeira. Para esta análise foram apenas consideradas plântulas que se encontravam no estágio de desenvolvimento 1.04.

2.7.4 Desenvolvimento das síliquas

Foram recolhidas 5 síliquas de 5 plantas de cada linha, que se encontravam no estágio de desenvolvimento 17 (síliquas verdes após queda de todos os órgãos florais), segundo Smyth *et al.* (1990). Para cada síliqua, contaram-se o número de sementes total, o número de sementes potencialmente viáveis, avaliadas de acordo com Rius *et al.* (2008), e a área da síliqua (mm²), que foi calculada utilizando o *software* ImageJ.

2.8 Indução de embriogénese somática

O procedimento de indução de ES baseou-se no descrito por Ikeda-Iwai *et al.* (2002). Começou-se por recolher síliquas de plantas WT e homocigóticas para a inserção de T-DNA, no estágio 17 do desenvolvimento (síliquas verdes após queda de todos os órgãos florais) segundo Smyth *et al.* (1990), cujos embriões se encontravam maioritariamente na fase torpedo. De seguida, procedeu-se à sua desinfeção numa solução de hipoclorito de cálcio (Ca(ClO)₂) 5% (m/v) com Tween 20, sob agitação, durante 20 minutos, seguida de

3 lavagens em água esterilizada. Posteriormente, as siliquas foram dissecadas, sob condições estéreis, com o auxílio de duas agulhas e utilizando uma lupa, e retiraram-se as sementes imaturas que foram inoculadas em meio de indução de ES. Este consiste em meio de cultura de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968) (B5) suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 1 mg/l de 2,4-D. O meio foi solidificado com 3 g/l de gelrite (Duchefa) em placas de Petri com 6 cm de diâmetro. Foram feitas 25 réplicas biológicas, cada uma com 10 sementes imaturas. As placas foram colocadas em condições de crescimento (fotoperíodo com 16h de luz, com uma intensidade de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, a 21 °C e com 70% de humidade) e os resultados foram registados passadas quatro semanas, com o auxílio do estereomicroscópio SMZ800N (Nikon).

Capítulo 3

Resultados

3.1 Seleção de linhas mutantes homozigóticas para a inserção de T-DNA e de duplos mutantes

O primeiro passo neste trabalho foi a seleção de linhas mutantes homozigóticas para a inserção de T-DNA nos diferentes genes em estudo. A genotipagem foi feita através da técnica PCR, pelo que foi necessário, primeiramente, fazer extração de DNA das amostras e, posteriormente, correr os produtos de PCR em gel de agarose para visualização dos resultados.

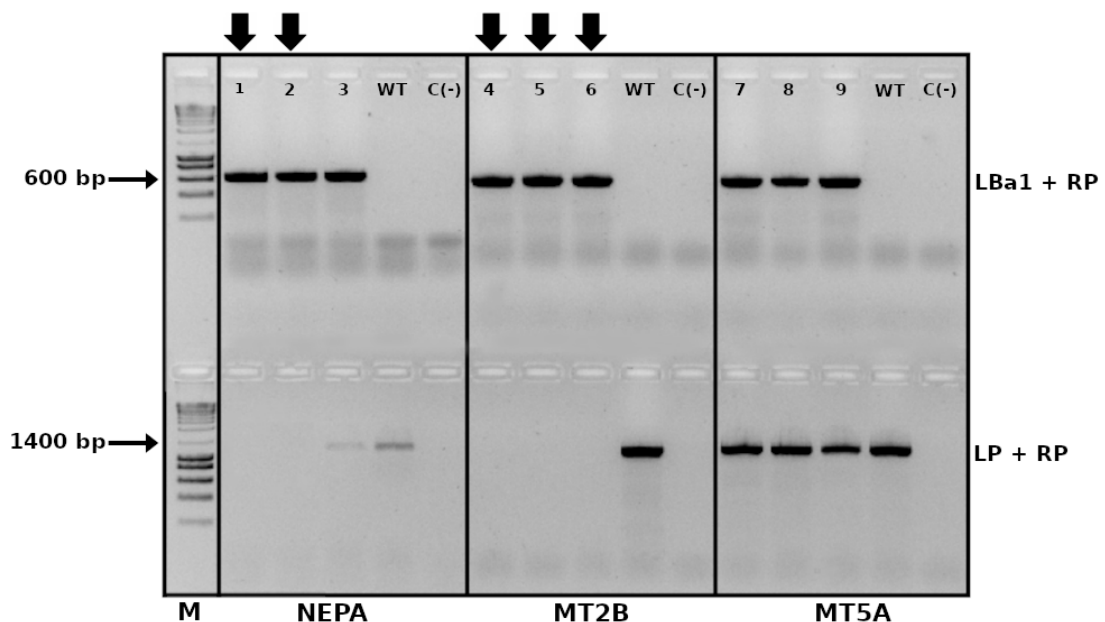


Figura 3.1: Identificação de linhas mutantes homozigóticas para a inserção do T-DNA nos genes *AT4G15520* (NEPA), *AT4G17610* (MT2B) e *AT5G15390* (MT5A). As amostras homozigóticas estão identificadas com uma seta. Para a linha MT5A não foi identificada nenhuma amostra homozigótica. M - marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III (nzytech). C(-) - controlo negativo.

As linhas MT2A e MT5B já tinham sido previamente genotipadas e identificadas como homozigóticas. Assim, procedeu-se à genotipagem das restantes linhas, cujos resultados são apresentados na figura 3.1. Foi possível selecionar plantas homozigóticas para as linhas NEPA e MT2B.

Inicialmente, o objetivo era fazer a análise de duas linhas mutantes distintas para cada gene, de forma a verificar se existiriam diferenças fenotípicas resultantes das diferentes inserções e, conseqüentemente, tirar conclusões mais fundamentadas relativamente à caracterização funcional dos genes. Todavia, a não germinação das sementes, no caso da linha NEPB, e a ausência de plantas homozigóticas, no caso da linha MT5A, impossibilitaram que tal fosse possível para os genes *AT4G15520* e *AT5G15390*, respetivamente.

Assim, para os ensaios seguintes foram utilizadas as linhas MT2A e MT2B, mutantes para o gene *AT4G17610*, a linha MT5B, mutante para o gene *AT5G15390*, e a linha NEPA, mutante para o gene *AT4G15520*. Os resultados obtidos para estas linhas foram comparados com os obtidos para a linha WT do ecótipo Col-0.

As plantas cujas sementes resultaram de cruzamentos também foram genotipadas. Foram obtidas sementes para cruzamentos entre as linhas MT2B e MT5B e a genotipagem confirmou que as plantas eram heterozigóticas para as mutações em ambos os genes, como é possível observar na figura 3.2

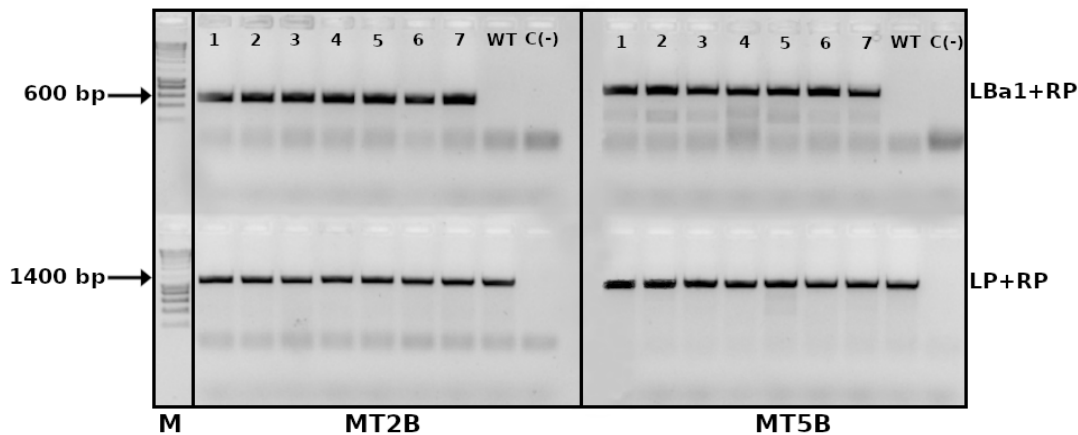


Figura 3.2: Identificação de linhas duplo mutantes para os genes *AT4G17610* (MT2B) e *AT5G15390* (MT5B). Todas as amostras analisadas são duplo mutantes heterozigóticas. M - marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III (nzytech). C(-) - controlo negativo.

3.2 Viabilidade do pólen e crescimento do tudo polínico

Dificuldades na obtenção de duplos mutantes entre a linha NEPA e as restantes linhas mutantes, levantou a questão se a mutação em causa estaria de alguma forma relacionada com esta dificuldade e, portanto, se poderíamos estar perante um fenótipo interessante

para a caracterização funcional do gene. Assim, optou-se por avaliar a viabilidade do pólen através da cultura *in vitro* de grãos de pólen e também observar o crescimento *in vivo* do tubo polínico.

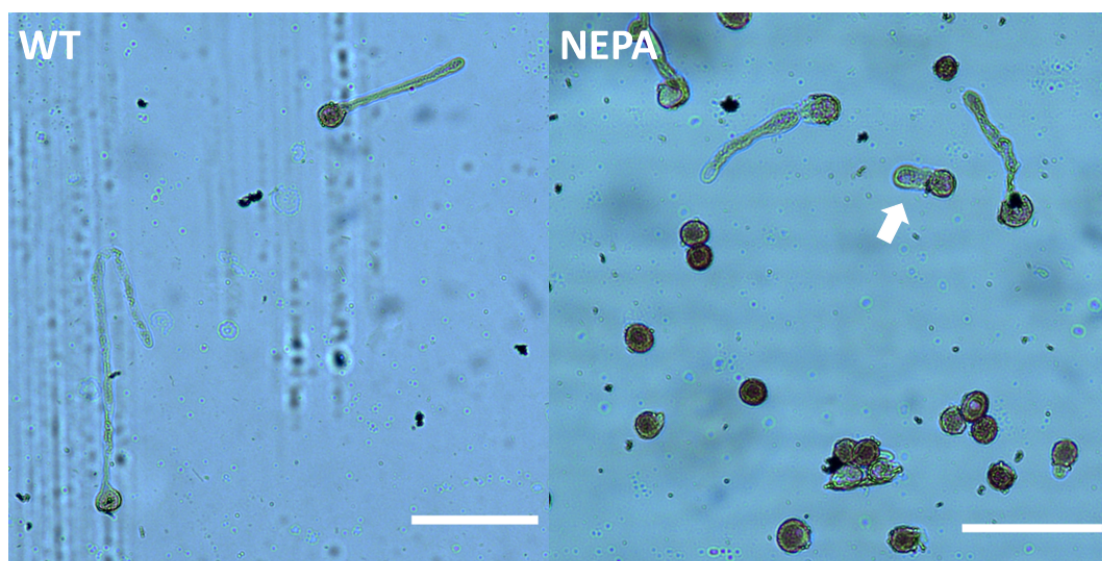


Figura 3.3: Germinação *in vitro* de grãos de pólen da linha mutante NEPA de *A. thaliana*. Escala: 100 μ m.

As taxas de germinação dos grãos de pólen foram bastante baixas relativamente ao que seria expectável (acima de 70% para WT), porém muito semelhantes para ambas as linhas (entre 10 a 15%). Por outro lado, ao observar os tubos polínicos dos grãos de pólen germinados, foram detetadas diferenças morfológicas, representadas na figura 3.3. Particularmente, os tubos polínicos da linha NEPA apresentaram um aspeto mais alargado comparativamente aos tubos polínicos da linha WT.

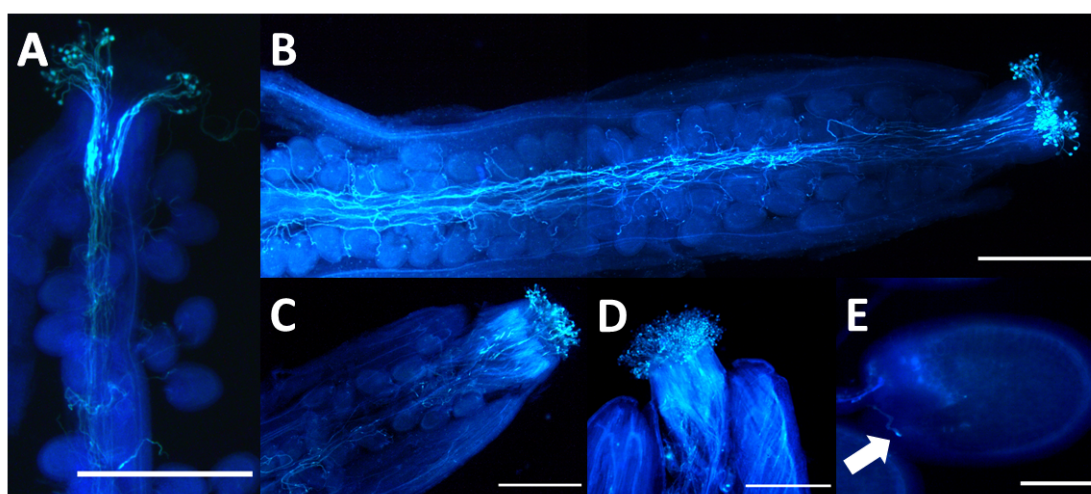


Figura 3.4: Crescimento *in vivo* dos tubos polínicos em cruzamentos com a linha mutante NEPA. (A) Autopolinização WT. (B) Autopolinização da linha mutante NEPA. (C) Polinização controlada NEPAxMT2B. (D) Polinização controlada MT5BxNEPA. (E) Tubo polínico a entrar no ovário. Escalas: (A-D) 500 μ m, (E) 100 μ m.

O crescimento *in vivo* dos tubos polínicos foi avaliado através do método de coloração da calose, presente nas paredes celulares dos tubos polínicos, com azul de anilina. Neste ensaio, foram utilizados pistilos da linha NEPA autopolinizados, assim como pistilos previamente sujeitos à polinização cruzada entre a linha NEPA e as linhas MT2B e MT5B. As imagens foram obtidas num microscópio de fluorescência e algumas delas podem ser observadas na figura 3.4.

Neste caso, não foi detetada nenhuma anomalia. Tanto as amostras obtidas da linha mutante autopolinizada (figura 3.4B), como de cruzamentos (figura 3.4C-D) apresentaram germinação do pólen no estigma e conseqüente crescimento dos tubos polínicos ao longo do tecido de transmissão até atingir o ovário (figura 3.4E), tal como se verificou para a linha WT.

3.3 Análise do desenvolvimento

Nesta secção são apresentados todos os resultados relativos ao desenvolvimento de plantas mutantes para genes que codificam metiltransferases de tRNA/rRNA pertencentes à família SpoU em *A. thaliana*, assim como de plantas WT.

Foram feitas 10 réplicas biológicas, cada uma com 10 sementes, germinadas verticalmente, em placas de Petri quadradas de 12 cm, e submetidas a um período de estratificação de 3 dias. No caso da análise da taxa de desenvolvimento na fase *ex vitro* foram utilizadas apenas 40 plantas por linha e, para a análise das siliquas, foram utilizadas 25 siliquas por linha (5 por planta, 5 plantas por linha).

Ao longo do desenvolvimento das plantas foram analisados diferentes parâmetros, nomeadamente, a taxa de germinação, taxa de desenvolvimento, desenvolvimento radicular (comprimento da raiz principal, número de raízes laterais e densidade de pelos radiculares) e desenvolvimento das siliquas (área, número total de sementes por siliqua e percentagem de sementes potencialmente viáveis).

Note-se que, os resultados apresentados para a linha duplo mutante MT2BxMT5B são para sementes obtidas de plantas heterozigóticas para as inserções de T-DNA, pelo que o genótipo apresenta variações ao nível dos genes em estudo.

3.3.1 Taxa de germinação

A análise da germinação foi feita através da análise da evolução da taxa de germinação ao longo do tempo e da taxa total de germinação ao fim de 14 dias.

Após serem colocadas em condições de crescimento, as amostras foram observadas diariamente até ao 14^o dia após a sementeira. Deste modo, foi possível seguir a evolução da taxa de germinação ao longo do tempo, o que pode ser observado na figura 3.5A. Como

se pode ver, as linhas NEPA e MT2BxMT5B atingem taxas de germinação mais elevadas que as restantes, atingindo 100% de germinação ao 6^o e ao 7^o dia, respetivamente. É também possível observar que a linha WT, ao 4^o dia após a sementeira, apresenta uma taxa de germinação de 15%, o que é consideravelmente superior quando comparada com as restantes linhas, que apresentam taxas inferiores a 5%.

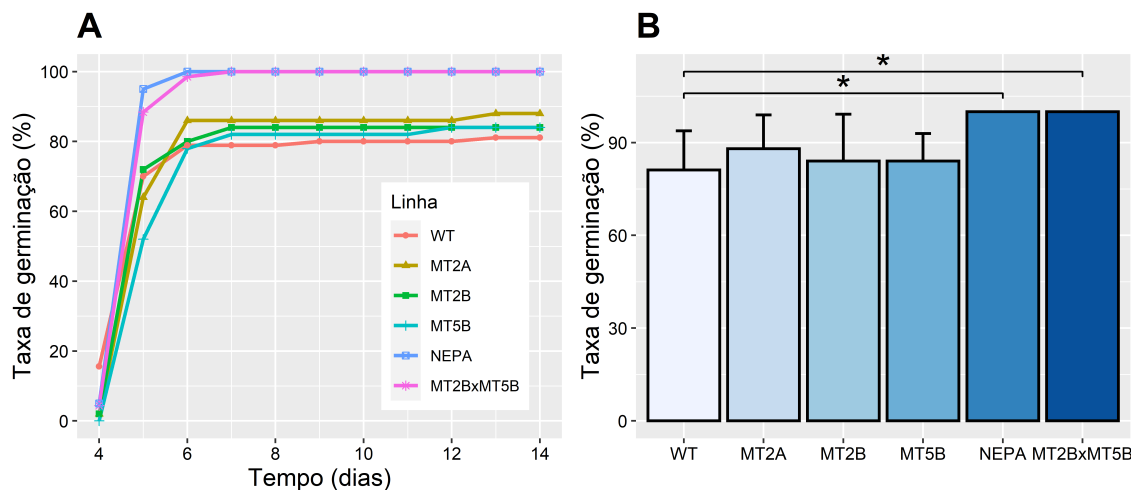


Figura 3.5: Taxa de germinação de sementes de *A. thaliana* mutantes para genes da família SpoU. (A) Evolução da taxa de germinação ao longo do tempo. (B) Taxa de germinação ao fim de 14 dias após a sementeira. Diferenças significativas entre a linha WT e as linhas NEPA e MT2BxMT5B através do teste de Tukey: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Foi também analisada a taxa total de germinação ao fim de 14 dias e cujos resultados são apresentados na figura 3.5B. Esta abordagem foi utilizada com o objetivo de proceder a uma análise estatística de forma a verificar se as diferenças entre as taxas de germinação das diferentes linhas eram significativas. O teste de Tukey revelou uma diferença significativa entre a linha WT e as linhas NEPA e MT2BxMT5B.

3.3.2 Taxa de desenvolvimento

A taxa de desenvolvimento foi avaliada através de um ensaio constituído por duas fases: a fase *in vitro* e a fase *ex vitro* (em substrato).

Tal como já foi referido anteriormente, as amostras foram observadas diariamente, até ao 14.^o após a sementeira (fase *in vitro*). Durante esse período de observações, foram registados os estádios de desenvolvimento das plântulas, de acordo com a figura 3.6A. Posteriormente, as plântulas foram passadas para substrato e as observações passaram a ser feitas de 2 em 2 dias até todas as plantas possuírem, pelo menos, uma flor aberta (fase *ex vitro*) e registaram-se os estádio de desenvolvimento das plantas, de acordo com a figura 3.6B. Por questões de espaço, na fase *ex vitro*, não foi possível utilizar a totalidade das amostras. Assim, foram selecionadas, de forma aleatória, 40 amostras por linha para essa fase.

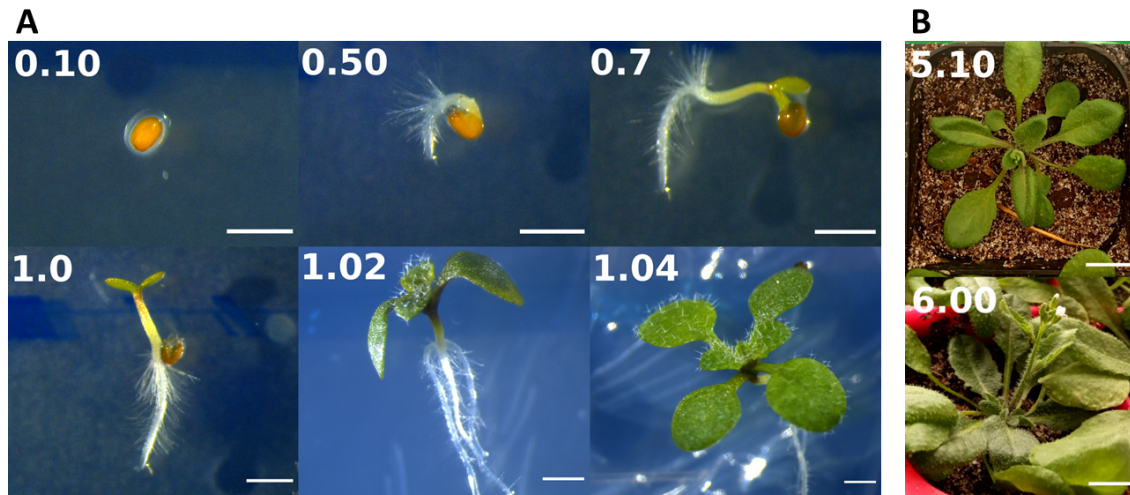


Figura 3.6: Estádios de desenvolvimento de *A. thaliana*, baseado em Boyes *et al.* (2001). (A) Estádios considerados para a fase *in vitro*: 0.10 - Embebição da semente; 0.50 - Emergência da radícula; 0.7 - Emergência do hipocótilo e dos cotilédones; 1.0 - cotilédones totalmente abertos; 1.02 - 2 folhas da roseta > 1 mm; 1.04 - 4 folhas da roseta > 1 mm. Escala: 1 mm (B) Estádios considerados para a fase *ex vitro*: 5.10 - primeiro botão floral visível; 6.00 - primeira flor aberta. Escala: 1 cm

Como se pode observar na figura 3.7, na fase *in vitro*, os resultados foram bastante semelhantes entre as linhas WT, MT2A, MT2B e MT5B, tendo as plântulas demorado, em média, 13.4 dias para atingir o estágio 1.04. Por outro lado, as plântulas das linhas NEPA e MT2BxMT5B apresentaram um desenvolvimento mais rápido, tendo demorado, em média, 12.3 e 12.7 dias, respectivamente, para atingir o mesmo estágio de desenvolvimento.

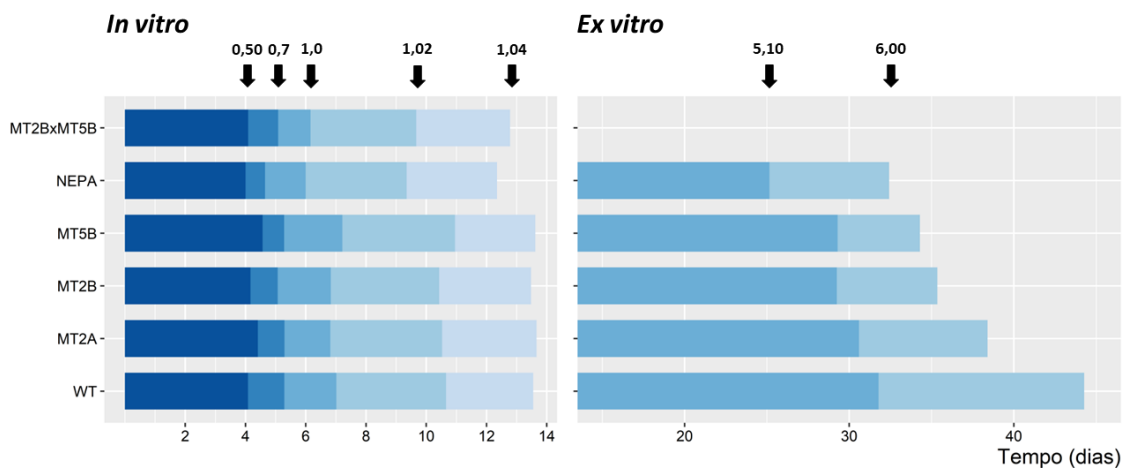


Figura 3.7: Taxa de desenvolvimento de linhas mutantes para genes da família SpoU de *A. thaliana* para a fase *in vitro* e para a fase *ex vitro*.

Relativamente à fase *ex vitro*, cujos resultados também podem ser observados na figura 3.7, as linhas mutantes, de forma geral, atingiram o estágio 6.00 mais rapidamente que a linha WT, o que se deveu, maioritariamente, ao tempo decorrido entre os estádios 5.10 e

6.00. Enquanto a linha WT demorou 31.7 dias a atingir o estágio 5.10 e 44.2 dias para atingir o estágio 6.00, as linhas mutantes MT2A, MT2B e MT5B demoraram cerca de 30 dias e entre 35-38 dias para atingir cada um dos estádios. A linha NEPA, no entanto, diferenciou-se das restantes linhas mutantes ao atingir o estágio 5.10 após 25 dias, ou seja, cerca de 5 dias antes que as restantes linhas.

Para fase *ex vitro*, não são apresentados dados relativos à linha MT2BxMT5B, dado que, por questões de tempo, não foi possível concluir esta fase do ensaio para a linha referida.

3.3.3 Desenvolvimento radicular

A análise do desenvolvimento radicular foi feita ao 14.^o dia após a sementeira e os parâmetros avaliados foram o comprimento da raiz principal, o número de raízes laterais e a densidade de pelos radiculares.

Importa salientar que, para esta análise, foram utilizadas apenas plântulas que se encontravam no mesmo estágio de desenvolvimento, especificamente no estágio 1.04 (4 folhas da roseta > 1 mm), de forma a que as diferenças encontradas fossem, efetivamente, referentes a diferenças no desenvolvimento radicular e não resultantes de assincronias no desenvolvimento das diferentes linhas.

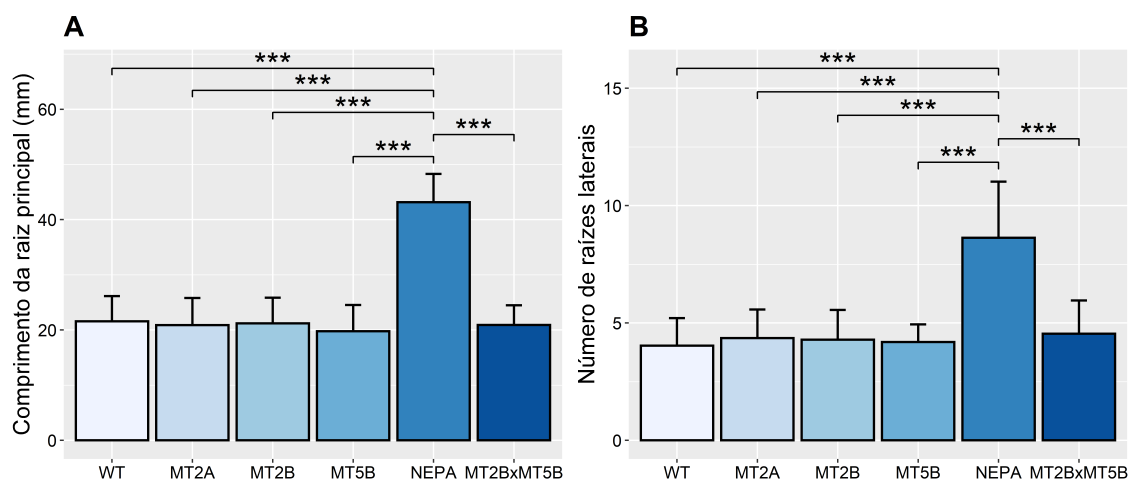


Figura 3.8: Análise do desenvolvimento radicular de linhas mutantes para genes da família SpoU de *A. thaliana*. O comprimento médio da raiz principal (A) e o número médio de raízes laterais (B) das linhas mutantes e da linha WT foram comparados, verificando-se diferenças significativas entre a linha NEPA e as restantes linhas, em ambos os casos. Diferenças significativas através do teste de Tukey: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Na figura 3.8 são apresentados os resultados para o comprimento da raiz principal (figura 3.8A) e para o número de raízes laterais (figura 3.8B). A linha NEPA apresentou, em média, 43.1 mm para o comprimento da raiz principal e 8.6 raízes laterais, o que é significativamente maior comparado com as restantes linhas, que apresentaram raízes principais com comprimentos de cerca de 20.7 mm e cerca de 4 raízes laterais por plântula.

Para perceber a relação entre as duas variáveis, fez-se uma análise de correlação que é apresentada no gráfico da figura 3.9. É possível verificar que existe uma ligeira tendência para o número de raízes laterais aumentar com o aumento do comprimento da raiz principal, embora isso não aconteça com as linhas MT2B e MT5B. É possível também observar que a maioria das amostras da linha NEPA se encontram acima da média, tanto no caso do comprimento da raiz principal, como do número de raízes laterais. Pelo contrário, a maioria das amostras das restantes linhas, encontra-se abaixo da média para ambas as variáveis, à exceção de algumas amostras da linha MT2BxMT5B que apresentaram valores acima da média para o número de raízes laterais e, portanto, superiores aos obtidos para as linhas mutantes simples MT2B e MT5B.

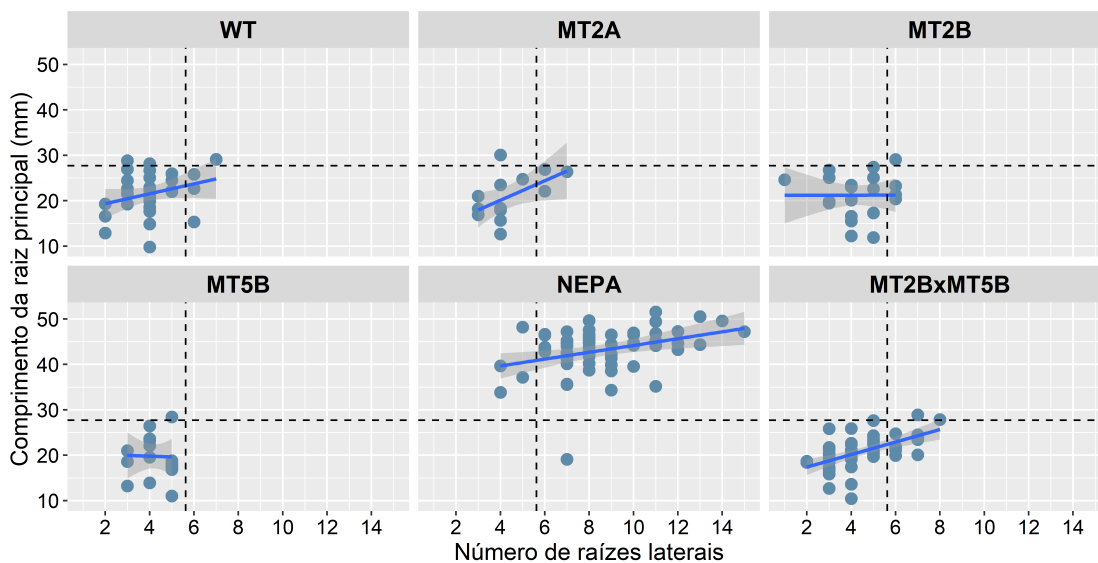


Figura 3.9: Correlação entre o comprimento da raiz principal e o número de raízes laterais de linhas mutantes para genes da família SpoU de *A. thaliana*.

Como foi referido anteriormente, um outro parâmetro também utilizado para avaliar o desenvolvimento da raiz foi a densidade de pelos radiculares. É, no entanto, importante referir que esta análise foi meramente qualitativa. Na figura 3.10A, estão presentes imagens que mostram as diferenças encontradas entre as linhas mutantes e a linha WT.

De forma geral, as linhas mutantes simples parecem possuir, mais frequentemente que a linha WT, zonas da raiz desprovidas de pelos radiculares ou com pelos radiculares com comprimento bastante inferior ao normal, especialmente a linha NEPA.

No caso da linha MT2BxMT5B, esta análise foi mais difícil, uma vez que as amostras utilizadas eram provenientes de sementes obtidas de plantas heterozigóticas para as inserções de T-DNA e, portanto, apresentavam variações genotípicas ao nível dos genes em causa. Ainda assim, foi possível verificar a existência de plantas com fenótipos não só semelhantes às linhas mutantes simples, mas também mais evidentes, nomeadamente com áreas com ausência de pelos radiculares bastante maiores, como se pode ver na figura 3.10B.

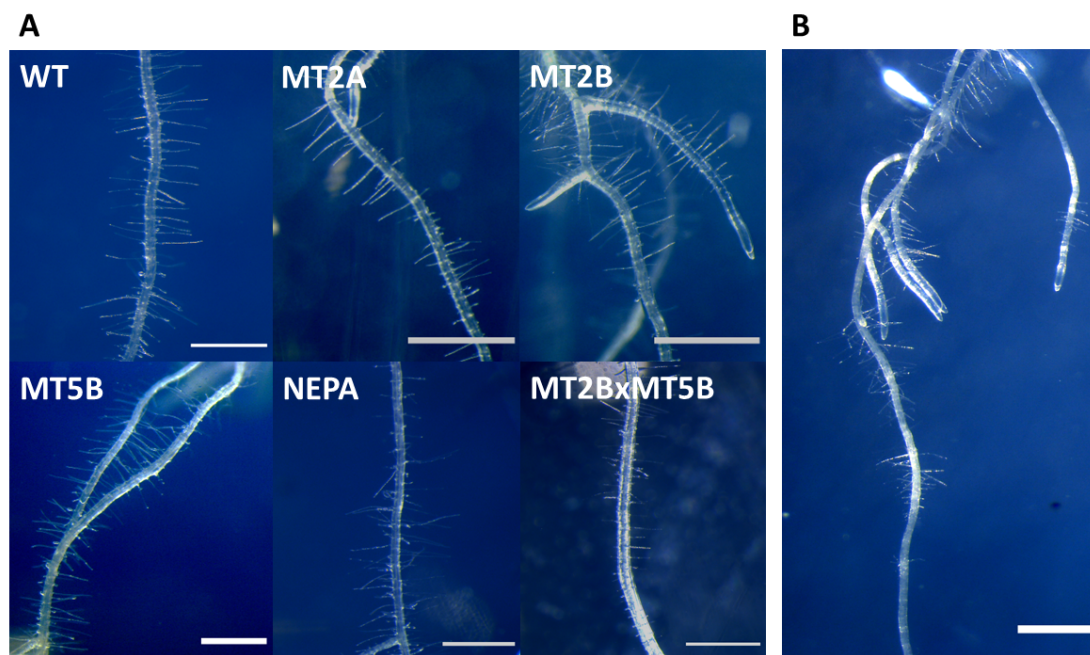


Figura 3.10: Pelos radiculares de linhas mutantes para genes da família SpoU de *A. thaliana*. (A) Indivíduos representativos de cada linha. (B) Indivíduo com fenótipo acentuado da linha MT2BxMT5B. Escala: 1 mm

3.3.4 Desenvolvimento das síliquas

Para a análise do desenvolvimento das síliquas, foi avaliada a área da síliqua (calculada no *software* ImageJ), o número total de sementes por síliqua e a percentagem de sementes potencialmente viáveis, em que foram utilizadas síliquas de plantas com aproximadamente 7 semanas e que se encontravam na fase de desenvolvimento 17 (síliquas verdes após queda de todos os órgãos florais) segundo Smyth *et al.* (1990).

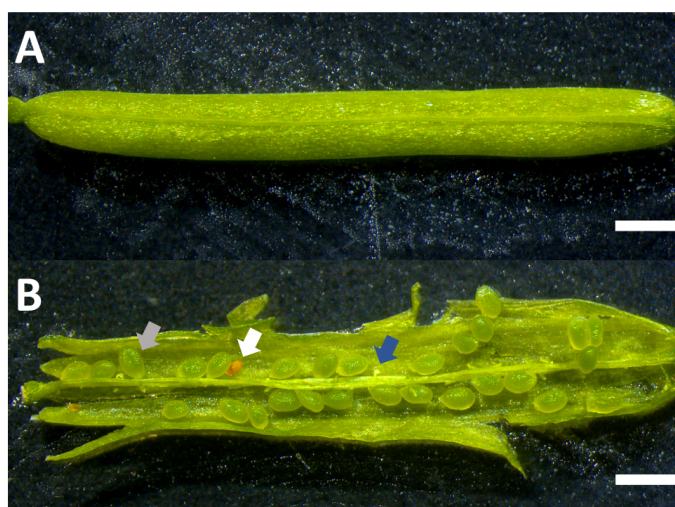


Figura 3.11: Síliqua. (A) Exemplo de imagem utilizada para determinar a área das síliquas, (B) síliqua aberta. Seta cinzenta, semente potencialmente viável; seta branca, semente sem embrião; seta azul, semente abortada. Baseado em Rius *et al.* (2008). Escala: 1 mm.

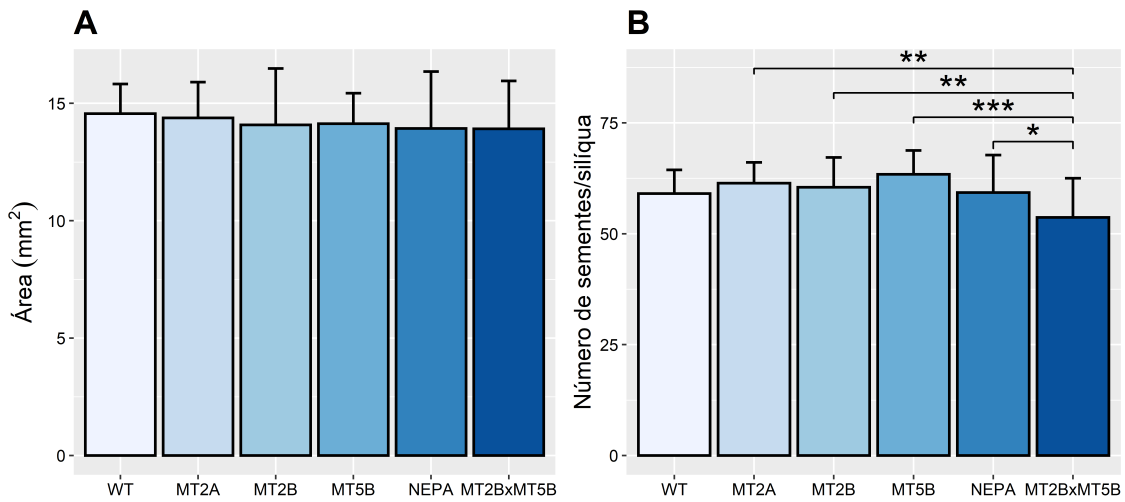


Figura 3.12: Análise do desenvolvimento de siliquas de linhas mutantes para genes da família SpoU de *A. thaliana*. (A) Área média das siliquas. (B) Número total de sementes por siliqua. Diferenças significativas entre a linha duplo mutante MT2BxMT5B e as linhas mutantes simples através do teste de Tukey: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A figura 3.12 mostra os resultados obtidos para a área das siliquas (figura 3.12A) e para o número total de sementes por siliqua (figura 3.12B). A média da área das siliquias não apresentou diferenças significativas entre as diferentes linhas, incluindo a linha MT2BxMT5B. No caso do número total de sementes por siliqua, também não foram encontradas diferenças significativas entre as linhas mutantes simples e a WT. No entanto, a linha duplo mutante MT2BxMT5B apresentou um número total de sementes por siliqua significativamente menor que as linhas mutantes simples.

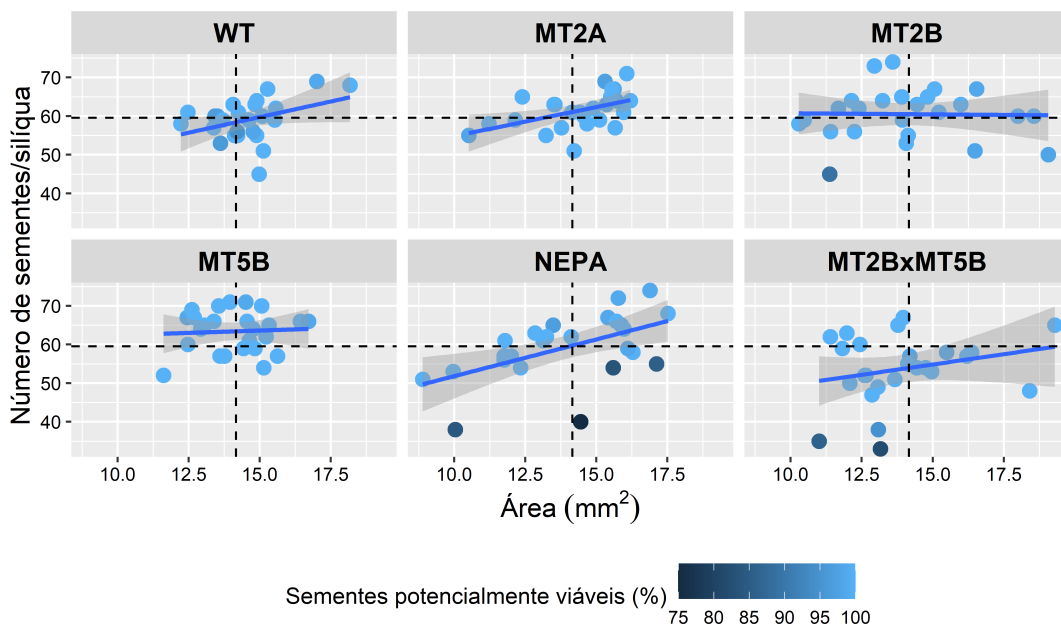


Figura 3.13: Correlação entre os diferentes parâmetros de análise do desenvolvimento das siliquas de linhas mutantes para genes da família SpoU de *A. thaliana*. As amostras estão coloridas de acordo com a porcentagem de sementes potencialmente viáveis.

Relativamente à percentagem de sementes viáveis, todas as linhas apresentaram, em média, uma taxa superior a 99%, pelo que não se verificaram diferenças significativas. No entanto, ao analisar a correlação entre as diferentes variáveis consideradas para o desenvolvimento das siliquas (figura 3.13), percebe-se que as siliquas com uma menor percentagem de sementes viáveis apresentam, de forma geral, uma menor área, assim como um menor número total de sementes por siliqua.

Na figura 3.13, é também possível verificar que o número total de sementes por siliqua tem tendência a aumentar com o aumento da área, embora isso não se verifique para as linhas MT2B e MT5B. Também é possível observar que, no caso das linhas WT, MT2A e MT5B, as amostras estão mais concentradas em torno da média, enquanto, no caso das linhas MT2B, NEPA e MT2BxMT5B, as amostras estão mais dispersas.

3.4 Resposta à indução de embriogénese somática

A indução de ES foi feita em sementes imaturas em que o embrião se encontrava, mais vulgarmente, na fase torpedo. Para este ensaio foram feitas 25 réplicas biológicas por linha, cada uma com 10 sementes imaturas. As diferentes respostas obtidas estão representadas na figura 3.14.

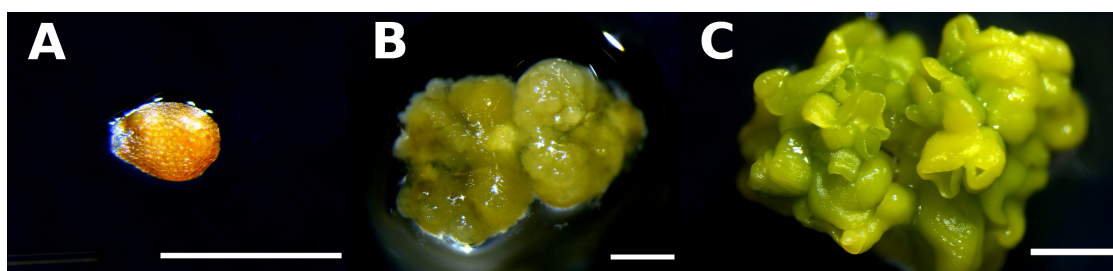


Figura 3.14: Tipos de resposta à indução de ES em sementes imaturas de linhas mutantes para genes da família SpoU de *A. thaliana*. (A) Ausência de resposta. (B) Formação de calo. (C) Formação de embriões somáticos. Escala: 1 mm

Os resultados foram registados passadas 4 semanas e são apresentados na figura 3.15. Mais uma vez, é importante referir que as sementes da linha duplo mutante MT2BxMT5B utilizadas neste ensaio foram obtidas de plantas heterozigóticas para ambas as inserções.

A linha NEPA apresenta a maior taxa média de explantes que não responderam à indução (cerca de 40%) ao contrário dos explantes da linha MT2BxMT5B, assim como das linhas MT2B, MT5B e WT que apresentaram taxas menores de ausência de resposta.

Na formação de calo, a linha MT2BxMT5B destacou-se, apresentando uma percentagem superior às restantes linhas, embora essa diferença apenas seja estatisticamente significativa para a linha MT2A, que apresentou a taxa de explantes com formação de calo mais baixa.

Na formação de embrião, as linhas WT, MT2A, MT2B e MT5B apresentaram uma taxa

de resposta semelhante (entre os 30 e os 40%). A linha NEPA, por sua vez, foi a que apresentou a taxa de explantes com formação de embrião mais baixa (18%). Todavia, a linha MT2BxMT5B também apresentou uma taxa de formação de embrião baixa (28%), nomeadamente quando comparada com as linhas mutantes simples MT2B e MT5B.

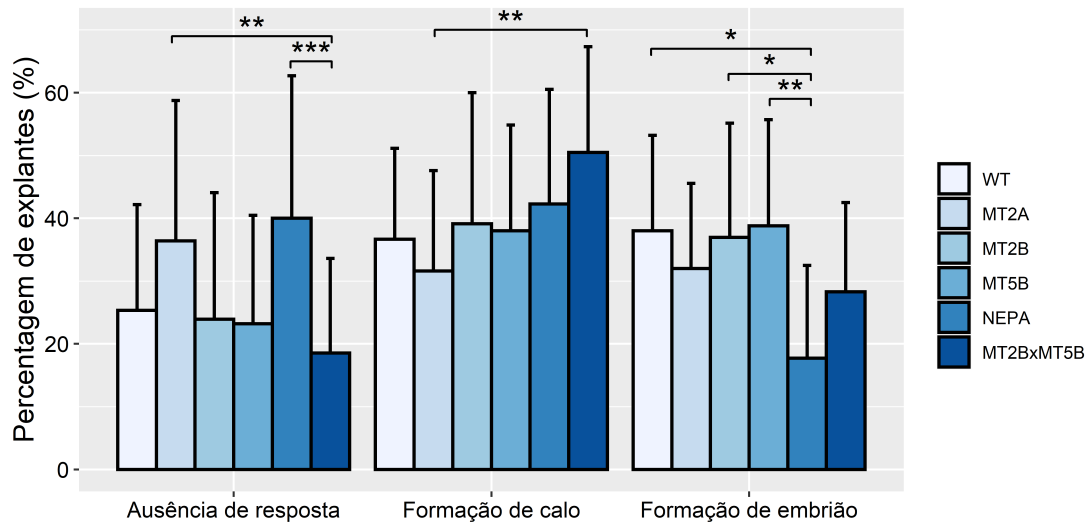


Figura 3.15: Resposta das linhas mutantes para genes da família SpoU de *A. thaliana* à indução de ES. As percentagens das respostas das diferentes linhas foram comparadas através do teste de Tukey. Na ausência de resposta, foram encontradas diferenças significativas entre a linha MT2BxMT5B e as linhas MT2A e NEPA. Na formação de calo apenas houve diferenças significativas entre as linhas MT2BxMT5B e MT2A. Na formação de embrião verificaram-se diferenças significativas entre a linha NEPA e as linhas WT, MT2B e MT5B. Diferenças significativas através do teste de Tukey: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Capítulo 4

Discussão

4.1 Desenvolvimento do tubo polínico em linhas mutantes para o gene *AT4G15520*

A obtenção de linhas duplo mutantes para genes da família SpoU de metiltransferases de tRNA/rRNA foi um dos objetivos deste trabalho, o que foi conseguido para as linhas MT2B e MT5B, mutantes para os genes *AT4G17610* e *AT5G15390*, respetivamente. No entanto, nenhum duplo mutante foi obtido com a linha NEPA, mutante para o gene *AT4G15520*, apesar de ter sido feito um grande número de polinizações.

Deste modo, optou-se por analisar a germinação *in vitro* do pólen, assim como o crescimento *in vivo* do tubo polínico, para a linha NEPA, para perceber se a mutação poderia estar a interferir com os cruzamentos.

A cultura *in vitro* dos grãos de pólen apresentou taxas de germinação bastante baixas, porém muito semelhantes entre a linha NEPA e a WT, pelo que não se pode deduzir que seja devido à mutação. Segundo Boavida e McCormick (2007), estas taxas de germinação, em *A. thaliana*, podem ser obtidas quando algumas condições de cultura são negligenciadas, nomeadamente a temperatura. Neste trabalho, a cultura foi feita à temperatura ambiente, sendo esta de cerca de 25 °C, quando o ideal seria 22 °C, pelo que este poderá ter sido um dos fatores que contribuiu para a taxa de germinação obtida.

Por outro lado, apesar das taxas de germinação terem sido semelhantes, foram detetadas diferenças morfológicas nos tubos polínicos. Alguns grãos de pólen da linha NEPA apresentaram tubos polínicos com um aspeto mais alargado comparativamente com os da linha WT. Uma possível explicação é esses tubos polínicos serem diplóides e não haplóides como seria expectável, pelo que seria interessante analisar o nível de ploidia desta linha mutante. Ainda assim, seria pertinente otimizar o protocolo de cultura *in vitro* de grãos de pólen realizado neste trabalho, de forma a serem obtidas taxas de germinação mais elevadas e, assim, ser possível fazer uma análise mais robusta da morfologia dos tubos polínicos.

O crescimento *in vivo* do tubo polínico foi também analisado, através da coloração da calose, presente nas paredes dos tubos polínicos, com azul de anilina. Este método permite a observação do crescimento do tubo polínico desde o estigma, local onde ocorre a germinação, até entrar no saco embrionário. Todavia, neste ensaio não foram detetadas quaisquer anomalias, pelo que a interação entre os tecidos femininos e masculinos não parece ser afetada pela mutação. Ainda assim, a realização de um ensaio semi-*in vivo* poderia ser interessante para complementar este trabalho.

Tendo em conta estes resultados e, apesar dos resultados obtidos para a cultura *in vitro* de grãos de pólen, a mutação não parece interferir com a normal reprodução das plantas da linha NEPA, uma vez que esta não só apresentou uma taxa de germinação de 100%, como o desenvolvimento das síliquas não foi afetado. Ainda assim, tendo em conta que a linha duplo mutante MT2BxMT5B apresentou um número total de sementes por síliqua inferior às restantes linhas, seria importante realizar estes ensaios também para essa linha.

4.2 Envolvimento das SpoU metiltransferases no desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*

O objetivo deste trabalho foi estudar a família SpoU de metiltransferases de tRNA/rRNA em *A. thaliana*, através de técnicas de genética reversa, para perceber o seu envolvimento no desenvolvimento vegetal, assim como na resposta à indução de ES, uma vez que estes resultados poderiam contribuir para a compreensão do papel da NEP-TC na indução de ES em tamarilho.

Atualmente, sabe-se que as funções do RNA vão muito além da síntese proteica, estando este envolvido em diversos processos biológicos como a regulação genética e a resposta ao stresse. Esta diversidade de funcionalidades, deve-se, sobretudo, a modificações pós-transcricionais que são uma importante fonte de diversidade química e estrutural do RNA (Hu *et al.*, 2019).

Hoje, são conhecidas mais de 150 modificações do RNA, sendo a metilação a modificação mais frequente (Hu *et al.*, 2019). Existem diversas metiltransferases de RNA que já foram caracterizadas em plantas, particularmente em *A. thaliana*, e que estão relacionadas com o desenvolvimento vegetal. A proteína mRNA adenosine methylase (MTA), por exemplo, é uma metiltransferase que atua no RNA mensageiro (mRNA) e que é responsável pela formação de N⁶-metiladenosina. Estudos realizados com linhas *knock-out* demonstraram que esta é essencial para o normal desenvolvimento embrionário, uma vez que, nos mutantes, o progresso de desenvolvimento do embrião cessava na fase globular (Zhong *et al.*, 2008).

Apesar de existir mais informação disponível relativamente a metiltransferases de mRNA, as metilações não são restritas a este tipo de transcritos, pelo contrário, estão presentes em todos os tipo de RNA e é o tRNA que possui um maior número de metilações, seguido

do rRNA, e algumas das quais também estão relacionadas ao desenvolvimento das plantas (Motorin e Helm, 2011). A proteína tRNA-specific methyltransferase 4B (TRM4B), responsável pela formação de 5-metilcitosina em *A. thaliana*, é uma metiltransferase de tRNA que está envolvida no desenvolvimento radicular (Cui *et al.*, 2017). A tRNA methyltransferase 5A (TRM5A), também uma metiltransferase de tRNA, está envolvida no crescimento vegetativo e reprodutivo de *Arabidopsis*. Linhas mutantes para esta proteína demonstraram uma iniciação foliar mais tardia, assim como atraso na floração e um menor comprimento da raiz principal (Guo *et al.*, 2019). Assim, torna-se evidente a importância que as metiltransferases de RNA apresentam no desenvolvimento das plantas.

No presente trabalho, foram estudados três genes da família SpoU de metiltransferases de tRNA/rRNA. Esta família de proteínas está associada à Nm, que contribui para a estabilização da estrutura tridimensional do RNA e, portanto, para a eficiência da síntese proteica (Liang *et al.*, 2009; Motorin e Helm, 2011).

Os resultados obtidos apontam para um envolvimento das metiltransferases da família SpoU no desenvolvimento de *Arabidopsis*, nomeadamente, ao nível do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, assim como no desenvolvimento radicular e das siliquis.

A linha NEPA, mutante para o gene codificante para a ortóloga da NEP-TC (*AT4G15520*), foi a que apresentou fenótipos mais evidentes, exibindo um desenvolvimento foliar e floral precoce. No entanto, no caso do desenvolvimento floral, os resultados foram transversais a todas as linhas mutantes. Os resultados indicam também uma possível existência de redundância genética entre os genes *AT4G17610* e *AT5G15390*, uma vez que a linha duplo mutante para estes genes, MT2BxMT5B, apresentou também um desenvolvimento foliar precoce, o que não aconteceu com as linhas mutantes simples MT2B e MT5B.

Também no desenvolvimento radicular, a linha NEPA destacou-se ao apresentar um comprimento da raiz principal bastante superior à linha WT, assim como um maior número de raízes laterais. Este resultado vai de encontro ao obtido por Correia *et al.* (2019), em que uma linha de tamarilho *knock-down* para a NEP-TC apresentou um desenvolvimento mais acentuado de raízes laterais quando comparada com a linha controlo (figura 1.7A). Esse fenótipo não foi, no entanto, consistente entre as diferentes linhas de tamarilho utilizadas nesse estudo. Ainda assim, e tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, parece haver um envolvimento da NEP-TC no desenvolvimento radicular. De forma a validar estes resultados, seria importante a utilização de mais do que uma linha mutante para o gene *AT4G15520*, o que não foi possível neste trabalho, tendo-se utilizado apenas a linha NEPA. Seria também interessante a utilização de linhas *knock-out* para a NEP-TC em tamarilho, que poderão ser obtidas através de técnicas de edição genética como a CRISPR, uma vez que nas linhas *knock-down*, a função da proteína pode ser assegurada, apesar dos baixos níveis de expressão. Além disso, não pode ser descartada a possibilidade de existência de redundância genética no tamarilho.

Ainda relativamente ao desenvolvimento radicular, as metiltransferases de tRNA/rRNA da

família SpoU também parecem estar envolvidas no desenvolvimento dos pelos radiculares. De forma geral, os indivíduos das linhas mutantes apresentaram frequentemente zonas da raiz com ausência de pelos radiculares, ou com pelos com menor comprimento. No entanto, esta análise foi apenas qualitativa. Assim, de forma a corroborar estes resultados, seria importante proceder-se a uma análise quantitativa, tal como foi feito em Stetter *et al.* (2017), em que foi determinada não só a densidade de pelos radiculares, mas também o comprimento dos mesmos.

O desenvolvimento das siliquas também foi avaliado neste trabalho. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as linhas mutantes simples e a linha WT. Porém, a linha MT2BxMT5B apresentou um menor número total de sementes por siliqua, apesar dessa diferença não ser significativa quando comparada com a linha WT. Mais uma vez, este resultado vem apontar para a existência de redundância genética entre os dois genes. Ainda que estes resultados indiquem um envolvimento das SpoU metiltransferases no desenvolvimento das siliquas, a viabilidade das sementes não parece ser afetada, o que é verificado pela taxa de germinação de 100% obtida para a linha duplo mutante. Não obstante, estes resultados terão de ser confirmados com siliquas obtidas de plantas homozigóticas para as inserções em ambos os genes.

4.3 Papel das SpoU metiltransferases na embriogénese somática de *Arabidopsis thaliana*

A ES é uma técnica de micropopagação que permite a obtenção de um grande número de plantas geneticamente semelhantes, mas que também se apresenta como uma importante ferramenta para o estudo do desenvolvimento embrionário zigótico (Canhoto, 2010).

Durante a indução de ES, as células passam por um processo de reprogramação celular que leva à totipotência, pelo que a síntese proteica assume um papel fundamental na aquisição de competência embriogénica (Su *et al.*, 2021).

Atualmente, já são conhecidos vários fatores que contribuem para a regulação da expressão genética durante a indução de ES. Um desses fatores é a metilação do DNA que é particularmente importante na desdiferenciação celular (Salaün *et al.*, 2021). Por outro lado, não existe qualquer informação relativa ao papel da metilação do RNA no processo de ES. Ainda assim, sabe-se que as modificações pós-transcricionais apresentam um papel importante na regulação genética em diversos processos biológicos que vão desde o desenvolvimento vegetal até à adaptação ao stresse. Deste modo, é expectável que as modificações do RNA também estejam envolvidas na indução de ES.

Correia *et al.* (2019) propuseram, pela primeira vez, que uma metiltransferase de RNA possa estar envolvida na aquisição de competência embriogénica durante a indução de ES em tamarilho. Esta proteína é consistentemente encontrada em CNEs e está ausente em

CEs, pelo que pode ser utilizada como marcador molecular das células não-embriogénicas de tamarilho. Estes resultados, juntamente com outros obtidos para linhas *knock-down* para a NEP-TC que apresentaram taxas de indução ligeiramente superiores à linha controlo, levaram à hipótese de que esta proteína poderá ter um papel inibidor no processo de indução de ES.

Neste trabalho, procurou-se perceber o envolvimento de metiltransferases de tRNA/rRNA da família SpoU durante a ES em *Arabidopsis thaliana*. Esta planta modelo possui várias proteínas da mesma família da NEP-TC, nomeadamente, uma ortóloga que, provavelmente, terá funções semelhantes à proteína encontrada nos CNEs de tamarilho. Assim, os resultados obtidos neste trabalho poderão ser importantes para a caracterização funcional da NEP-TC.

Os resultados obtidos não foram, no entanto, ao encontro da hipótese de que as metiltransferases de tRNA/rRNA da família SpoU poderão ter um papel inibidor na aquisição de competência embriogénica. As linhas MT2A, MT2B e MT5B apresentaram taxas de formação de embrião semelhantes à linha WT. Por outro lado, a linha NEPA apresentou uma taxa significativamente menor. O mesmo aconteceu para a linha MT2BxMT5B, que foi ao encontro dos resultados obtidos para a linha NEPA. Mais uma vez, estes resultados apontam para a possibilidade de existência de redundância genética entre os genes *AT4G17610* e *AT5G15390*.

Estudos de indução de ES em linhas *knock-down* para a NEP-TC em tamarilho, apresentados em Correia *et al.* (2019), não apresentaram resultados consistentes. Das três linhas usadas nesse trabalho, duas apresentaram taxas de indução de ES ligeiramente superiores à linha controlo, mas uma linha (TV3) apresentou taxas de indução significativamente menores (figura 1.7B), o que vai de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho.

Assim, serão necessários mais ensaios de forma a confirmar ou refutar a hipótese do papel inibidor da NEP-TC na ES. Mais uma vez, seria importante a utilização de duas linhas mutantes para o gene *AT4G15520*, uma vez que neste trabalho apenas foi usada a NEPA, mas também a obtenção de plantas MT2BxMT5B homocigóticas para ambas as inserções, assim como uma linha triplo mutante para os genes aqui estudados. Tal como referido na secção 4.2, a obtenção de linhas *knock-out* para a NEP-TC em tamarilho também seria interessante.

Tendo em conta todos os resultados obtidos até hoje, é necessário considerar outras hipóteses para o papel da NEP-TC na indução de ES. Na verdade, para além de estar presente nos CNEs, esta proteína também é expressa durante as fases iniciais de indução, estando apenas ausente nos CEs (figura 1.5). Assim, uma possibilidade é a proteína ser importante para a desdiferenciação celular, deixando de ser necessária quando as células adquirem capacidade embriogénica. Isto é plausível tendo em conta que as metilações do tRNA/rRNA contribuem para uma maior eficácia da síntese proteica que é um fator fundamental durante a aquisição de competência embriogénica (Motorin e Marchand, 2018; Su *et al.*, 2021).

Capítulo 5

Conclusão

No presente trabalho, procurou-se fazer a caracterização funcional de metiltransferases de tRNA/rRNA da família SpoU em *Arabidopsis thaliana*, com o intuito de que os resultados aqui obtidos pudessem ajudar na elucidação do papel da NEP-TC na fase de indução de ES em tamarilho.

Uma das estratégias utilizadas para atingir o objetivo proposto foi a obtenção de duplos mutantes, de forma a evidenciar os possíveis fenótipos derivados das mutações, o que foi conseguido para os genes *AT4G17610* e *AT5G15390*. Vários resultados obtidos com a linha duplo mutante, apontam para a existência de redundância genética entre esses genes, o que era expectável.

De forma geral, os resultados obtidos mostram o envolvimento das proteínas da família SpoU no desenvolvimento de *A. thaliana*, assim como na resposta à indução de ES. Para além disso, apontam também para um possível envolvimento da proteína ortóloga da NEP-TC, codificada pelo gene *AT4G15520*, na morfologia do tubo polínico.

Ainda que a reprodução sexuada não pareça ser afetada, tendo em conta os resultados obtidos para a taxa de germinação e para o desenvolvimento das síliquas, os tubos polínicos da linha mutante para o gene *AT4G15520* apresentaram diferenças morfológicas comparativamente aos da linha WT.

Ao nível do desenvolvimento vegetal, as linhas mutantes apresentaram um desenvolvimento vegetativo e reprodutivo mais precoce, assim como um desenvolvimento radicular mais acentuado, exceto no caso do desenvolvimento de pelos radiculares em que apresentaram menor densidade.

Relativamente à indução de ES, as linhas mutantes apresentaram uma menor capacidade de formar embriões somáticos. Assim sendo, estes resultados não sustentam os anteriormente obtidos para o tamarilho, pelo que ensaios mais profundos serão necessários.

5.1 Perspetivas futuras

Os resultados obtidos para a linha duplo mutante indicam, tal como se esperava, a existência de redundância genética entre os genes da família SpoU. Desta forma, o presente trabalho pode ser continuado tanto com a obtenção de novos duplo mutantes, mas também triplo mutantes, de forma a corroborar os resultados aqui obtidos.

É também importante investigar os resultados obtidos na cultura *in vitro* dos grãos de pólen, nomeadamente através da otimização do protocolo utilizado neste trabalho, para uma análise morfológica dos tubos polínicos mais aprofundada. Além disso, tendo em conta as características observadas, pode ser interessante analisar o nível de ploidia das linhas mutantes.

Futuramente, será também necessário validar estes resultados em tamarilho. Para isso, poderá obter-se linhas *knock-out* para a NEP-TC através de técnicas de edição genética como a CRISPR. Será também importante investigar a existência de outras proteínas da família SpoU em tamarilho que possam apresentar redundância genética com a NEP-TC.

Referências

- Ahn, J.-W., Kim, S. W., Liu, J. R. e Jeong, W.-J. (2011). VaSpoU1 (SpoU gene) may be involved in organelle rRNA/tRNA modification in *Viscum album*. *Plant Biotechnology Reports*, **5**:289–295.
- Alonso, J. M. e Stepanova, A. N. (2003). T-DNA mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Functional Genomics*, **236**:177–188.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R. e et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**:653–657.
- Anantharaman, V., Koonin, E. V. e Aravind, L. (2002a). Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Research*, **30**:1427–1464.
- Anantharaman, V., Koonin, E. V. e Aravind, L. (2002b). SPOUT: a class of methyltransferases that includes spoU and trmD RNA methylase superfamilies, and novel superfamilies of predicted prokaryotic RNA methylases. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **4**:71–75.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**:796–815.
- Boavida, L. C. e McCormick, S. (2007). Temperature as a determinant factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **52**:570–582.
- Boccaletto, P., Stefaniak, F., Ray, A., Cappannini, A., Mukherjee, S., Purta, E., Kurkowska, M., Shirvanizadeh, N., Destefanis, E., Groza, P., Avsar, G., Romitelli, A., Pir, P., Dassi, E., Conticello, S. G., Aguilo, F. e Bujnicki, J. M. (2021). MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2021 update. *Nucleic Acids Research*, **50**:D231–D235.
- Boschi-Muller, S. e Motorin, Y. (2013). Chemistry enters nucleic acids biology: enzymatic mechanisms of RNA modification. *Biochemistry*, **78**:1392–1404.

- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R. e Görlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, **13**:1499–1510.
- Bujnicki, J. M., Droogmans, L., Grosjean, H., Purushothaman, S. K. e Lapeyre, B. (2008). Bioinformatics-guided identification and experimental characterization of novel RNA methyltransferases. In Bujnicki, J. M. (Ed.), *Practical Bioinformatics*, pp. 139–168. Springer, Berlim.
- Canhoto, J., Lopes, M. e Cruz, G. (2005). Protocol of somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.). In Jain, S. M. e Gupta, P. K. (Eds.), *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, pp. 379–389. Springer, Holanda.
- Canhoto, J. M. (2010). Biotecnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Chan, C. T. Y., Dyavaiah, M., DeMott, M. S., Taghizadeh, K., Dedon, P. C. e Begley, T. J. (2010). A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS Genetics*, **6**:12.
- Chen, P., Jäger, G. e Zheng, B. (2010). Transfer RNA modifications and genes for modifying enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, **10**:201.
- Cheng, C.-Y., Krishnakumar, V., Chan, A. P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S. e Town, C. D. (2017). Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *The Plant Journal*, **89**:789–804.
- Correia, S., Alinho, A. T., Casimiro, B., Miguel, C. M., Oliveira, M., Veríssimo, P. e Canhoto, J. (2019). NEP-TC a rRNA methyltransferase involved on somatic embryogenesis of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). *Frontiers in Plant Science*, **10**:438.
- Correia, S., Lopes, M. L. e Canhoto, J. M. (2011). Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Trees*, **25**:1009–1020.
- Correia, S., Vinhas, R., Manadas, B., Lourenço, A. S., Veríssimo, P. e Canhoto, J. M. (2012). Comparative proteomic analysis of auxin-induced embryogenic and nonembryogenic tissues of the Solanaceous tree *Cyphomandra betacea* (tamarillo). *Journal of Proteome Research*, **11**:1666–1675.
- Correia, S. I. e Canhoto, J. M. (2012). Biotechnology of tamarillo (*Cyphomandra betacea*): From in vitro cloning to genetic transformation. *Scientia Horticulturae*, **148**:161–168.
- Cui, X., Liang, Z., Shen, L., Zhang, Q., Bao, S., Geng, Y., Zhang, B., Leo, V., Vardy, L. A., Lu, T., Gu, X. e Yu, H. (2017). 5-methylcytosine RNA methylation in *Arabidopsis Thaliana*. *Molecular Plant*, **10**:1387–1399.

- Cundliffe, E. e Thompson, J. (1979). Ribose methylation and resistance to thiostrepton. *Nature*, **278**:859–861.
- Decatur, W. A. e Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, **27**:344–351.
- Dimitrova, D. G., Teyssset, L. e Carré, C. (2019). RNA 2'-O-methylation (Nm) modification in human diseases. *Genes*, **10**:117.
- Edwards, K., Johnstone, C. e Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, **19**:1349.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis — stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1849**:385–402.
- Fischer, T. R., Meidner, L., Schwickert, M., Weber, M., Zimmermann, R. A., Kersten, C., Schirmeister, T. e Helm, M. (2022). Chemical biology and medicinal chemistry of RNA methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, **50**:4216–4245.
- Gamborg, O., Miller, R. e Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, **50**:151–158.
- Guo, Q., Ng, P. Q., Shi, S., Fan, D., Li, J., Zhao, J., Wang, H., David, R., Mittal, P., Do, T., Bock, R., Zhao, M., Zhou, W. e Searle, I. (2019). *Arabidopsis* TRM5 encodes a nuclear-localised bifunctional tRNA guanine and inosine-N1-methyltransferase that is important for growth. *PLoS ONE*, **14**:e0225064.
- Hamdane, D., Argentini, M., Cornu, D., Myllykallio, H., Skouloubris, S., Hui-Bon-Hoa, G. e Golinelli-Pimpaneau, B. (2011). Insights into folate/FAD-dependent tRNA methyltransferase mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**:36268–36280.
- Hori, H. (2017). Transfer RNA methyltransferases with a SpoU-TrmD (SPOUT) fold and their modified nucleosides in tRNA. *Biomolecules*, **7**:23–47.
- Hu, J., Manduzio, S. e Kang, H. (2019). Epitranscriptomic RNA methylation in plant development and abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*, **10**:500.
- Huala, E., Dickerman, A. W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., Hanley, D., Kiphart, D., Zhuang, M., Huang, W., Mueller, L. A., Bhattacharyya, D., Bhaya, D., Sobral, B. W., Beavis, W., Meinke, D. W., Town, C. D., Somerville, C. e Rhee, S. Y. (2001). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Research*, **29**:102–105.
- Hussein, S., Ibrahim, R. e Kiong, A. L. P. (2006). Somatic embryogenesis: an alternative method for *in vitro* micropropagation. *Iranian Journal of Biotechnology*, **4**:156–161.

- Höfler, S. e Carlomagno, T. (2020). Structural and functional roles of 2'-O-ribose methylations and their enzymatic machinery across multiple classes of RNAs. *Current Opinion in Structural Biology*, **65**:42–50.
- Ikeda-Iwai, M., Satoh, S. e Kamada, H. (2002). Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. *Journal of Experimental Botany*, **53**:1575–1580.
- Jackman, J. E. e Alfonzo, J. D. (2013). Transfer RNA modifications: Nature's combinatorial chemistry playground. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **4**:35–48.
- Kasajima, I., Ide, Y., Ohkama-Ohtsu, N., Yoneyama, T. e Fujiwara, T. (2004). A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, **22**:49–52.
- Koonin, E. e Rudd, K. E. (1993). SpoU protein of *Escherichia coli* belongs to a new family of putative rRNA methylases. *Nucleic Acids Research*, **21**:5519–5519.
- Kozbial, P. Z. e Mushegian, A. R. (2005). Natural history of s-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Structural Biology*, **5**:19.
- Krishnamohan, A. e Jackman, J. E. (2019). A family divided: Distinct structural and mechanistic features of the SpoU-TrmD (SPOUT) methyltransferase superfamily. *Biochemistry*, **58**:336–345.
- Krysan, P. J., Young, J. C. e Sussman, M. R. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **11**:2283–2290.
- Krämer, U. (2015). The natural history of model organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, **4**:e06100.
- Lapeyre, B. (2004). Conserved ribosomal RNA modification and their putative roles in ribosome biogenesis and translation. *Topics in Current Genetics*, **12**:263–284.
- Li, H., Lin, Y., Heath, R. M., Zhu, M. X. e Yang, Z. (1999). Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell*, **11**:1731–1742.
- Liang, X.-h., Liu, Q. e Fournier, M. J. (2009). Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA*, **15**:1716–1728.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D. e Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, **282**:662–682.
- Motorin, Y. e Helm, M. (2011). RNA nucleotide methylation. *WIREs RNA*, **2**:611–631.
- Motorin, Y. e Marchand, V. (2018). Detection and analysis of RNA ribose 2'-O-methylations: Challenges and solutions. *Genes*, **9**:462.

- Murashige, T. e Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**:473–497.
- Nic-Can, G. I. e De la Peña, C. (2014). Epigenetic Advances on Somatic Embryogenesis of Agronomical and Important Crops. In Alvarez-Venegas, R., De la Peña, C. e Casas-Mollano, J. A. (Eds.), *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*, pp. 91–109. Springer, Cham.
- Nureki, O., Shirouzu, M., Hashimoto, K., Ishitani, R., Terada, T., Tamakoshi, M., Oshima, T., Chijimatsu, M., Takio, K., Vassylyev, D. G., Shibats, T., Inoue, Y., Kuramitsu, S. e Yokoyama, S. (2002). An enzyme with a deep trefoil knot for the active-site architecture. *Acta Crystallographica Section D*, **58**:1129–1137.
- Nureki, O., Watanabe, K., Fukai, S., Ishii, R., Endo, Y., Hori, H. e Yokoyama, S. (2004). Deep knot structure for construction of active site and cofactor binding site of tRNA modification enzyme. *Structure*, **12**:593–602.
- Parinov, S. e Sundaresan, V. (2000). Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**:157–161.
- Pereira, A. M., Nobre, M. S., Pinto, S. C., Lopes, A. L., Costa, M. L., Masiero, S. e Coimbra, S. (2016). "Love Is Strong, and You're so Sweet": JAGGER is essential for persistent synergid degeneration and polytubey block in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, **9**:601–614.
- Persson, B. C., Jäger, G. e Gustafsson, C. (1997). The SpoU gene of *Escherichia coli*, the fourth gene of the spoT operon, is essential for tRNA (Gm18) 2'-O-methyltransferase activity. *Nucleic Acids Research*, **25**:4093–4097.
- Provart, N. J., Alonso, J., Assmann, S. M., Bergmann, D., Brady, S. M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V., Cutler, S., Dangl, J., Ehrhardt, D., Friesner, J. D., Frommer, W. B., Grotewold, E., Meyerowitz, E., Nemhauser, J., Nordborg, M., Pikaard, C., Shanklin, J., Somerville, C., Stitt, M., Torii, K. U., Waese, J., Wagner, D. e McCourt, P. (2015). 50 years of *Arabidopsis* research: highlights and future directions. *New Phytologist*, **209**:921–944.
- Reichow, S. L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A. R. e Varani, G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research*, **35**:1452–1464.
- Reinert, J. (1958). Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. *Naturwissenschaften*, **45**:344–345.
- Rius, S. P., Casati, P., Iglesias, A. A. e Gomez-Casati, D. F. (2008). Characterization of *Arabidopsis* lines deficient in GAPC-1, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiology*, **148**:1655–1667.

- Salaün, C., Lepiniec, L. e Dubreucq, B. (2021). Genetic and molecular control of somatic embryogenesis. *Plants*, **10**:1467.
- Schubert, H. L., Blumenthal, R. M. e Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in Biochemical Sciences*, **28**:329–335.
- Sharma, S. e Lafontaine, D. L. J. (2015). ‘View from a bridge’: A new perspective on eukaryotic rRNA base modification. *Trends in Biochemical Sciences*, **40**:560–575.
- Sirum-Connolly, K. e Mason, T. L. (1993). Functional requirement of a site-specific ribose methylation in ribosomal RNA. *Science*, **262**:1886–1889.
- Sloan, K. E., Warda, A. S., Sharma, S., Entian, K.-D., Lafontaine, D. L. J. e Bohnsack, M. T. (2017). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biology*, **14**:1138–1152.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. e Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **2**:755–767.
- Somme, J., Van Laer, B., Roovers, M., Steyaert, J., Versées, W. e Droogmans, L. (2014). Characterization of two homologous 2'-O-methyltransferases showing different specificities for their tRNA substrates. *RNA*, **20**:1257–1271.
- Stetter, M. G., Benz, M. e Ludewig, U. (2017). Increased root hair density by loss of *WRKY6* in *Arabidopsis thaliana*. *Peer J*, **5**:e2891.
- Stewart, F. C., Mapes, M. O. e Mears, K. (1958). Growth and organized development of culture cells. *American Journal of Botany*, **45**:705–708.
- Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y. e Zhang, X. S. (2021). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology*, **63**:228–240.
- Swinehart, W. E. e Jackman, J. E. (2015). Diversity in mechanism and function of tRNA methyltransferases. *RNA Biology*, **12**:398–411.
- Tang, L. P., Zhang, X. S. e Su, Y. H. (2020). Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis. *aBIOTECH*, **1**:185–193.
- Thompson, J., Schmidt, F. e Cundliffe, E. (1982). Site of action of a ribosomal RNA methylase conferring resistance to thiostrepton. *The Journal of Biological Chemistry*, **257**:7915–7917.
- Tkaczuk, K. L., Dunin-Horkawicz, S., Purta, E. e Bujnicki, J. M. (2007). Structural and evolutionary bioinformatics of the SPOUT superfamily of methyltransferases. *BMC Bioinformatics*, **8**:73.
- Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Sgi, R., Cumming, M., Kelley, L. A., Stemberg, M. J., Krishnakumar, V., Ferlanti, E., Miller, J., Town, C., Stuerzlinger, W.

-
- e Provar, N. J. (2017). ePlant: Visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. *Plant Cell*, **29**:1806–1821.
- Watanabe, K., Nureki, O., Fukai, S., Endo, Y. e Hori, H. (2006). Functional categorization of the conserved basic amino acid residues in TrmH (tRNA (Gm18) methyltransferase) enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**:34630–34639.
- Woodward, A. W. e Bartel, B. (2018). Biology in bloom: A primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. *Genetics*, **208**:1337–1349.
- Young, B. D., Weiss, D. I., Zurita-Lopes, C. I., Webb, K. J., Clarke, S. G. e McBride, A. E. (2012). Identification of methylated proteins in the yeast small ribosomal subunit: A role for SPOUT methyltransferases in protein arginine methylation. *Biochemistry*, **5**:5091–5104.
- Zavattieri, M. A., Frederico, A. M., Lima, M., Sabino, R. e Birgit, A.-S. (2010). Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, **13**:1.
- Zhong, S., Li, H., Bodi, Z., Button, J., Vespa, L., Herzog, M. e Fray, R. G. (2008). MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell*, **20**:1278–1288.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*, **5**:1411–1423.