Filipe José Ferreira Pereira

Caracterização da função de SpoU metiltransferases de tRNA/rRNA em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. e *Solanum betaceum* Cav.

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal,
orientada pela Doutora Sandra Isabel Correia e pelo Professor Doutor Jorge Canhoto,
apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

2016

· U C ·

Universidade de Coimbra

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Caracterização da função de SpoU metiltransferases de tRNA/rRNA em *Arabidopsis thaliana* e *Solanum betaceum*

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica da Doutora Sandra Isabel Correia (Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Jorge Canhoto (Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra)

Filipe José Ferreira Pereira

2016

Imagem de capa: http://www.jardineiro.net/wp-content/uploads/2014/03/tamarilo.jpg

A**gradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, por me terem recebido no grupo de Biotecnologia Vegetal e proposto este desafio. Ao Professor Doutor Jorge Canhoto pela supervisão do trabalho e esclarecimento das dúvidas que foram surgindo ao longo do tempo. À Doutora Sandra Correia por toda a paciência e disponibilidade para me ajudar em todos os passos laboratoriais.

Aos meus colegas do grupo por terem mantido um ambiente sempre bem-disposto e pela ajuda prestada, em especial, ao João Martins por estar sempre disponível para responder às minhas questões e dúvidas laboratoriais.

Aos meus amigos, namorada e família, que sabem que não sou destas coisas o meu obrigado por tudo.

Índice

RESUMO ..... **V**

ABSTRACT ..... **VII**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1 Contextualização do trabalho 3

1.2 Embriogénese somática 6

1.3 A importância de sistemas modelo para o estudo da embriogénese somática 9

1.4 *Solanum betaceum* 11

1.4.1 Embriogénese somática em tamarilho 13

1.5 Metiltransferases de RNA 16

1.6 Objectivos 17

2. MATERIAIS E MÉTODOS **19**

2.1 Análise bioinformática 21

2.2 Análise de linhas mutantes de *Arabidopsis thaliana* 22

2.2.1 Selecção de plantas homozigóticas para a inserção do T-DNA em *Arabidopsis thaliana* 22

2.2.2 Indução de embriogénese somática em *Arabidopsis thaliana* 25

2.2.3 Observação do desenvolvimento morfológico em *Arabidopsis thaliana* 26

2.3 Análise das linhas transformadas de Tamarilho.....27

2.3.1 Seleção e manutenção das linhas de tamarilho 27

2.3.2 Avaliação do nível de silenciamento do gene da NEP-TC nas linhas seleccionadas . 28

2.3.3 Observação de parâmetros morfológicos do desenvolvimento de plantas enraizadas 29

2.3.4 Indução de embriogénese somática em tamarilho 30

3 RESULTADOS **31**

3.1 Análise bioinformática das SpoU metiltransferases 33

3.1.1 Relação filogenética 33

3.1.2 Padrões de co-expressão 35

3.2 Análise da expressão génica em *Arabidopsis thaliana* 37

3.3 Indução de embriogénese somática em linhas de *Arabidopsis thaliana* *knockout* para genes da família das SpoU metiltransferases de RNA 39

3.4 Observação do desenvolvimento morfológico em *Arabidopsis thaliana* ..43

3.5 Verificação da transformação e silenciamento para a NEP-TC.....46

3.6 Análise fenotípica das linhas de tamarilho.....48

3.7 Indução da embriogénese somática em tamarilho 50

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO **51**

4.1 Papel das SpoU metiltransferases na indução de embriogénese somática.53

4.2 Observação do desenvolvimento morfológico.....56

4.2 Conclusão e perspetivas futuras 59

6 REFERÊNCIAS **61**

Resumo

Estudos anteriores sobre o processo de embriogénese somática em *Solanum betaceum,* uma solanácea filogeneticamente próxima do tomateiro (*Solanum lycopersicum),* levaram à descoberta de uma SpoU metiltransferase de RNA - NEP-TC (*Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus*). Esta proteína poderá ter um eventual papel como regulador negativo da embriogénese. Em *Arabidopsis thaliana*, a superfamília de SpoU metiltransferases inclui pelo menos cinco proteínas, codificadas por diferentes genes, que partilham o domínio conservado SpoU MeTrfase (IPR001537). Este trabalho teve como objectivo avaliar a função de algumas destas proteínas ao analisar características fenotípicas e as taxas de indução de embriogénese somática em sementes *wild type* e sementes *knockout* (linhas mutantes SALK) *de Arabidopsis thaliana*, para os genes codificantes destas metiltransferases e através da análise de linhas de plantas de tamarilho silenciadas para o gene codificante da NEP-TC.

Para analisar os parâmetros fenotípicos todas as plantas foram cultivadas em turfa com vermiculite ou em cultura *in vitro* em em meio MS. Os parâmetros medidos em *A. thaliana*, foram o comprimento das raízes primárias e o número de raízes secundárias, bem como outros aspetos do desenvolvimento, incluindo o aparecimento das primeiras folhas da roseta ou da primeira síliqua. Em *Solanum betaceum*, os parâmetros medidos foram o número e o comprimento das raízes adventícias e o número de entrenós de plantas micropropagadas. No que diz respeito à análise das taxas de embriogénese somática em *A. thaliana* todas as sementes foram colocadas em cultura em meio MS suplementado com 0,1 mg/L de 2,4-D. Para o tamarilho foram colocados segmentos foliares em meio MS suplementado com 5,0 mg/L de picloram.

Em termos do enraizamento, os resultados obtidos para as linhas de *A. thaliana* foram muito semelhantes no que diz respeito ao comprimento das raízes primárias entre

as linhas mutantes e a *wild-type*, verificando-se diferenças significativas no número de raízes secundárias, com um número muito superior nas linhas mutantes comparativamente com a linha *wild type.* Em relação às taxas de desenvolvimento, os resultados obtidos para as linhas mutantes foram muito similares, apresentando estas no geral um atraso em relação à linha *wild type.* Ao nível da embriogénese somática as linhas mutantes apresentaram taxas de indução mais elevadas comparativamente com a *wild type*, com diferenças de 30% nas taxas de indução.

Na análise das linhas de tamarilho silenciadas para o gene codificante da NEP-TC, ao nível do enraizamento apenas se registaram diferenças significativas no comprimento da raiz primária para uma das linhas transformadas. No que diz respeito ao número de raízes e de entrenós os resultados foram muito semelhantes não havendo diferenças significativas. Ao nível das taxas de indução de embriogénese somática os resultados foram muito díspares e não possíveis de relacionar com os resultados da linha controlo, obtendo-se taxas de indução de embriogénese somática na ordem dos 35% para uma das linhas silenciadas.

Estes resultados permitem concluir que estes genes e as proteínas que codificam têm um efeito significativo no processo de embriogénese somática actuando como reguladores negativos tanto em *Arabidopsis thaliana* como em *Solanum betaceum.* No que diz respeito ao desenvolvimento das plantas também aqui o efeito parece ser muito significativo, particularmente ao nível do desenvolvimento radicular. Mais especificamente ao nível das raízes secundárias em *A. thaliana* e no comprimento das raízes adventícias em tamarilho.

Palavras-chave: Desenvolvimento radicular; Embriogénese somática; Metiltransferases de RNA; Mutantes SALK; NEP-TC; Silenciamento de genes; Tamarilho.

Abstract

Previous studies in *Solanum betaceum* somatic embryogenesis, a solanaceae closely related to tomato (*Solanum lycopersicum*), led to the identification of a putative SpoU methyltransferase - NEP-TC (Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus), systematically expressed on non-embryogenic tissues. In *Arabidopsis thaliana*, the SpoU rRNA Methylase family family includes at least five different proteins, expressed by different genes, that share the conserved domain SpoU_MeTrfase (IPR001537). The objective of this work was to evaluate the function of some of these proteins on plant development, particularly in the induction of somatic embryogenesis on *wild type* seeds vs *knockout* seeds (SALK mutant lines) for the genes encoding those proteins, and also in *Solanum betaceum* silenced lines for the gene encoding NEP-TC.

To measure the phenotypic parameters all plants were grown in turf with vermiculite or micropropagated in MS medium. The parameters measured for *Arabidopsis thaliana* were the length of the primary roots and the number of secondary roots, as well as the time of some development stages, such as time of germination, appearance of first rosette leaves or appearance of first silique. In *Solanum betaceum*, the parameters measured were the number and length of adventitious roots and the number of internodes in micropropagated plants. To analyse the somatic embryogenic induction rates in *A. thaliana,* all seeds were cultured in MS medium supplemented with 0,1 mg/L 2,4-D. To analyse the induction rates in *S. betaceum,* leaf segments were cultured in MS medium supplemented with 5,0 mg/L of picloram.

The results showed that in *A. thaliana,* the length of the primary roots were very similar. However, in terms of the number of secondary roots the mutant lines showed a higher number on average. On the development rates the results were very similar amongst all mutant lines with a small delay when compared with the *wild type.* Regarding

the somatic embryogenesis induction rates, the mutant lines showed higher induction rates when compared to the wild type line, with the differences reaching 39%.

With regards to *Solanum betaceum*, the results in rooting analysis showed differences in the length of the adventitious roots for one line which showed a higher length with significant differences to all others. As far as the number of roots and number of internodes there was no significant difference in any of the lines. As for the somatic embryogenesis induction rates there were very despair results, not possible to compare with the control line, but with induction of embyogenic callus reaching percentages of 35%.

Concluding, these genes and the proteins they encode seem to have a significant effect in the process of somatic embryogenesis acting as a negative regulators both in *Arabidopsis thaliana* and *Solanum betaceum*. As far as influencing the phenotype of the plants, once again in both species they seem to have a pretty significant effect on the roots. More specifically on the number secondary roots in *A. thaliana* and the length of adventitious roots in tamarilho.

Key Words: Gene silencing; NEP-TC; somatic embryogenesis; RNA methyltransferases; root development; SALK mutant lines; tree tomato.

1. Introdução

1.1 Contextualização do trabalho

Ao longo da História da Humanidade apenas uma diminuta percentagem das plantas vegetais tem sido usada para alimentação sendo que metade da nossa alimentação advém de espécies da família Poaceae (cereais). Para além do aumento da população outros fatores têm contribuído para o aumento do número de pessoas sem acesso alimentos. Um fator é a diminuição da área de solos agrícolas quer por construção de edifícios quer por exaustão dos solos como por exemplo na Etiópia onde o terreno encontram-se demasiado árido para práticas agrícolas tendo sido em tempos uma das zonas mais férteis do globo. Outro fator é o facto de muitos países com alta densidade populacional ainda utilizar métodos convencionais na agricultura o que se revela insuficiente para produzir o necessário para acompanhar o aumento populacional.

Devido a todos estes problemas o avanço nos últimos anos na área da Botânica tem permitido desenvolver metodologias com vista ao melhoramento das colheitas e aumento da produtividade das mesmas.

Esta nova área do conhecimento denominou-se por Biotecnologia e resulta do cruzamento de várias áreas como a genética, a engenharia ou a biologia molecular. Biotecnologia Vegetal pode caracterizar-se como um conjunto de técnicas e conhecimentos com vista à manipulação de plantas ou dos seus locais de cultivo com vista a obter novas características das plantas (Borlaug, 2000). Algumas dessas técnicas utilizadas para melhorar as culturas são, a micropropagação, a embriogénese somática e a cultura *in vitro*.

A cultura *in vitro* consiste no estabelecimento e manutenção, em condições laboratoriais, de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células (*callus*), em condições assépticas e controladas (Canhoto, 2010) (Cid, 2001).

A micropropagação de plantas foi a primeira tecnologia de cultura *in vitro* a ser aplicada a nível industrial. Com esta técnica aquilo que se pretende é uma rápida multiplicação de plantas geneticamente iguais à planta-mãe com recurso a meios com tratamentos hormonais (Ebad *et al*, 2015).

A embriogénese somática, um processo de micropropagação vegetal, origina embriões a partir de células, ou estruturas somáticas, tais como embriões imaturos ou protoplastos. Esses embriões irão passar pelas mesmas fases de desenvolvimento do que os embriões zigóticos e permite a clonagem de plantas com genótipos de interesse e uma rápida propagação vegetativa o que a nível de espécies agrícolas é extremamente útil. Todos estes processos para além das vantagens já apresentadas, face aos métodos convencionais permitem obter plantas de elevada qualidade fitossanitária, as plantas micropropagadas apresentam geralmente uma uniformidade em termos de qualidade, maior vigor e um crescimento mais rápido (Dodeman *et al*, 1997).

Apesar de largamente utilizada, a embriogénese somática ainda é um processo sobre o qual se conhece pouco sobre a sua regulação. Uma das formas de se estudar a sua regulação é através de organismos modelos. Organismos modelos são organismos que possuem características como um ciclo de vida pequeno ou um fácil e económico manuseamento em laboratório, sendo assim os principais organismos com os quais se realizam estudos quer genéticos, quer de desenvolvimento, entre outros. Para estudos onde se pretende saber quais os genes que regulam processos como a embriogénese somática este processo é facilitado pela disponibilidade de protocolos de transformação, aliado ao facto de a manipulação destes organismos em laboratório ser fácil de realizar, possibilitando assim a sua modificação genética para silenciamento de genes de forma a estudar o seu efeito funcional.

Na Universidade de Coimbra, desde há muitos anos que se tem vindo a trabalhar na caracterização do processo de embriogénese somática em várias espécies de plantas, e mais particularmente na solanácea tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.). A embriogénese somática em tamarilho é um sistema particularmente eficiente, que permite obter um elevado número de plantas através da indução e desenvolvimento de embriões somáticos. Diferentes abordagens têm sido conduzidas no sentido de otimizar a aplicação desta ferramenta biotecnológica, nomeadamente através da manipulação das condições de maturação dos embriões e do desenvolvimento de condições de cultura de células competentes em meio liquido para propagação em larga escala, mas também no sentido de estudar aspetos fisiológicos e moleculares do tamarilho. Essas linhas de investigação permitiram a identificação de proteínas expressas diferencialmente durante a aquisição da competência embriogénica, incluindo a NEP-TC (*GenBank*, JQ766254.1), uma proteína de 26,5 kDa consistentemente presente em tecidos não embriogénicos, sugerindo um possível papel como inibidor da indução de embriogénese somática no tamarilho. Esta proteína apresenta um elevado grau de homologia com a família de proteínas SpoU metiltransferases de RNA de *Arabidopsis thaliana* (Correia, 2011). Trabalhos realizados com mutantes de *Arabidopsis thaliana* para o gene ortólogo do *NEP-TC* demonstraram taxas de indução de embriogénese somática mais elevadas e diferenças significativas relativamente ao enraizamento nas linhas *knockout* (Fernandes, 2014).

No seguimento dos resultados obtidos na caracterização do papel desta proteína no processo de embriogénese somática, torna-se importante alargar esse estudo a outras proteínas da superfamília de metiltransferases de RNA, usando a embriogénese somática em tamarilho e mutantes de *Arabidopsis thaliana* como sistemas modelo para o estudo do efeito funcional desses genes na embriogénese somática.

1.2 Embriogénese somática

A embriogénese somática, de forma simples, define-se como a formação de embriões a partir de células do soma, podendo ocorrer com recurso a diverso material vegetal como por exemplo, hipocótilos, cotilédones, embriões zigóticos ou folhas jovens (Correia e Canhoto, 2012). No entanto vários estudos relatam a recalcitrância do material vegetal proveniente de plantas adultas, em especial de árvores, à embriogénese somática (Bonga *et al*, 2010; Correia *et al*, 2011; Correia e Canhoto, 2012). Para fazer face a este problema e estabelecer plantas in vitro, recorre-se com frequência à proliferação de meristemas axilares para de seguir submeter segmentos foliares das plantas estabelecidas à indução de embriogénese somática.

No processo de indução de embriogénese somática, o embrião atravessa fases bastante semelhantes àquelas que ocorrem durante a embriogénese zigótica (Fig. 1). Nesta embriogénese, o zigoto sofre uma divisão assimétrica originando uma célula apical mais pequena e uma célula basal de maiores dimensões. Posteriormente a célula apical dará origem ao embrião e a célula basal ao suspensor. O embrião sofrerá sucessivas divisões passando pelo estado globular, caracterizado pela forma esférica, seguindo-se a a fase cordiforme e torpedo onde os cotilédones começam a surgir e por fim a fase cotiledonar onde os cotilédones se formam completamente (Jurgens e Mayer, 1992).

Dependendo da espécie ou das condições de cultura, a embriogénese somática pode ocorrer através de duas vias, *one-step* e *two-step*. Em tamarilho (*Solanum betaceum*), por exemplo, com recurso a NAA (ácido naftalenoacético) como auxina para a indução, o explante origina calo mas esse calo perde rapidamente o seu potencial embriogénico e com os embriões conseguem desenvolver-se no mesmo meio de cultura onde o explante é induzido (processo *one-step*). Com recurso a 2,4-D (ácido 2,4-

diclorofenoxiacético) ou picloram o calo embriogénico formado é passível de ser mantido em cultura com recurso a sub-culturas nas mesmas condições por tempo indefinido. No entanto, a passagem do calo embriogénico para um meio sem hormonas ou com ácido giberélico estimula a diferenciação em embriões somáticos (Lopes *et al*, 2000), um processo chamado *two-step*.

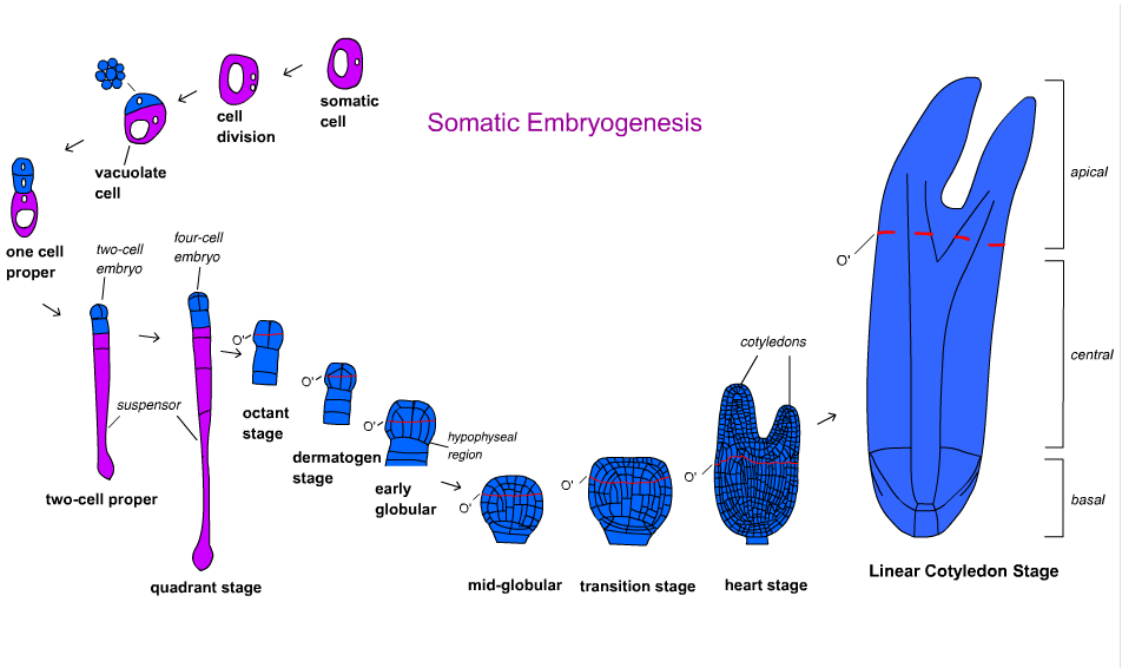


Figura 1. Fases da embriogénese somática (retirado de http://passel.unl.edu/Image/siteImages/SomaticEmbryo13Steps.gif)

É actualmente conhecido o papel das auxinas (por exemplo 2,4-D, picloram ou NAA) (Kairong *et al*, 1999) na indução de embriogénese somática (Cheng et al, 2013; Zhou *et al*, 2016). No entanto, a maneira como as auxinas controlam a indução de embriogénese somática é ainda pouco clara. Estudos recentes miRNA importantes na

regulação da via de transdução de sinal das auxinas (Li *et al*, 2012; Su *et al*, 2016). A nível das auxinas os genes *ARF* (*AUXIN RESPONSE FACTORS*) são muito importantes pois medeiam a resposta da célula às auxinas ativando ou inibindo genes em *downstream*. Vários miRNA são responsáveis por interagirem com os genes ARF e regular assim a sua expressão e condicionar a embriogénese somática (Yang *et al*, 2013).

A expressão génica apresenta um papel muito importante na regulação da embriogénese somática. Desde os anos 80 que se procura identificar genes ou proteínas presentes tanto no processo de embriogénese zigótica como no processo de embriogénese somática. Alguns desses genes identificados ao longo do tempo são, *LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT* (*LEA*) genes, *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE* (*SERK*), *AGAMOUS-like 15* (*AGL15*) e *THE BABY BOOM* (BBM). Os genes LEA são responsáveis por codificar proteínas que se irão armazenar no embrião na fase de maturação/dessecação (Ikeda-Iwai *et al*, 2002). Relativamente aos genes *SERK* não é ainda conhecida a sua função específica no processo, mas sabe-se que actuam nas fases iniciais da embriogénese, embora estejam também envolvidos noutros processos, como seja, por exemplo, a via de transdução de sinal dos brassinosteróides. (Hecht *et al*, 200; Podio *et al*, 2013). O gene *AGL15* controla os níveis de ácido giberélico na planta e faz parte da família dos *ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (Wang *et al*, 2004; Piyatrakul *et al*, 2012; Zheng *et al*, 2013;). Finalmente, os genes *BBM* (Boutilier *et al*, 2002; Rupps *et al*, 2016) codificam um fator de transcrição pertencente à família *APETALA 2*/*ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR* (AP2/ERF) com funções de promoção da divisão celular (Rupps *et al*, 2016).

1.3 A importância de sistemas modelo para o estudo da embriogénese somática

A embriogénese somática, pelo facto de ser um processo complexo e altamente regulado, trata-se de um processo difícil de estudar, pois nele interferem quer processos básicos de metabolismo celular que são comuns a todas as células, quer mecanismos especificamente relacionados com a embriogénese. A separação dos dois tipos de eventos é difícil de determinar e condiciona o estudo da formação e desenvolvimento do embrião. Devido às semelhanças morfológicas e fisiológicas entre embriões somáticos e embriões zigóticos (Zimmerman, 1993), os organismos modelo com facilidade de se multiplicarem por embriogénese somática tornam-se muito importantes para estudos de embriogénese em plantas com vista a descobrir as vias metabólicas bem como moléculas sinal envolvidas no processo de embriogénese. Desde 1988 que a indução de embriogénese somática e o desenvolvimento dos embriões do tamarilho tem sido estudado utilizando esta espécie como um sistema modelo para o estudo da embriogénese somática (Guimarães *et al*, 1988, 1996; Lopes *et al.*, 2000; Canhoto *et al*, 2005; Correia *et al,* 2009). A escolha deste sistema para este tipo de trabalhos advém de algumas características da própria planta e do seu processo de embriogénese somática. Trata-se de uma planta lenhosa cuja manipulação *in vitro* é bastante fácil e económica, e que apresenta um ciclo de vida relativamente curto comparativamente a outras espécies perenes. A embriogénese somática pode ser induzida quer em órgãos juvenis quer em explantes derivados de árvores adultas, o que torna possível a realização deste processo ao longo de várias etapas da vida da planta. Para além disso, o calo embriogénico induzido possui a capacidade de ser mantido em cultura durante um largo período de tempo, sem ocorrer perda do seu potencial embriogénico. Além disso, a conversão dos embriões somáticos em plântulas é

bastante fácil e uma reduzida massa de calo embriogénico tem a capacidade de regenerar várias plantas, o que torna o processo altamente rentável. Por fim, a partir do mesmo explante é possível obter quer calo embriogénico quer calo não embriogénico, fator muito importante para estudos de comparação molecular.

A espécie mais amplamente utilizada como organismo modelo para estudo de diversos processos e sistemas vegetais tem sido a *Arabidopsis thaliana*. No que diz respeito à indução de embriogénese somática, existem também protocolos de indução nesta espécie (Zhang *et al*, 2006) o que, associado à sua profunda caracterização genómica, permite realizar estudos de genómica funcional no sentido de melhor compreender os processos de desenvolvimento das plantas, incluindo a embriogénese. Apesar dos protocolos bem definidos deste organismo não serem exatamente comparáveis aos aplicáveis numa grande variedade de espécies lenhosas,o facto de todo o seu genoma ter sido sequenciado em 2000 (Arabidopsis Genome Iniciative, 2000), e a diversidade de linhas mutantes disponíveis para investigação, tornam *A. thaliana* um organismo modelo de eleição nesta área. Ao apresentar um ciclo de vida muito curto, pequenas dimensões, autopolinização com produção elevada de sementes ou um genoma pequeno o seu manuseamento em laboratório torna-se muito fácil e permite obter resultados de forma rápida. Estas características fazem da *A. thaliana* um organismo para o qual é bastante fácil e económico a aplicação de protocolos de transformação genética com vista a obter mutantes, através por exemplo da inserção de T-DNA nos genes que se pretende silenciar o abre imensas possibilidades para estudos genéticos ou estudos de caracterização funcional de genes (Alonso *et al*, 2003).. Particularmente Gliwicka e colaboradores (2013) identificaram em *A. thaliana* alguns dos factores de transcrição presentes durante a embriogénese somática, e Baie e colaboradores (2013) demonstrou

que os genes *YUCCAs* (*YUCs*) que codificam enzimas chave na biossíntese de auxinas são necessários para a indução de embriogénese somática em *A. thaliana.*

1.4 *Solanum betaceum* Cav.

O tamarilho ou tomate arbóreo (Fig. 2) (*Solanum betaceum* Cav.) como também é chamado em algumas regiões é uma árvore perene de pequeno porte (2-4 m) normalmente cultivado pelos seus frutos que, para além de comestíveis em fresco, podem dar origem a vários derivados como compotas ou sumos. O seu epicarpo pode apresentar uma cor em tons de vermelho, amarelo ou laranja (Correia, 2011). Para além disso, em termos nutricionais tem uma elevada quantidade de potássio, proteínas (2.4g/100g), antioxidantes como vitamina C (17g/100g) β-caroteno (5g/100g), antocianinas (38g/100g) e baixas quantidades de açúcares quando comparado com outros frutos (Vasco *et al*, 2009). O nome tamarilho surgiu devido à necessidade de o distinguir do tomate vulgar para fins comercias quando a sua procura começou a aumentar, tendo sido atribuído em 1967 na Nova Zelândia. Taxonomicamente era classificado como *Cyphomandra betacea* tendo posteriormente passado a designar-se por *Solanum betaceum* quando ocorreu a transferência das espécies entre os dois géneros depois de estudos moleculares revelarem a alta similaridade entre os dois (Olmstead e Palmer1992; Spooner *et al*, 1993; Bohs e Olmstead, 1995).

Esta espécie é originária dos Andes, tendo sido introduzida na Nova Zelândia no final do século XIX (Atkinson e Gardner, 1993). Posteriormente foi introduzida no Norte da América, o Sul da Europa incluindo as ilhas Portuguesas (Madeira e Açores), Índia, China e Austrália (Prohens e Nuez, 2001) onde é cultivado hoje em dia (Fig. 3).

Figura 2. Cyphomandra betacea. A- Árvore de tamarilho. B- Frutos maduros

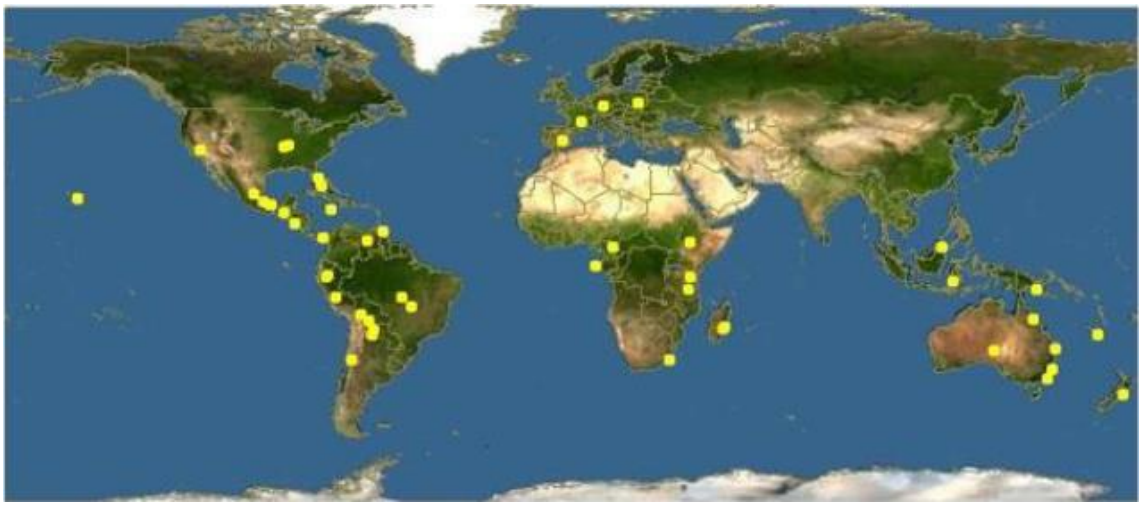


Figura 3. Distribuição mundial da planta de tamarilho (http://eol.org/).

Em termos de propagação o tamarilho pode ser propagado através de sementes ou estacas (Prohens e Nuez, 2001). Apesar de estes métodos serem simples e comuns de utilizar apresentam alguns problemas (Obando e Jordan, 2001). Devido ao facto de os diferentes cultivares não estarem estabelecidos e a planta ser suscetível a ataques de nematodes e insetos bem como de fungos e vírus torna-se difícil obter material vegetal de

boa qualidade e em grandes quantidades bem como o melhoramento dos cultivares. Para além disto as sementes apresentam pouca viabilidade e o pólen frequentemente apresenta diferentes níveis de ploidia (Obando e Jordan, 2001; Prohens e Nuez, 2001).

Para fazer face a estes problemas muitos estudos têm sido desenvolvidos nos últimos anos recorrendo a micropropagação do tamarilho com recurso a técnicas de cultivo in vitro, tendo muitos deles sido bem sucedidos. Em 1988 (Guimarães *et al*, 1988) e posteriormente por (Guimarães *et al*, 1996; Lopes *et al*, 2000; Canhoto *et al*, 2005; Correia *et al*, 2009, 2011) a aplicação da embriogénese somática nesta espécie tem-se demonstrado eficaz para a obtenção de elevadas quantidades de material vegetal por clonagem, a transformação genética de plantas e mais recentemente o estudo de mecanismos moleculares e citológicos envolvidos no desenvolvimento embrionário (Correia e Canhoto, 2012).

1.4.1 Embriogénese somática em tamarilho

Na indução de embriogénese somática em tamarilho (Fig. 4) os explantes são colocados num meio rico em auxinas (NAA, 2-4-D ou picloram) e preferencialmente com uma elevada concentração de sacarose (9%) (Guimarães et al, 1996) para maximizar as taxas de indução obtidas. O processo de embriogénese somático é um pouco diferente de acordo com a hormona vegetal utilizada. Com o uso de NAA os embriões somáticos têm origem a partir de tecidos dos embriões zigóticos onde existe uma reduzida formação de calo e a indução é seguida da maturação dos embriões no mesmo meio de cultura (Guimarães *et al*, 1996), sendo este processo designado por *one-step*. Recorrendo a 2,4-D ou picloram os explantes formam calo embriogénico com capacidade ser mantido em

cultura através de sub-culturas no meio com auxina. Após isto o calo embriogénico é transferido para um meio sem auxinas onde ocorre a formação de embriões somáticos que mais tarde darão origem a plantas, sendo este processo designado por *two-step*.

Como referido anteriormente o processo de embriogénese somática no tamarilho é também um bom sistema para estudos de embriologia experimental. Devido a este factor esta espécie foi escolhida para a realização de comparações entre os perfis proteicos de calo não embriogénico e calo embriogénico para tentar descobrir proteínas presentes numa das estruturas e ausentes na outra para se perceber melhor os mecanismos envolvidos na indução de embriogénese.

Um dos estudos realizados onde foram comparados perfis proteicos de calos embriogénicos e de calos não embriogénicos revelou a presença em calos não embriogénicos de uma proteína de 26,5 kDa (NEP-TC, *Non-Embryogenic Protein from Tamarillo Callus*, GenBank JQ766254). Através da análise do seu cDNA verificou-se que a proteína é constituída por 222 aminoácidos e que apresentava uma elevada homologia com algumas proteínas tRNA/rRNA metiltransferase de *Arabidopsis thaliana* incluindo a ortóloga da NEP-TC (codificada pelo gene *AT4G15520*) (Correia, 2011). Estudos através de mutantes de *A. thaliana* revelaram que a proteína poderá estar envolvida num mecanismo pós-translacional de controlo do processo de indução de embriogénese somática (Correia, 2011).

Para prosseguir o estudo foi desenvolvido um protocolo de transformação genética com vista a silenciar o gene codificante da NEP-TC para verificar o efeito que a ausência da expressão desse gene teria quer ao nível da indução de embriogénese somática quer ao nível da fisiologia e morfologia. O protocolo de transformação foi conseguido, mas os resultados deste estudo não revelaram grandes diferenças entre as linhas transformadas *down-regulated* para a NEP-TC e a linha controlo. O estudo foi efetuado em paralelo com

a análise de linhas de *Arabidopsis knockout* para o gene ortólogo da NEP-TC e novamente os resultados não mostraram diferenças significativas embora neste caso as taxas de indução de embriogénese tenham sido ligeiramente mais altas para as linhas *knockout* (Correia, 2011).

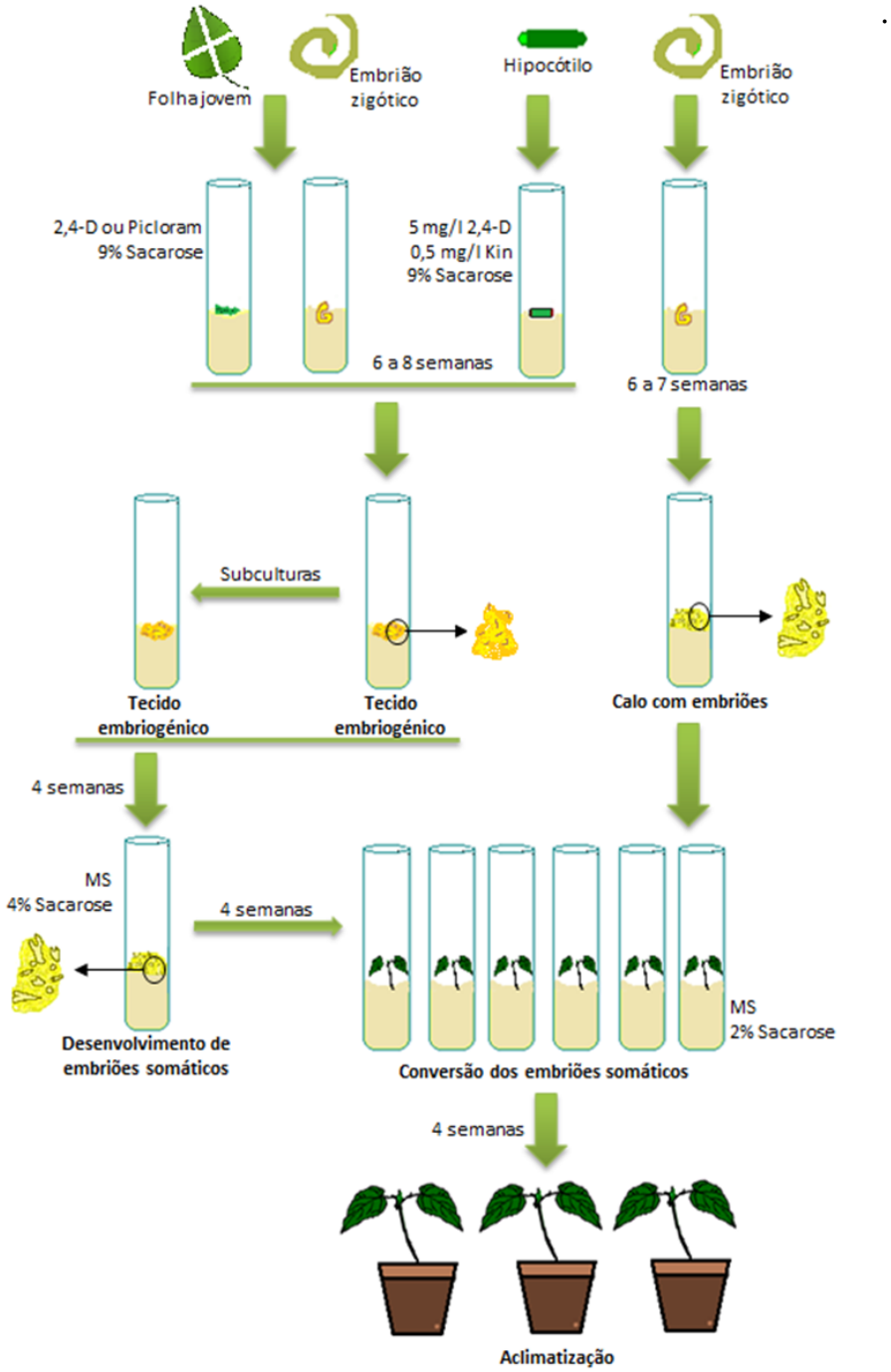


Figura 4**.** Representação esquemática do protocolo de indução de embriogénese somática em tamarilho (adaptado de Canhoto *et al*, 2005).

1.5 Metiltransferases de RNA

Metiltransferases são enzimas que têm como função a transferência ou adição de grupos metil ao seu substrato. Estas enzimas são separadas e classificadas de acordo com o seu substrato que pode ser por exemplo DNA, RNA ou proteínas (Cloutier et al, 2013).

Em animais, as metiltransferases de DNA têm funções muito importantes ao nível do silenciamento dos genes controlando assim processos como a expressão de genes, diferenciação celular e desenvolvimento bem como a preservação da integridade dos cromossomas (Hermann et al, 2004).

Em plantas têm vindo a ser feitos estudos acerca do efeito das metiltransferases quer de DNA quer de RNA. Um desses estudos aponta as metiltransferases como reguladoras da síntese de rRNA ao contribuir para os processos de *cleavage* ou *triming* do pre-rRNA (Ohtani, 2015). Outro exemplo do efeito de metiltransferases é o processo de síntese de lenhina onde o nível de actividade de metiltransferases condiciona as suas propriedades (Rastogi et al, 2007). É nesta última categoria que as proteínas tRNA/rRNA metiltransferase de *A. thaliana* e a NEP-TC se inserem, contribuindo para a formação e processamento do RNA (Correia, 2011).

Esta família insere-se na classe das *S-adenosyl-L-methionine (AdoMet)-dependent enzymes (SAM dependent)* e todas as proteínas pertencentes a esta família estudadas até agora estão envolvidas em modificação de RNA pós-transcrição e metilação da ribose de diferentes RNA's como tRNA e rRNA (Tkaczuk *et al,* 2007).

As enzimas dependentes de SAM dividem-se em quatro classes conforme a arquitectura da proteína, o cofactor necessário e o mecanismo de catálise. A classe A utiliza dois resíduos de cisteínas para metilar centros de carbono hibridizados sp^2. A classe B requer cobalamina como cofactor e tem capacidade para metilar tanto centros de

carbono hibridizados sp^2, como centros de carbono hibridizados sp^3 . A classe C possui homologias na sua sequência com a enzima HemN e liga-se a duas moléculas SAM para metilar centros de carbono hibridizados sp^2. Por fim a classe D, ao contrário das anteriores que utilizam SAM como dador do grupo metil, esta classe utiliza metilenotetrahidrofolato para metilar centros de carbono hibridizados sp^2 (Bauerle *et al*, 2015).

Apesar destas enzimas serem amplamente referidas em organismos procariontes e em leveduras, são raras as referências a metiltransferases de RNA em plantas.

1.6 Objectivos

No laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida da UC tem-se estudado nos últimos anos a embriogénese somática para compreender os mecanismos fisiológicos, molecular e citológicos subjacentes à indução e desenvolvimento de embriões somáticos. Assim, ao longo dos anos a espécie *Solanum betaceum* tem surgido como uma espécie com potencial para estes estudos. Após estabelecidos protocolos para a manipulação e indução de embriogéneserealizaram-se estudos de proteómica com o objectivo de identificar proteínas específicas dos calos embriogénicos e não embriogénicos.. Esses estudos levaram à descoberta da proteína já referida anteriormente, a NEP-TC e ao seu possível papel como inibidor no processo de indução de embriogénese somática.

Na sequência desses resultados este trabalho teve como objectivo caracterizar funcionalmente genes da superfamília das SpOU metiltransferases, através da análise e caracterização morfológica de mutantes de *Arabidopsis thaliana* e de linhas transformadas de tamarilho com silenciamento para a NEP-TC. Pretende-se assim

aprofundar o conhecimento sobre o papel destes genes no desenvolvimento das plantas em estudo e mais particularmente no processo de embriogénese somática. Os procedimentos para atingir estes objetivos e os seus resultados estão descritos nas secções seguintes.

2. Materiais e métodos

2.1. Análise bioinformática

Para estudar a filogenia dos genes em estudo recorreu-se a ferramentas bioinformáticas para elaborar uma árvore filogenética. Recorreu-se ao software Plaza 3.0 ((http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v3_dicots/) para retirar as sequências de aminoácidos para as proteínas em causa e recorrendo ao programa Seaview (versãoXX) elaborou-se a árvore filogenética com o software PHYML, com um *bootstrap* de 1000.

Para além disto também se analisou a co-expressão ao longo do desenvolvimento recorrendo ao CoexViewer feature at ATTED-II v7.1 (atted.jp/top_draw.shtml#CoexViewer). Este software contém informações da etapa do desenvolvimento onde ocorre expressão do gene. Introduzindo os nomes dos genes, o software elabora um gráfico de comparação ao longo de desenvolvimento da expressão dos genes.

Para poder estudar a expressão dos genes nas plantas e relacionar os resultados com os níveis de expressão génica em diferentes tecidos das plantas recorreu-se ao software *Arabidopsis* eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi) para analisar a expressão dos genes em estudo em *A. thaliana*. Este software contém informação sobre o nível relativo de expressão para vários genes em vários tecidos em *A. thaliana.* Introduzindo os nomes dos genes é possível obter um gráfico de expressão relativa desse gene nos vários tecidos da planta.

2.2. Análise de linhas mutantes de *Arabidopsis thaliana*

2.2.1. Selecção de plantas homozigóticas para a inserção do T-DNA em *Arabidopsis thaliana*

Para estudar o efeito a nível do desenvolvimento, assim como o efeito a nível da indução de embriogénese somática de proteínas da família das SpoU metiltransferases de RNA foram selecionadas linhas mutantes de *A. thaliana* com inserções de T-DNA nos genes *AT4G17610*, *AT5G15390* e *AT5G26880* (Fig. 5). As linhas SALK_138076C (MT2), SALK_033932C (MT4) e SALK_149181C (MT5) estão descritas como homozigóticas com a inserção a ocorrer num exão, num intrão e num exão respectivamente (Tabela 1) e foram obtidas através do *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* (http://www.salk.edu/; Alonso *et al*, 2003).

Tabela 1. Proteínas da superfamília de SpoU tRNA/rRNA metiltransferases

Designação da linha SALK	**Gene *knockout***	**Localização da inserção de T-DNA**	**Proteína**
MT2 (SALK_138076C)	AT4G17610	Linha homozigótica Exão / Inserção homozigótica	SpoU 20 kDa
MT4 (SALK_033932C)	AT5G26880	Linha homozigótica Intrão / Inserção homozigótica	SpoU 41 kDa / AGAMOUS-like
MT5 (SALK_149181C)	AT5G15390	Linha homozigótica Exão / Inserção homozigótica	SpoU 38.8 kDa

.

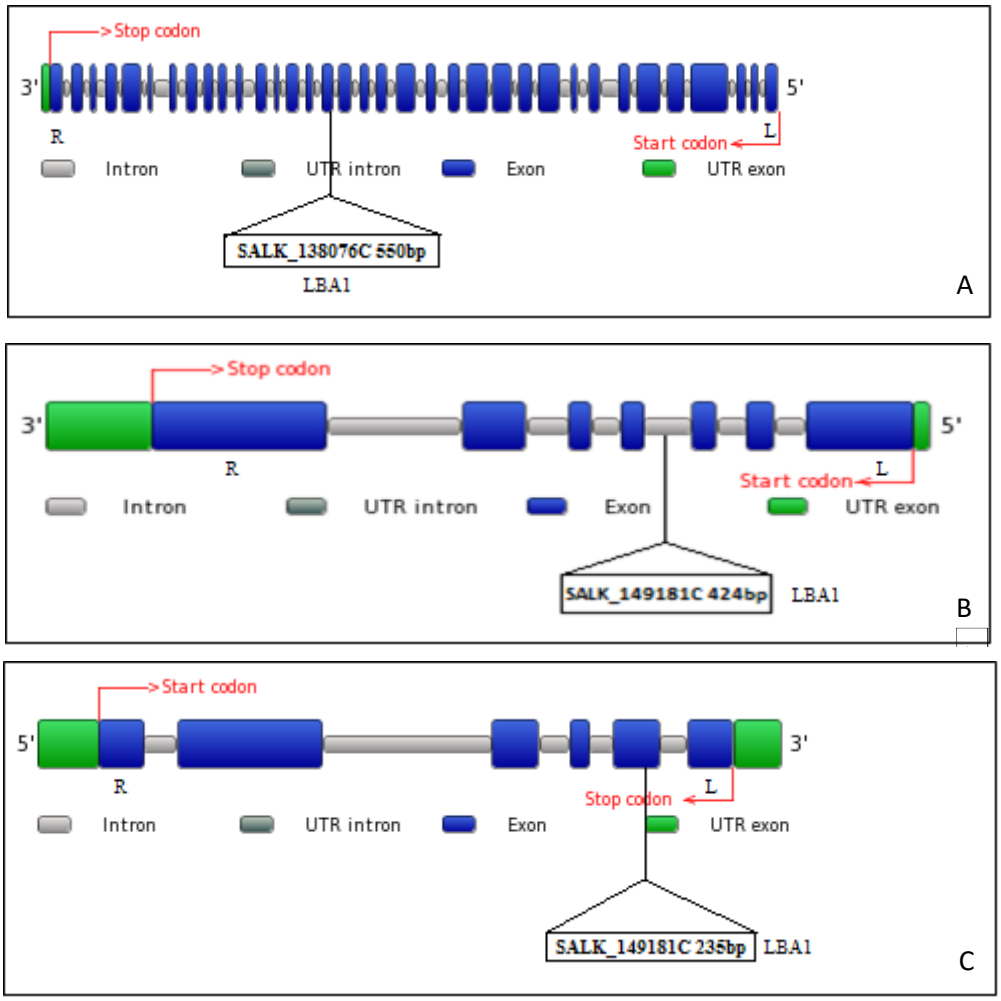


Figura 5. Representação esquemática dos genes *AT4G17610* (A), *AT5G26880* (B) e A*T5G15390* (C) e posicionamento da inserção de T-DNA nas respectivas linhas mutantes – MT2 (A), MT4 (B) e MT5 (C).

As sementes sofreram um processo de desinfeção durante 10 minutos numa solução de etanol e lixívia (4:1), com agitação, seguido de três lavagens com água esterilizada. Após secagem foram colocadas a 4 ºC para sofrerem um processo de vernalização.

Para a seleção de plantas homozigóticas para a inserção do T-DNA as sementes foram germinadas quer *in vitro* quer em solo para tentar precaver qualquer problema com as taxas de germinação em ambos os métodos. As sementes germinadas *in vitro* foram colocadas, em condições estéreis em meio MS suplementado com 1% de sacarose (w/v)

e 0,6% de agar (w/v), sendo posteriormente transferidas para substrato contendo turfa e vermiculite (2:1). As sementes germinadas em solo foram diretamente colocadas em substrato com turfa e vermiculite (2:1)

Após o crescimento e desenvolvimento das plantas ao longo de 4 semanas foi isolado DNA proveniente das folhas para identificar mutantes homozigóticos para as insercções de T-DNA através de PCR. A extracção de DNA realizou-se com recurso ao kit NucleoSpin® Plant II e a sua concentração e qualidade foi avaliada recorrendo a um espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Para a reacção de PCR os primers utilizados foram: para a linha MT2 (SALK_138076C) MT2-LP (5'-GCC AAG TCT TTA TCA TGC ACC-3') e MT2-RP (5'-GCT GAA ATC TGT CAG ACT CGC-3'), para a linha MT4 (SALK_033932C) MT4-LP (5'-GAA TGG GCC TAA AAG TAT CCG-3') e MT4-RP (5'-TTC GTG ATT GCA GTC TGA CAG-3') e para a linha MT5 (SALK_149181) MT5-LP (5'- ATT TTA GGG CTT GCT TTC CAC-3') e MT5-RP (5'- ATG GCT GGA CAT TGA GTT TTG-3'). Para todas as linhas foi ainda utilizado um primer específico para a região esquerda do T-DNA, o primer Lba1 (5'- TCA AAC AGG ATT TTC GCC TGC T 3'), como se encontra descrito por Stepanova e Alonso (2003). Utilizou-se 75 ng de DNA extraído a partir de várias plantas por linha em cada reacção. Adicionou-se no tubo de reacção de PCR 1,5 mM $MgCl_2$, 0,3 mM dNTP's, 0,4 mM de cada primer, 1x tampão GoTaq Polimerase e uma unidade de GoTaq Polimerase (Prromega), num volume final de 20 µl.

As condições de PCR foram programadas no termociclador, sendo elas uma desnaturação a 94 ºC durante 4 min, seguido de 30 ciclos com 94 ºC, *annealing* a 60 ºC e 72 ºC sendo a duração de cada um 45 segundos. A fase de alongamento ocorreu a 72 ºC durante 4 min. Após PCR os produtos foram separados por uma electroforese em gel de

agarose 1% (w/v) corado com 3 µl/100ml de Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe) e carregados no gel juntamente com 3 µl de marcador de DNA HyperLadderTM II (Bioline).

A partir das plantas identificadas como homozigóticas utilizaram-se as suas sementes para os estudos descritos a seguir.

2.2.2. Indução de embriogénese somática em *Arabidopsis thaliana*

Para induzir embriogénese somática procedeu-se à recolha de síliquas imaturas das diferentes linhas de *Arabidopsis thaliana* (wild type, MT2, MT4 e MT5). As síliquas sofreram um processo desinfeção numa solução de hipoclorito de cálcio a 2,5 % (w/v) durante 10 minutos, com agitação, seguido de três lavagens com água esterilizada. A partir das silíquas desinfetadas, em condições estéreis, retiraram-se as sementes com o auxílio de uma lupa e de agulhas. As sementes imaturas foram inoculadas em meio B5 (Gamborg *et al*, 1968) (para indução de embriogénese somática), suplementado com 2% sacarose (w/v) e 0,1 mg/L de 2,4-D. O meio foi solidificado com 2,5% de phytagel em caixas de Petri com 6 cm diâmetro (10 sementes por caixa, 30 caixas por linha num total de 300 sementes por linha) e colocadas em cultura com um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro (15-20 µmol $m^{-2}s^{-1}$) a uma temperatura de 24 ºC, durante 5 semanas.

Após este período os resultados foram registados com base nos seguintes parâmetros: formação de calo, formação de embriões somáticos, germinação precoce ou explantes sem resposta.

A análise estatística (Statistica 7) foi feita através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas foram identificadas utilizando o teste de Tukey (p = 0,05).

2.2.3. Observação do desenvolvimento morfológico em *Arabidopsis thaliana*

Com vista a tentar estabelecer uma relação entre a função dos genes e o desenvolvimento das plantas realizou-se um ensaio para se comparar plantas mutantes e com plantas *wild type*. Assim com base nos procedimentos descritos por Boyes e colaboradores (2001) procedeu-se à germinação de sementes das diversas linhas em substrato (como descrito previamente). Para efetuar estes registos foram medidas 15 plantas por linha num total de 60 plantas. Após germinação foram registados vários parâmetros como, a abertura dos cotilédones, os tempos de aparecimento das diversas folhas da roseta, ou do aparecimento das primeiras síliquas. Para além disso realizou-se também outra experiência com vista a analisar o enraizamento, na qual se germinou sementes (5 sementes da linha *wild type* e 5 sementes de cada uma das linhas mutantes de MTases por caixa. Este ensaio teve assim um total de 5 caixas por linha com 25 sementes de cada MTase e 50 sementes de WT, em caixas de plástico quadradas de 12 cm de lado, em posição vertical. Após 11 dias registou-se o comprimento da raiz principal e o número de raízes secundárias. A análise estatística (Statistica 7) foi feita através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas foram identificadas utilizando o teste de Tukey (p = 0,05).

2.3. Análise de linhas transformadas de tamarilho

2.3.1. Selecção e manutenção das linhas de tamarilho

Para confirmar a transformação das linhas de tamarilho em estudo, recolheu-se 100 mg de folhas de plantas micropropagadas das diferentes linhas, com 4 semanas de cultura, e procedeu-se à extracção de DNA utilizando o kit NucleoSpin® Plant II. As linhas selecionadas foram: o controlo (Ct), e as linhas transformadas C, D2, G1, Q2, U2, W e X2. A concentração e qualidade das amostras de DNA foi determinada utilizando um espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) e estimada através de uma eletroforese em gel de agarose 1% (w/v). A amplificação de um fragmento de 1200 pb do gene *NPTII* do DNA foi feita com os primers 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' e 5'- ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3', num termociclador com as mesmas condições de PCR descritas anteriormente. Após PCR os produtos foram separados por uma electroforese em gel de agarose 1% (w/v) corado com 3 µl/100ml de Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe) e carregados no gel juntamente com 3 µl de marcador de DNA HyperLadderTM II (Bioline).

A proliferação das linhas de plantas de tamarilho efectou-se com sucessivas repicagens utilizando segmentos nodais (1,5 cm) que foram colocados em *micro-boxes* com cerca de 100 ml de meio MS, com 0,2 mg/L de benzaminopurina (BAP), 3% de sacarose e 7 g/L de agar, crescendo durante 4 semanas com condições de 24±1ºC sob um fotoperíodo de 16h luz (15-20 µmol $m^{-2}s^{1}$) / 8h escuro.

2.3.2 Avaliação do nível de silenciamento do gene da NEP-TC nas linhas seleccionadas

Para avaliar os níveis da expressão de transcritos do gene da NEP-TC em tamarilho procedeu-se à extracção de RNA a partir de 100 mg de folhas recolhidas aquando da repicagem das plantas. As amostras foram maceradas em azoto líquido e posteriormente o RNA foi isolado com recurso ao kit NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, Germany), medida a sua concentração num espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies), a sua integridade foi estimada através de uma electroforese em gel de agarose 1% (w/v) e as amostras foram conservadas a -80ºC.

O cDNA foi sintetizado a partir das amostras de RNA com qualidade, com recurso ao Transcriptor High Fidelity cDna Synthesis Kit (Roche). Para a reacção utilizou-se 1 µg de RNA, 1 µl de primer Anchored-oligo $(dT)_{18,}$ 1,1 µl de transcriptase reversa e 4 µl do seu tampão de reacção, 2 µl de dNTP's e 1 µl de DTT e água *PCR grade*, num volume final de 20 µl.

Para amplificação de um fragmento de 175 pb da sequência de cDNA do NEP-TC recorreu-se a PCR utilizando primers específicos com as sequências: 5'-ACATAGCAAAGAGACACAACGTCGGAA-3' e 5'-TTGAGGAAGGTTTTAGCATCGGCAA-3' . Como gene de referência, utilizou-se o gene *ELONGATION FACTOR 1-α* (*EF1α*) (Nicot *et al*, 2005), através da amplificação de um fragmento com 380 pb pelos primers 5'- ACCCGTGAACATGCATTGCTTGCT-3' e 5'- ACACCAGTCTCAACACGACCAACA-3'. Para as reacções de amplificação utilizou-se 1 µl do cDNA, 1,2 µl de $MgCL_2$ (1,5mM), 0,8µl de dNTP's (0,4 mM), 0,4 µl de cada primer, 1x tampão GoTaqPolimerase e uma 0,2µl de Taq Polimerase (Promega), para um volume final de 20 µl de reacção. O programa de PCR foi definido para haver

uma primeira desnaturação a 94 ºC durante 4 min, seguido de 30 ciclos de 94 ºC, *annealing* de 54 ºC para os primers do *NEP-TC* e 60 ºC para os primers do *EF1α*, e uma extensão final a 72ºC, todos com duração de 45 segundos. Os produtos PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) corado com 6 µl/100 ml de Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe). Foram carregados 6 µl de marcador de DNA (HyperLadderTM II, Bioline) juntamente com os produtos de PCR. A quantificação dos níveis de expressão relativos foi feita em relação ao controlo *EF1α*, utilizando o software Image J 1.48v.

2.3.3. Observação de parâmetros morfológicos do desenvolvimento das plântulas enraizadas

O enraizamento foi promovido transferindo segmentos apicais (com cerca de 2 cm) dos rebentos micropropagados para *micro-boxes* com cerca de 100 ml de meio MS, sem reguladores de crescimento e com 3% de sacarose e 7 g/L de agar. Após 5 semanas de desenvolvimento a 24±1ºC e sob um fotoperíodo de 16h luz (15-20 µmol $m^{-2}s^{1}$) / 8h escuro, os parâmetros abaixo foram medidos e registados.

Essas linhas apresentavam diferentes níveis de silenciamento para a NEP-TC. Assim para avaliar se existia uma relação entre a NEP-TC e o desenvolvimento das plantas, aquando da repicagem em condições estéreis foram medidos dois parâmetros das plantas, o número de entrenós apresentados e o comprimento das raízes adventícias.

2.3.4. Indução de embriogénese somática em tamarilho

Para indução de embriogénese somática em tamarilho utilizaram-se secções foliares de plantas com um mês e meio. As secções de folhas foram colocadas em tubos de ensaio (uma secção foliar por tubo) contendo meio TP suplementado com 9% sacarose (w/v), 5 mg/L Picloram (w/v) e solidificado com 2,5 g/L de phytagel. As culturas foram colocadas no escuro durante um período de 12semanas a 24±1ºC. Para cada linha foram feitas 3 réplicas de 10 explantes foliares cada, feridos aleatoriamente e colocados com a página abaxial em contacto com o meio de cultura.

Ao fim das 12 semanas os resultados foram registados no que diz respeito à formação de calo embriogénico *versus* calo não embriogénico ou a não resposta dos explantes.

3. Resultados

3.1 Análise bioinformática das SpoU metiltransferases

3.1.1. Relação filogenética

A análise filogenética realizada revelou que as proteínas em estudo, indicadas como metiltransferases de RNA, estão filogeneticamente mais afastadas do que se pensava formando assim uma superfamília. A figura 6 demonstra isso mesmo, onde as proteínas apresentam proximidade filogenética com a homóloga em *Solanum lycopersicum* e *Solanum tuberosum* mas encontram-se afastadas entre si. A NEP-TC, anteriormente caracterizada (Correia, 2011; Fernandes, 2014) encontra-se próxima das suas homólogas em solanáceas e no ramo do gene ortólogo *AT4G15520* (HOM03D005634) em Arabidopsis, e filogeneticamente mais próxima da família do gene *AT5G26880* que codifica as proteínas SpoU de 41 kDa / AGAMOUS-*like*. Os ramos das famílias dos genes *AT4G17610* (codificante de proteínas SpoU 20 kDa) e *AT5G15390* (codificante de proteínas SpoU 38.8 kDa) encontram-se filogeneticamente mais afastados dos últimos referidos e agrupados com a família de genes do *AT2G19870*, também uma família de metiltransferases de RNA não envolvida neste trabalho.

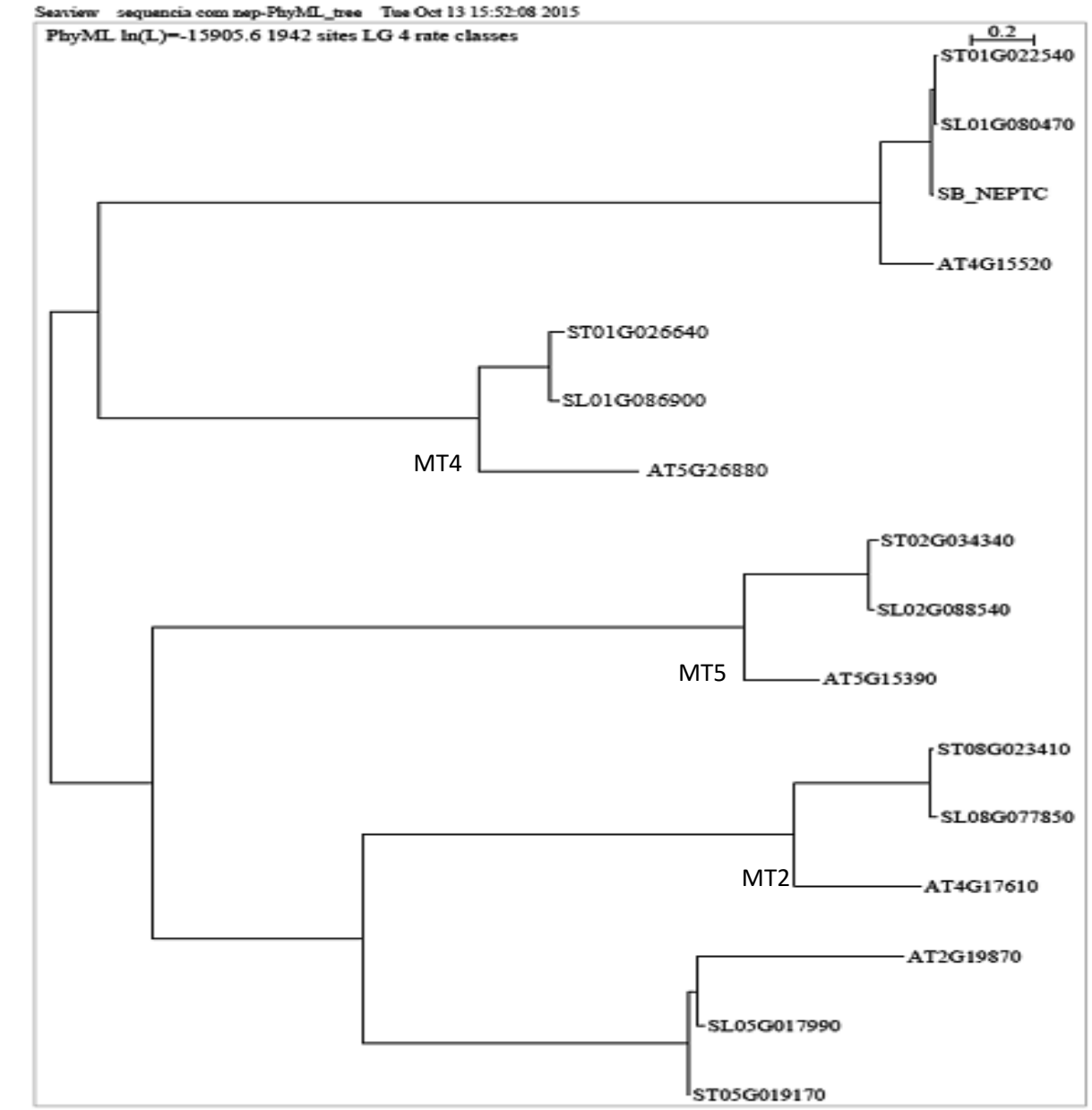
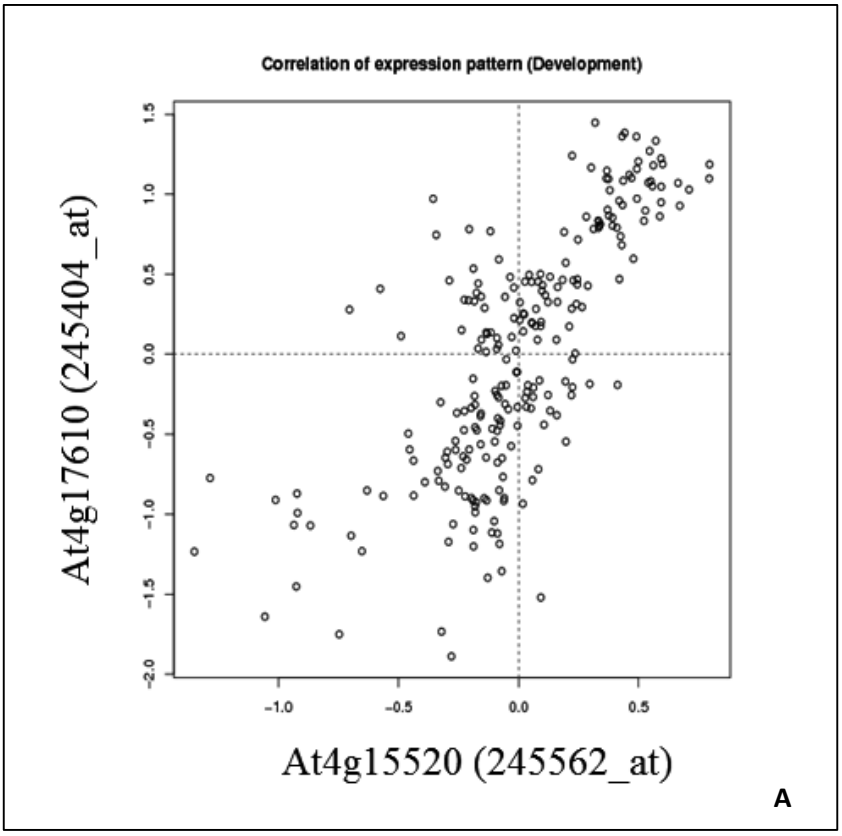
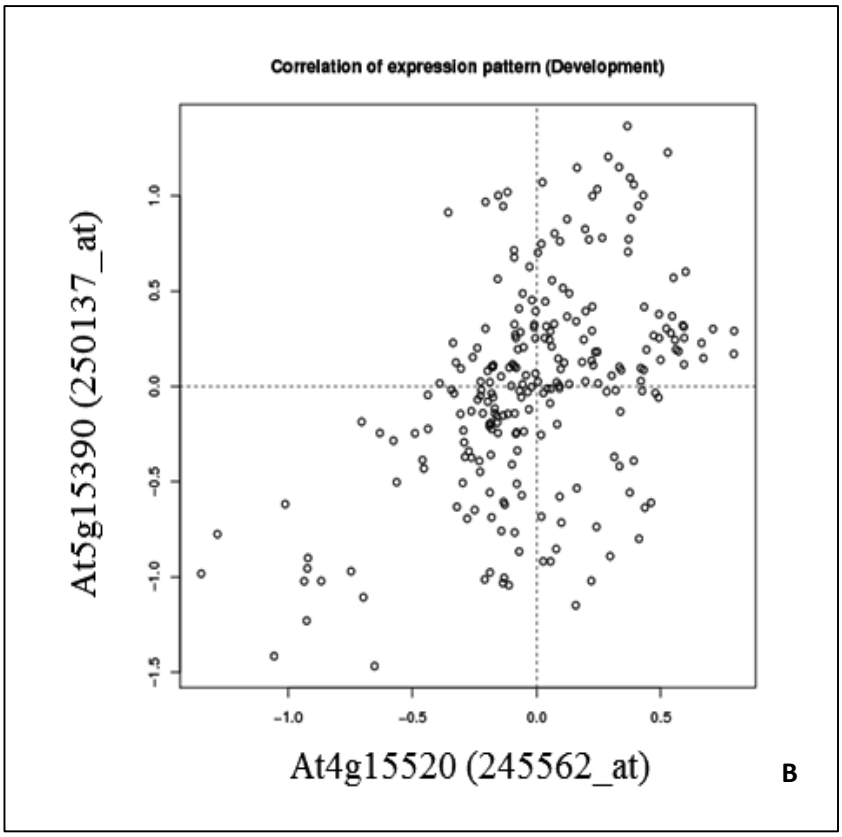


Figura 6. Àrvore filogenética das sequências de aminoácidos de *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* e *Solanum tuberosum* dos genes das famílias HOM03D005634 (*AT4G15520, SL01G080470, ST01G022540*) HOM03D005079 (*AT5G15390, SL02G088540 e ST02G034340*) HOM03D003440 (*AT4G17610, SL08G077850 e ST08G023410*) HOM03D005635 (*AT2G19870, SL05G017990 e ST05G019170*) HOM03D006380 *(AT5G26880, SL01G086900, e ST01G026640*) e da NEP-TC de *Solanum betaceum.*

3.1.2. Padrões de co-expressão

Devido ao facto de as proteínas tRNA/rRNA metiltransferase não pertencerem à mesma família tornou-se ainda mais importante a análise da expressão dos genes codificantes dessas proteínas ao longo do desenvolvimento. A figura 7 demonstra a comparação entre a expressão dos de alguns desses genes. Como se pode observar ao longo do desenvolvimento ocorre a co-expressão dos genes em estudo, particularmente do gene *AT4G17610* (Fig. 7A) e do gene *AT5G15390* (Fig. 7B) com o ortólogo do *NEP-TC* em *A. thaliana* (*AT4G15520*).





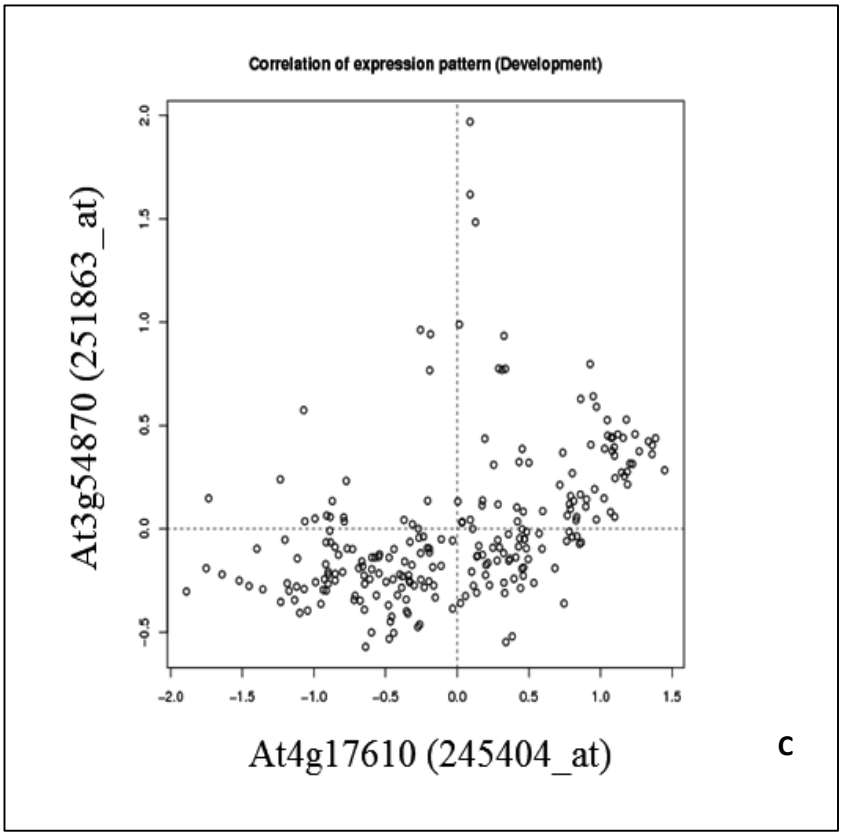


Figura 7. Análise da expressão dos genes do longo do desenvolvimento. **(A)**- *AT4G15520* e *AT4G17610* **(B)**- *AT4G15520* e *AT5G15390* (**C**)- *AT4G17610* e *AT3G54870*

3.2 Análise da expressão génica em *Arabidopsis thaliana*

Com recurso ao software eFP Browser averiguou-se em que tecidos ou estruturas da planta os genes em estudos apresentavam maior expressão. Como descrito na tabela 2 os genes *AT4G17610* e *AT5G15390* apresentam valores elevados para, a raiz, as sementes, sementes embebidas e na roseta. No entanto o gene *AT5G26880* apresenta valores baixos para a expressão desse mesmo gene, valores baixos esses que são transversais a todos os tecidos, no entanto com valores mais elevados para as sementes e fase final do desenvolvimento embrionário (Fig. 8). Os genes *AT4G17610* e *AT5G15390* apresentam valores elevados em vários tecidos sendo o primeiro mais expresso nas sementes, sementes após embebição e no meristema apical do caule. O gene *AT5G15390* apresenta níveis elevado de expressão em praticamente todos os tecidos com destaque para a roseta a sementes após embebição e nas sementes.

Tabela 2. Valores de expressão para raízes, sementes, sementes embebidas e roseta para as linhas MT2, MT4 e MT5 de acordo com o eFP Browser.

Linha / Gene	**Raízes**	**Sementes**	**Semente embebida**	**Roseta**
MT2 / *AT4G17610*	103.56	44.22	169.82	100.86
MT4 / *AT5G26880*	0.25	14.6	0.61	1.36
MT5 / *AT5G15390*	61.54	99.48	140.32	218.46

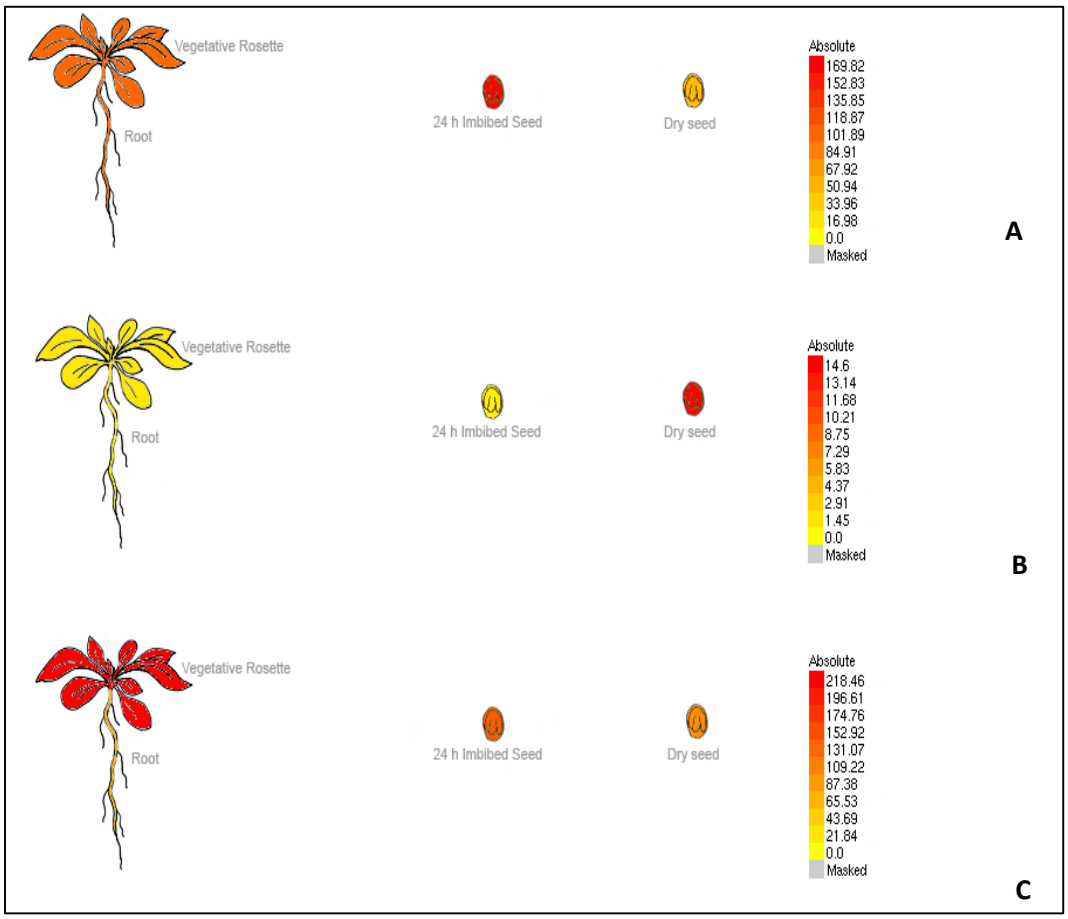


Figura 8. (A) Níveis de expressão dos genes *AT4G17610* (linha MT2), (B) *AT5G26880* (linha MT4) e (C) *AT5G15390* (linha MT5) nos diferentes tecidos da planta segundo o software eFP Browser. (retirado de http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi)

3.3 Indução de ES em linhas de *Arabidopsis thaliana knockout* para genes da família das SpoU metiltransferases de RNA

A confirmação da homozigotia das plantas selecionadas para análise foi feita através de PCR para sequências específicas da inserção das linhas mutantes. Para este efeito, foi extraído o DNA de uma planta de cada uma das linhas *knockout* (KO) e de uma planta *wild type* (WT) como controlo. A quantificação e qualidade do DNA encontra-se apresentada na Tabela 3. Todas as plantas analisadas eram homozigóticas para a inserção, sendo observada apenas uma banda, consistente com a inserção do T-DNA em ambos os alelos do gene (Fig. 9)

Tabela 3. Quantificação e avaliação do DNA extraído das linhas mutantes de *Arabidopsis thaliana.*

Linha	Àcidos nucleicos(µg/µL)	260/280	260/230
WT	190.4	2.145	2.058
MT2	298.6	2.254	2.452
MT4	175.3	2.184	2.014
MT5	144.2	2.102	1.978

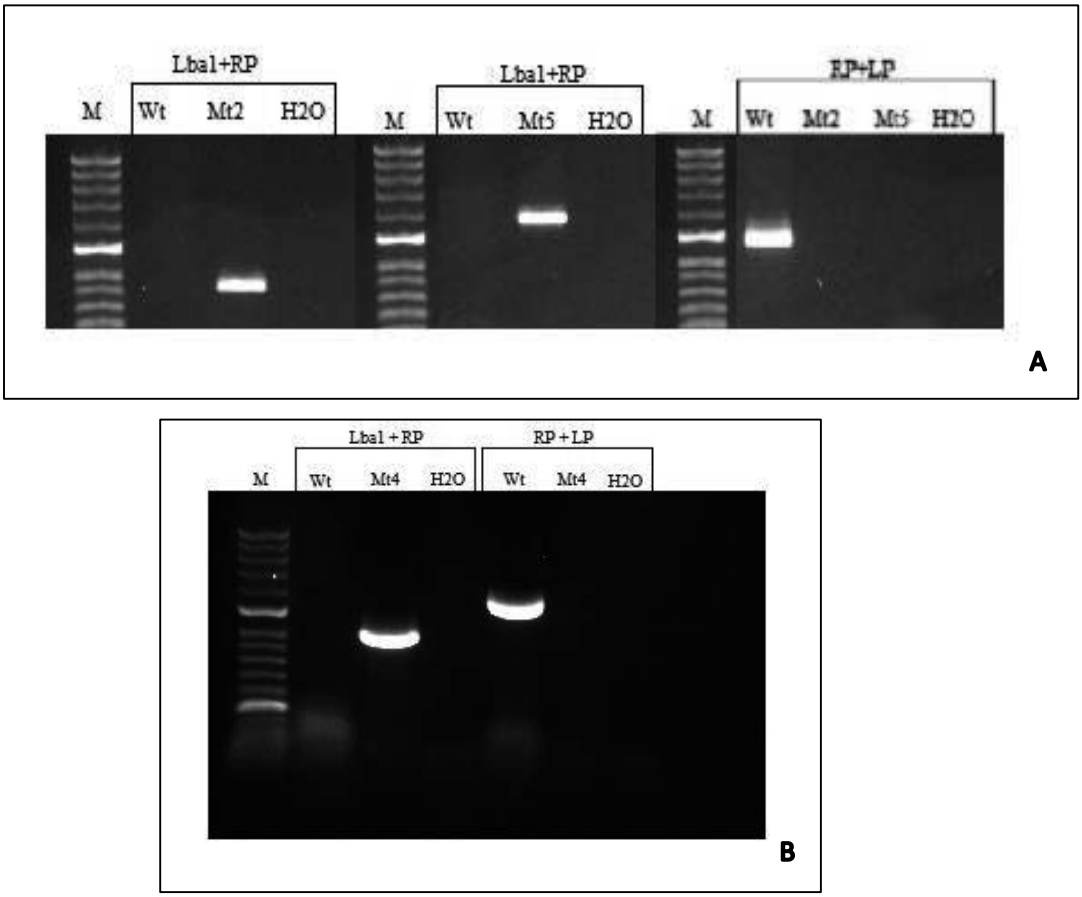


Figura 9. Identificação das plantas homozigóticas para a inserção de T-DNA nos genes *AT5G15390*, (Linha MT5), *AT4G17610* (Linha MT2) (A) e do gene *AT5G26880* da linha MT4 (B) através de PCR. M – marcador de DNA 0,05-2kb HyperLadderTM II (Bioline).

A indução de embriogénese somática foi feita recorrendo a sementes de silíquas imaturas de plantas com 8 semanas. Após 4 semanas em meio de indução todas as linhas apresentavam resposta tendo ocorrido, formação de embriões somáticos, formação de calo ou germinação.

A nível da formação de calo, estrutura que obteve maior percentagem de formação, os resultados foram de cerca 56% para a WT, 53% para MT2, 46% para MT4 e 39% para MT5 (Fig. 10). O calo formado apresentava uma cor esbranquiçada sem formação de estruturas embriogénicas ou organogénicas.

A percentagem de formação de embriões somáticos foi bastante díspar entre as linhas *knockout* e a *wild type.* A linha wild type apenas apresentou cerca de 6% de formação de embriões enquanto os valores para a MT2, MT4 e MT5 foram respectivamente, 25%, 32% e 18% e apresentavam uma cor verde e em alguns casos anomalias fenotípicas (Figs. 10B e 10C). Para além disto em algumas sementes ocorreu germinação precoce ou não foi obtida qualquer tipo de resposta.

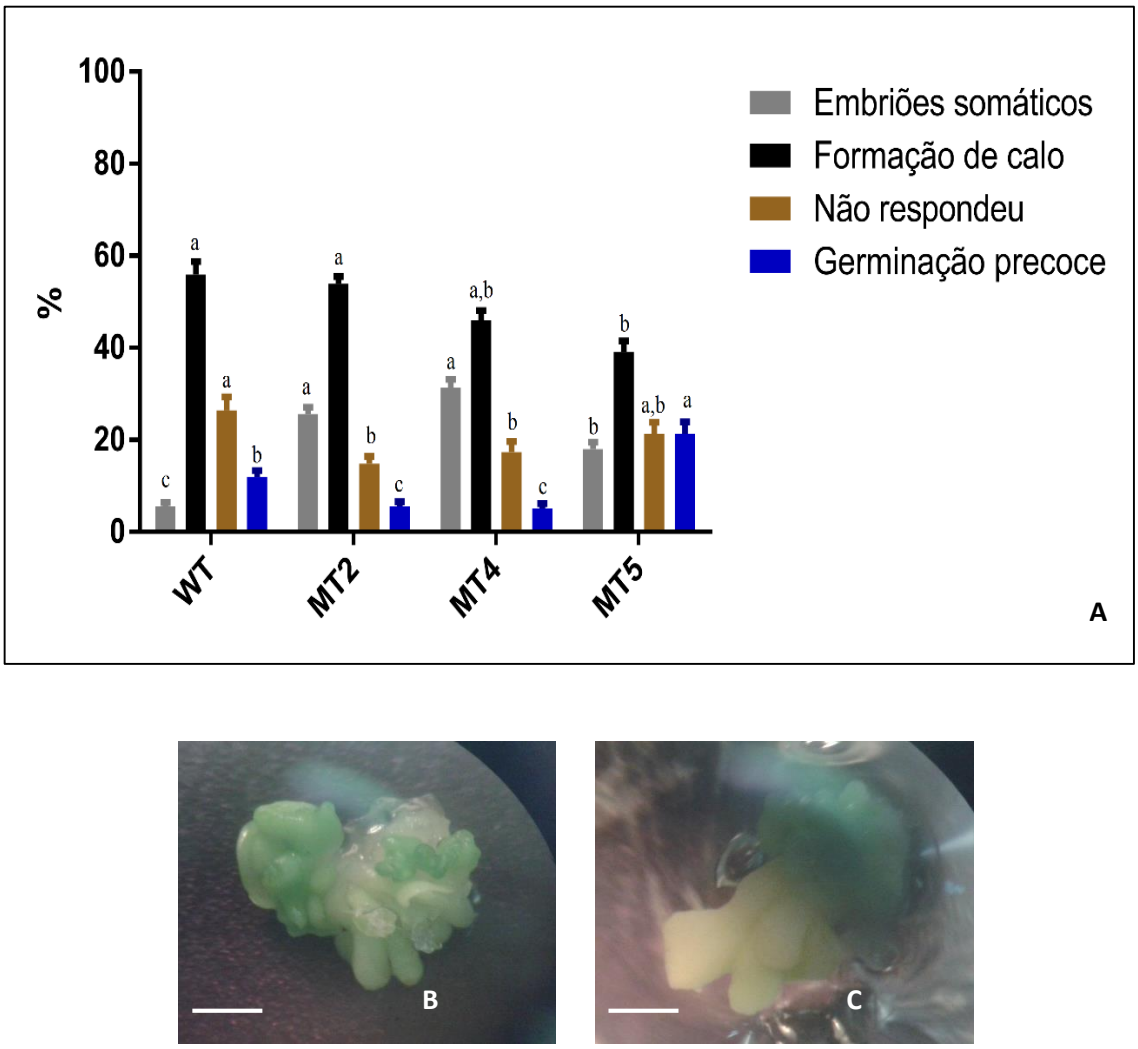


Figura 10. - Indução de ES nas linhas *knockout* de Arabidopsis para os genes *AT4G17610* (MT2), *AT5G26880* (MT4), *AT5G15390* (MT5), e na linha WT. **(A)** Percentagem de formação de embriões somáticos, de formação de calo, de sementes que não responderam ao tratamento e de sementes que germinaram precocemente da linha *wild type* (WT) e linhas *knockout* MT2, MT4 e MT5 de *A. thaliana* após 4 semanas em cultura no meio de indução B5 suplementado com 0,1 mg/L de 2,4-D retiradas de síliquas provenientes de plantas com 4 semanas de crescimento. Análise estatística efetuada com recurso ao Graphpad Prism 6. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as linhas de acordo com o teste de Tukey p<00,5). **(B-C)** Embriões somáticos formados após 4 semanas em cultura. As barras correspondem a 2 mm.

3.4 Observação do desenvolvimento morfológico em *Arabidopsis thaliana*

A medição da raiz principal e contagem do número de raízes secundárias efetuou-se em plantas colocadas a germinar durante 11 dias em caixas quadradas em posição vertical (Figs. 11A e 11B) e todas as linhas apresentaram resposta ocorrendo germinação e formação quer de raízes primárias quer de raízes secundárias.

Os resultados a nível do comprimento da raiz principal foram muito idênticos havendo apenas diferenças significativas entre a linha MT2 e a *wild type. Com comprimentos de* 10cm e 9,2cm, respectivamente com as outras duas linhas, MT4 (9,4cm) e MT5 (9,65cm) (Fig. 11C) a não apresentarem diferenças para as outras linhas.

Em relação ao número de raízes secundárias as linhas mutantes apresentaram resultados bastante diferentes da linha *wild type.* Para a linha wild type os valores medidos foram de 19,1 enquanto que para as linhas MT2, MT4 e MT5 foram respectivamente de, 28, 25 e 24,5 (Fig. 11C).

A nível do desenvolvimento das estruturas aéreas o seu tempo de formação foi medido ao longo das 5 semanas de crescimento das plantas (Tabela 4). A nível de resultados as 3 linhas mutantes apresentaram valores muito próximos. Em relação à comparação com a *wild type* a as linhas mutantes apresentaram sempre um desenvolvimento das suas estrutras mais tardio quando em comparação à *wild type.*

Para além disto não se registou diferenças nem anomalias fenotípicas entre as linhas mutantes e a linha *wild type*.

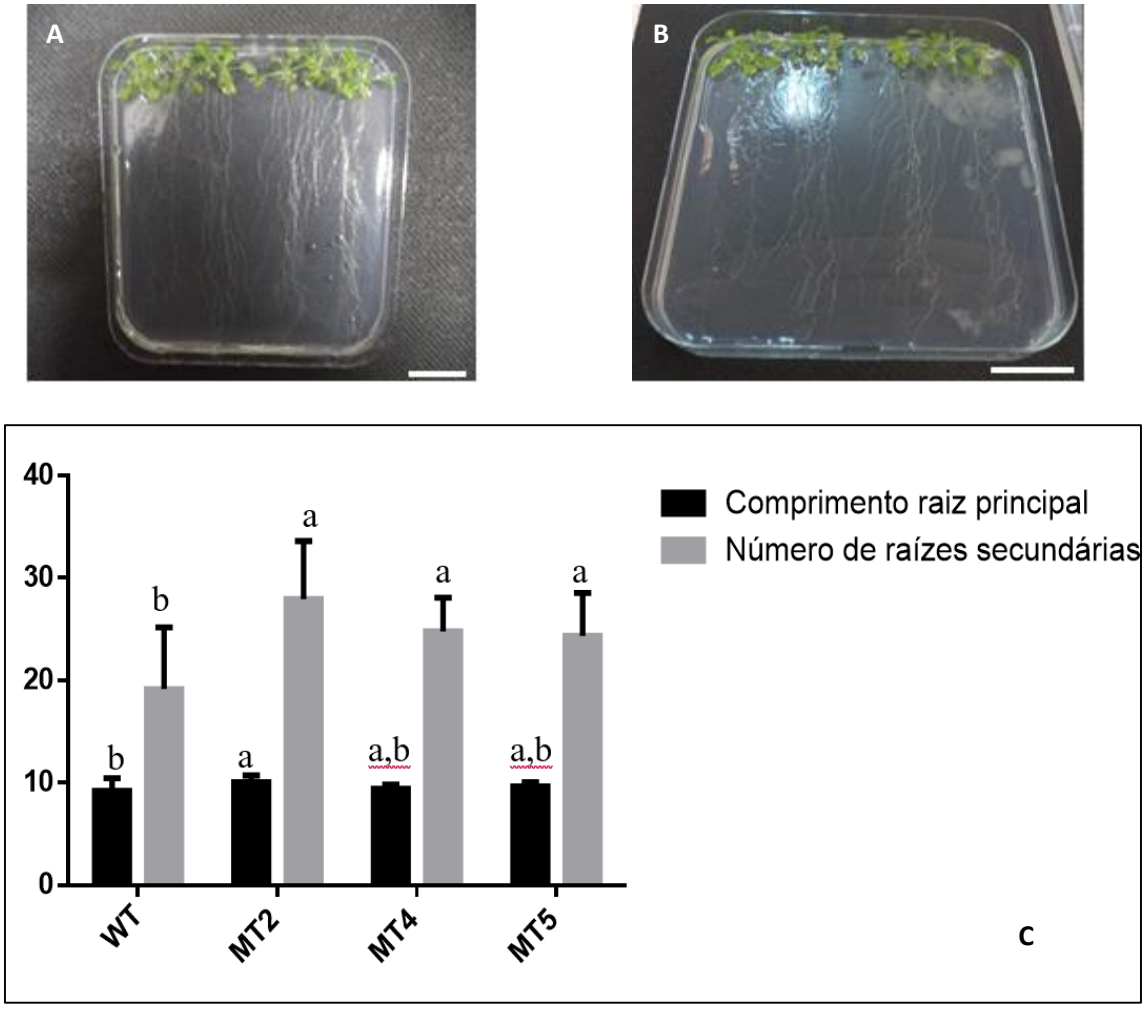


Figura 11. Ensaios para análise do desenvolvimento radicular das linhas *wild type* (WT) e *knockout* (MT2, MT4 e MT5). **(A-B)** Sementes após 11 dias em cultura. As barras correspondem a 2cm**). (C)** Comprimento (cm) da raiz principal e número de raízes secundárias para todas as linhas em estudo; os valores correspondem à média e desvio padrão de 5 réplicas com 10 plantas cada. Letras diferentes representam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 4- Estádios de crescimento registados (em número de dias) durante o período de análise do desenvolvimento morfológico de *A. thaliana*

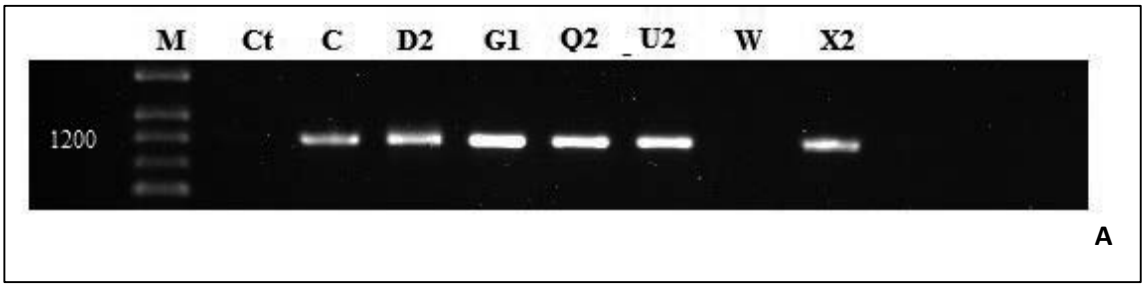
Descrição da etapa	WT	MT2	MT4	MT5
Radícula emerge do tegumento	3,7 ±0,2	3,6±0,04	3,6±0,2	3,7±0,2
Hipocótilo e cotilédones emergem do tegumento	5±0.3	5±0,1	4,9±0,2	4,9±0,2
Cotilédones completamente abertos	5,9±0.3	5,1±0,1	5,1±0,2	5,2±0,2
2 folhas de roseta	9,6±0,3	8,9±0,1	8,9±0,2	12,1±0,3
4 folhas de roseta	12,5±0,3	13±0,2	12,3±0,3	13,1±0,3
6 folhas de roseta	13,4±0,3	17,4±0,2	17,3±0,3	17,4±0,3
8 folhas de roseta	15,5±0,3	21,5±0,1	21,9±0,4	21,7±0,4
10 folhas de roseta	17,6±0,3	26±0,2	26,4±0,4	26,1±0,4
Primeiro botão floral	19±0,2	22±0,1	22,1±0,3	22,1±0,3
Primeiro botão floral aberto	21,7±0,2	26,9±0,1	26,4±0,3	26,4±0,3
Primeira síliqua	24,7±0,2	28,4±0,1	28,6±0,3	28,5±0,3
Primeira síliqua madura	40,5±0,2	41,6±0,1	41,3±0,3	41,6±0,3

3.5 Verificação da transformação e silenciamento para a *NEP-TC*

Para verificar a transformação das linhas de tamarilho para o gene codificante da NEP-TC extraiu-se DNA de folhas de plantas com 4 semanas de crescimento e analisou-se a presença do gene *NPTII* através de PCR

O resultado confirmou a transformação das linhas, C, D2, G1, Q2, U2 e X2, pela amplificação de uma banda de 1200 pares de bases, correspondente ao gene *NPTII*, e a não transformação da linha W, para a qual não se obteve amplificação, à semelhança da linha controlo (Ct) não transformada (Fig. 12A).

Para se verificar o silenciamento do gene nas linhas transformadas selecionadas para análise (C, G1, U2 e X2), procedeu-se à extração de RNA e posterior síntese de c-DNA a partir de tecidos das raízes e das folhas destas plantas e de plantas controlo. Os níveis de expressão da NEP-TC foram avaliados por RT-PCR, usando como valores de referência os níveis de expressão do gene de referência *EF1α* (Fig. 12B). Os resultados da expressão do gene NEP-TC nos diferentes tecidos e para as diferentes linhas encontra-se representado graficamente na Figura 12. Verificou-se que as linhas C e G1 apresentaram níveis de expressão elevados, sendo as linhas com maior nível de silenciamento as linhas U2 e X2.



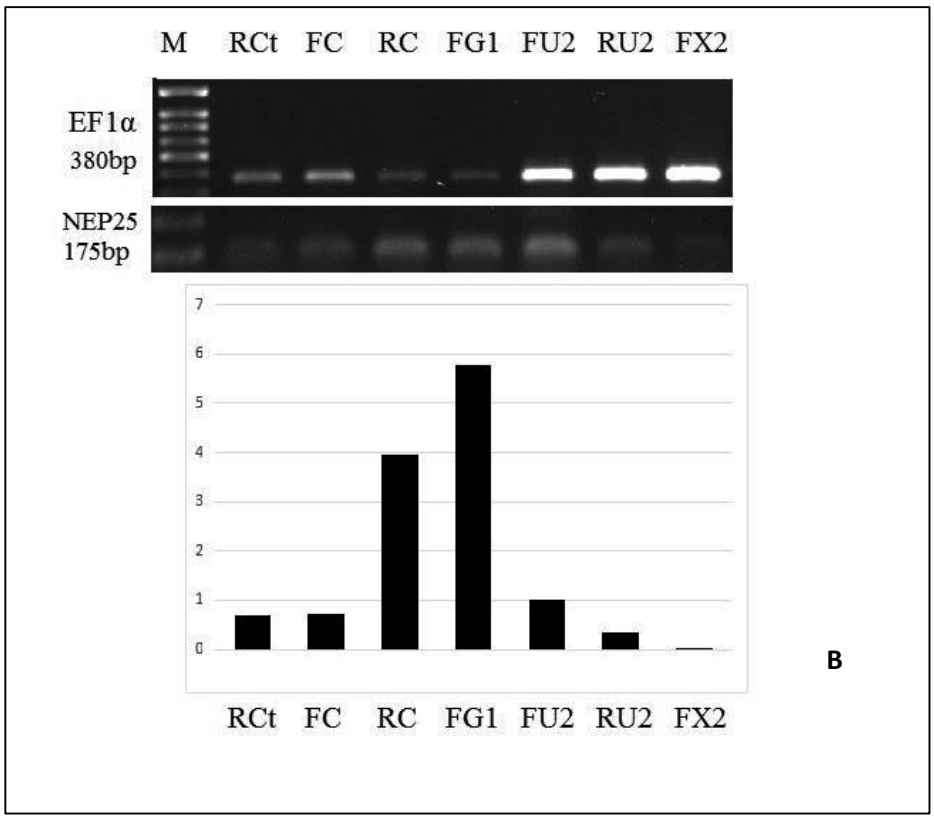


Figura 12. (A) Verificação da transformação das linhas de tamarilho com amplificação do gene *NPTII*. (B) Expressão do gene *NEP-TC* em folhas (F) e raízes (R) de plantas micropropagadas através de RT-PCR. A expressão foi estimada utilizando o software ImageJ e os valores normalizados relativamente à expressão de *EF1α.*

3.6 Análise do desenvolvimento das linhas de tamarilho

As medições do número de raízes adventícias, número de entrenós e comprimento das raízes foram feitas aquando da repicagem das plantas após 4 semanas de crescimento (Fig. 13).

Os resultados foram muito semelhantes entre todas as linhas para todos os ensaios. A nível do número de raízes o maior valor foi para a linha W com uma média de 2,2 raízes e o menor a linha Q2 com uma média de 1,5 com os outros valores a oscilar entre este dois não apresentado o teste de Tukey diferenças significativas entre as diferentes linhas.

A nível do número de entrenós o mesmo acontece não havendo diferenças significativas entre as linhas com o valor maior a ser novamente a linha W com ~6 entrenós e a o menor valor a ser da linha G1 com 4 entrenós. Para além disto também não se registaram diferenças fenotípicas entre as linhas *knockout* e as linhas *wild type.*

No que diz respeito ao comprimento das raízes, obtiveram-se também resultados bastante semelhantes entre as diferentes linhas. No entanto, neste caso, o teste de Tukey permitiu detectar diferenças significativas para a linha X2 e as outras sendo o comprimento médio das suas raízes superior. Diferenças estatisticamente significativas foram também detectadas entre entre a linha W e a linha U2, com esta última a apresentar o menor comprimento médio.

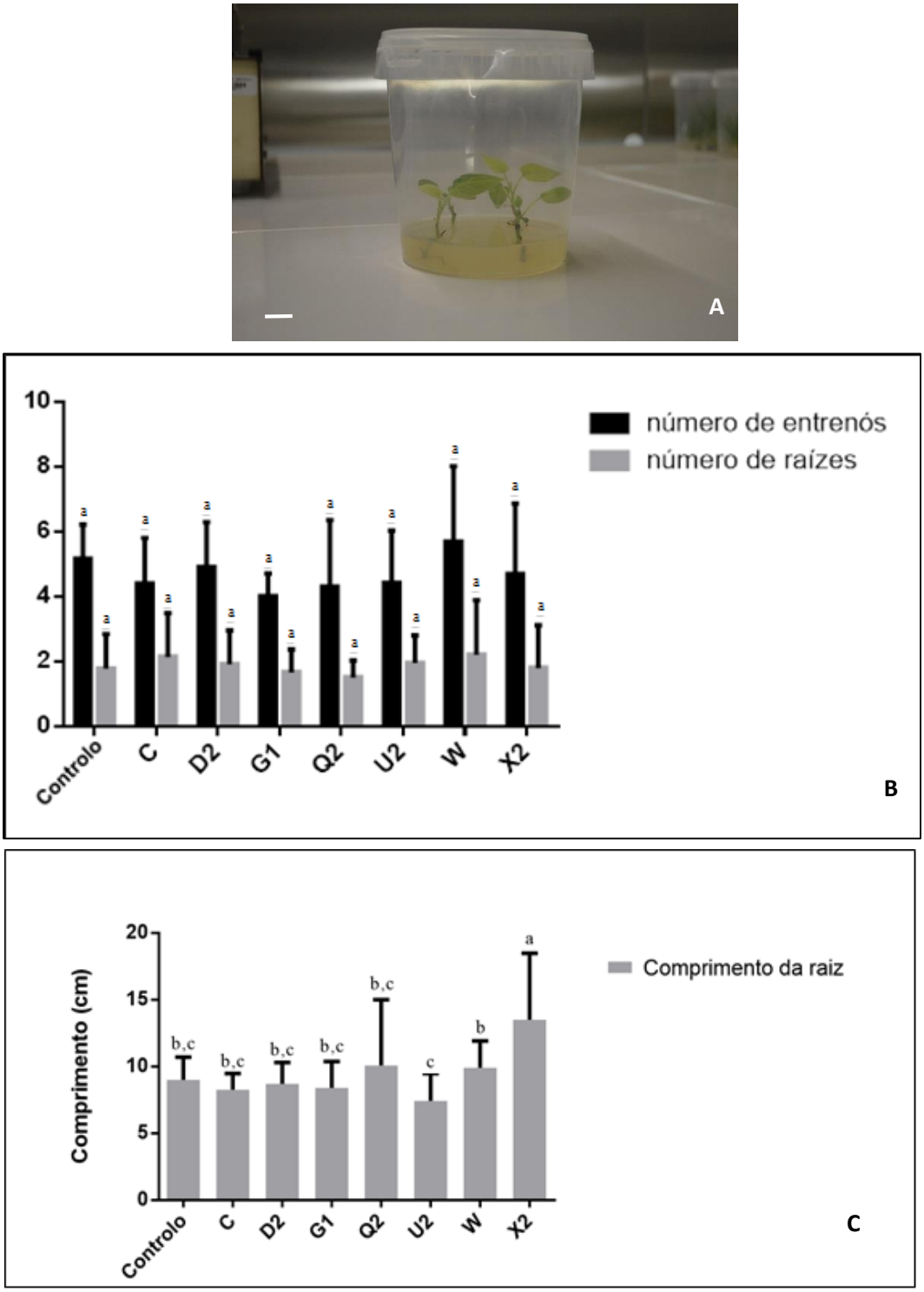


Figura 13. **(A)** Plantas de tamarilho a crescer em meio MS durante 4 semanas. A barra corresponde a 2 cm **(B)** número de entrenós e número de raízes para todas as linhas em estudo, os valores correspondem à média e ao desvio-padrão. Letras diferentes significam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$). **(C)** Comprimento das raízes para todas as linhas em estudo os valores correspondem à média e ao desvio-padrão. Letras diferentes significam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$).

3.7 Indução de embriogénese somática em tamarilho

Para a indução de embriogénese somática colocaram-se explantes foliares em meio TP suplementado com 5mg/L picloram e analisou-se a resposta em termos de desdiferenciação dos explantes e desdiferenciação com formação de calo embriogénico. Todas as linhas, à excepção da linha U2, apresentaram algum tipo de resposta às condições de indução testadas, com desdiferenciação dos explantes foliares e formação de calo. As percentagens (Fig. 14) variaram entre os 50 e os 96% de resposta com a resposta mais alta tendo sido obtida para a linha G1 e a mais baixa para as linhas Q2 e controlo (Ct).

Relativamente à indução de calo embriogénico em função da percentagem de explantes onde ocorreu resposta, apesar de 7 das 8 linhas terem apresentando resposta ao meio apenas em 3 delas (D2, G1 e W) ocorreu formação de calo embriogénico. Para essas linhas as percentagens de formação de calo embriogénico (Fig. 14) foi de 35% para a linha D2, 10% para a linha G1 e 29% para a linha W.

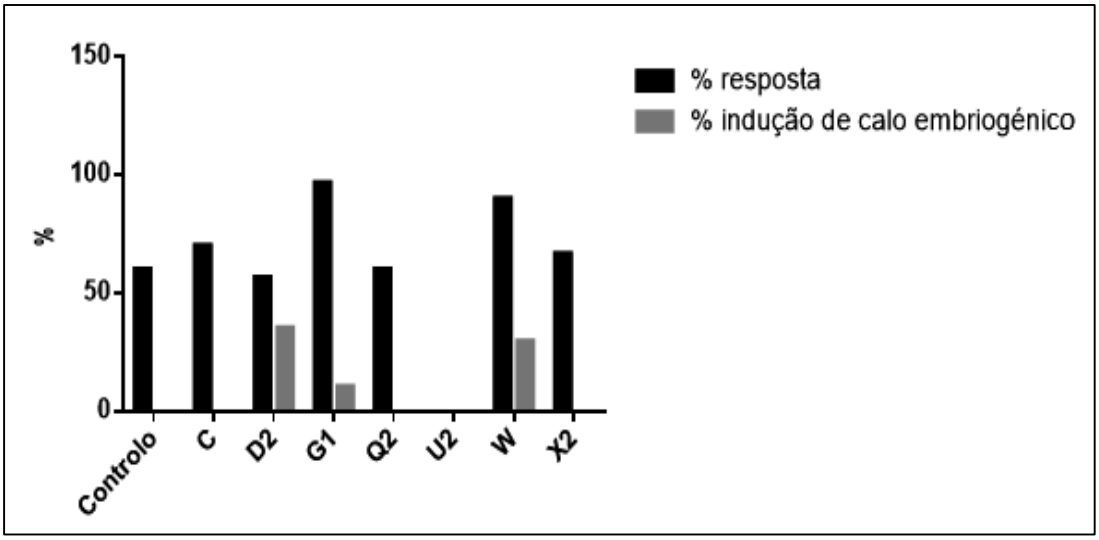


Figura 14. Percentagem de explantes onde se obteve resposta ao meio, com desdiferenciação e formação de calo, e percentagem de explantes que deram origem a

4. Discussão e conclusão

4.1 Papel das SpoU metiltransferases na indução de embriogénese somática

A embriogénese somática é um procedimento bastante importante na micropropagação vegetal (Zimmerman, 1993), e apresenta imensas potencialidades para diversos estudos moleculares, citológicos, fisiológicos e de desenvolvimento (Figueroa *et al*, 2006). Para além disso, é um procedimento já descrito para várias solanáceas como por exemplo o tabaco (Haccius e Lakshmanan, 1965) e tamarilho (Canhoto *et al*, 2005).

Assim, procurou-se analisar a diferença a nível das taxas de indução entre plantas não transformadas e plantas com inserções de T-DNA para o gene *NEP-TC* em tamarilho e entre linhas de *Arabidopsis thaliana* com elevada similaridade à NEP-TC. Para a análise dos resultados é importante referir que para o tamarilho as linhas usadas apresentavam apenas um silenciamento parcial do gene NEP-TC enquanto as linhas de *Arabidopsis thaliana* apresentavam um silenciamento total do gene.

Em relação a *Arabidopsis thaliana,* neste trabalho utilizaram-se linhas com silenciamento para genes codificantes SpoU metiltransferases que partilham o domínio conservado SpoU MeTrfase (IPR001537) e analisaram-se alguns dos seus efeitos funcionais. Este trabalho com as linhas MT2 (*AT4G17610*), MT4 (*AT5G26880*) e MT5 (*AT5G15390*), segue o trabalho desenvolvido por Correia (2011) com a linha KO7 (mutante para o gene *AT4G15520* da mesma superfamília) e por Fernandes (2014) com as linhas KO7 (mutante para *AT4G15520*) e MT5 (mutante para *AT5G15390*).

A nível dos ensaios de embriogénese somática os resultados revelaram uma grande diferença sendo essa diferença significativa estatisticamente entre a linha *wild type* e as linhas *knockout.* Estes resultados vão ao encontro dos resultados obtidos por

Fernandes (2014), onde apesar de não ter sido obtido diferenças significativas as linhas mutantes, estas apresentaram uma maior percentagem de indução de embriogénese. Para além disto vai também de encontro a resultados anteriores, nos quais se obteve uma maior indução de embriogénese na linha knockout para o homólogo da NEP-TC comparativamente com a linha *wild type* (Correia, 2011).

Estes dados apontam para que a metilação de RNA promovida por estas proteínas afecte negativamente a embriogénese somática. Xiao e colaboradores (2006) demonstraram que a metilação de DNA promovida pelos genes *MET1* e *CMT3 DNA* metiltransferase é essencial para o processo de embriogénese ao metilar DNA codificantes de transposões (Kakutani et al, 2004) inibindo-os e impedindo que eles silenciem genes essenciais para o processo. Estes dados demonstram que para o processo de embriogénese diferentes tipos de metilação promovem respostas diferentes e demonstram o alto nível de regulação que este processo sofre. No entanto, são raras as referências ao papel específico da metilação de RNA no desenvolvimento vegetal e particularmente no processo de embriogénese somática.

Embora muitos dos mecanismos que regulam a embriogénese somática ainda sejam desconhecidos assim como o efeito através da qual a NEP-TC e provavelmente outras proteínas metiltransferases de RNA desta família exercem um efeito negativo na embriogénese, estudos sobre as mesmas poderão tornar-se importantes para desvendar um pouco mais dos mecanismos que regulam a embriogénese assim como compreender aspectos relacionados com a origem embriogénica.

Em relação aos resultados de embriogénese somática em tamarilho é necessário referir que neste estudo o controlo não revelou qualquer indução de calo embriogénico. Devido a isto deveriam ter sido feitos mais ensaios com a linha controlo, mas devido ao

facto de este processo demorar cerca de 3 meses tornou-se inviável fazer novas réplicas e ter os resultados a tempo de os apresentar neste estudo. Apesar disso os resultados em relação às linhas transformadas foram bastante interessantes. Três linhas apresentaram indução de calo embriogénico e com taxas de 35% para a linha D2, 10% para a linha G1 e 29% para a linha W. Em relação aos resultados apresentados por Correia (2011) as taxas de indução das linhas transformadas foram muito semelhantes, mas neste caso ocorrendo diferenças para com o controlo.

De acordo com o que foi previamente referido relativamente ao controlo, novos testes deverão ser feitos para tentar confirmar as diferenças descritas entre as linhas transformadas e a linha controlo. Apesar disso estes resultados estão de acordo com os registados para *Arabidopsis thaliana* com as linhas *knockout* a revelarem diferenças significativas e maiores taxas de indução de embriogénese somática comparativamente ao fenótipo selvagem.

Vários estudos demonstram o papel importante que os processos de metilação possuem na regulação do processo de embriogénese somática (Santos *et al*, 2002; De-la-Peña *et al*, 2015). Os dados apresentados nas secções anteriores sobre as induções de embriogénese somática vão ao encontro destes dados, demonstrando o papel que a NEP-TC tem como regulador negativo deste processo.

Como referido anteriormente, apesar de se conhecer o efeito de proteínas metiltransferases na regulação de embriogénese somática pouco se sabe acerca do modo como essa regulação é efetuada. Assim, é necessário a realização de estudos moleculares sobre a função destas proteínas para complementar os estudos de caracterização funcional.

4.2 Observação do desenvolvimento morfológico

Para verificar se as inserções de T-DNA em *Arabidopsis* e o silenciamento do gene da NEP-TC em tamarilho provocariam diferenças fenotípicas foram recolhidos dados sobre o desenvolvimento morfológico como os tempos de aparecimento das estruturas da planta em *Arabidopsis,* e dados sobre as raízes e os entrenós, nas duas plantas e no tamarilho respetivamente.

A nível do desenvolvimento planta os resultados relativos à análise fenotípica foram muito semelhantes para as três linhas mutantes. Em comparação com com o fenótipo selvagem, o desenvolvimento foi semelhante até ao aparecimento da roseta. A partir dessa fase as linhas mutantes apresentaram sempre tempos de desenvolvimento mais tardios. Por exemplo, a formação do primeiro botão floral deu-se ao 19º dia na linha *wild type* e ao 22º nas outras três linhas mutantes. Em comparação com os resultados obtidos por Fernandes (2014), os resultados são semelhantes embora tenha havido uma diferença ligeiramente maior entre a linha *wild type* e as linhas *knockout*, o que poderá ser explicado pelo aparecimento de estruturas (descritas na tabela 4 em períodos curtos de 2 dias). Liu e colaboradores (2016) analisaram o efeito de linhas *knockout* para dois genes codificantes de metiltransferases de histonas (SDG8 e SDG26) no desenvolvimento e fenótipo da planta e tendo verificado a ocorrência de anomalias fenotípicas tais como o reduzido tamanho da planta, reduzido tamanha das folhas e baixo teor em clorofila. No entanto, em termos de floração, os mutantes apresentaram floração mais cedo que a linha *wild type.* Neste caso, o silenciamento destas proteínas revelou-se muito influente no fenótipo da planta revelando assim o importante papel que metiltransferases de histonas têm no desenvolvimento da planta. Este estudo prova que um dos mecanismos que regula

o desenvolvimento da planta adulta funciona através de proteínas metiltransferases. Estes dados, juntamente com os registados neste trabalho, parecem indicar que a família de metiltransferases de RNA em estudo contribui de forma significativa para esta regulação do desenvolvimento e para a formação de estruturas principalmente no sistema radicular.

A nível do sistema radicular de *A. thaliana,* os parâmetros medidos foram o comprimento da raiz principal e o número de raízes secundárias. No que diz respeito ao comprimento da raiz principal só se obtiveram diferenças significativas entre a linha MT2 e a linha *wild type*. Em relação ao número de raízes secundárias foram registadas diferenças significativas entre a linha *wild type* e as linhas mutantes. Estes resultados vão de encontro ao registado por Fernandes (2014) onde também foi registado uma diferença significativa no número de raízes secundárias e no comprimento da raiz principal. Comparando ainda estes resultados com os obtidos por Wieckowski *et al*, (2012), que analisaram o efeito de *knockouts* para o gene dim1A, codificador de uma proteína *18s rRNA S-adenosyl-L-Met (SAM)-dependent adenosine dimethyltransferase* responsável pela metilação de duas adenosinas adjacentes na extremidade 3' do RNAr 18s em eucariotas e 16s em procariotas e pela maturação do rRNA, foram verificados resultados contraditórios. Aqueles autores observaram que as raízes das linhas *knockout* eram cerca de 50% mais pequenas que no fenótipo selvagem enquanto neste trabalho se verificou que as linhas mutantes apresentaram um comprimento maior da raiz assim como um maior número de raízes secundárias. Isto demonstra que diferentes metiltransferases dentro da mesma família (dependentes de SAM) podem ter diferentes efeitos na mesma estrutura. Este facto poder-se-á dever à sua atuação como regulador negativo ou regulador

positivo na estrutura/proteína alvo. Estudos mais aprofundados são necessários para esclarecer o mecanismo de actuação destas proteínas.

Estes resultados apontam para uma influência destas proteínas no desenvolvimento do sistema radicular. Como o desenvolvimento radicular está sujeito a regulação por hormonas, em particular etileno e auxinas, uma hipótese será estas linhas efetuarem algum tipo de controlo sobre estas hormonas, que poderá ser quer ao nível da sua biossíntese quer ao nível da sua interação com os tecidos alvos.

No que diz respeito ao tamarilho foram registados os comprimentos e número das raízes e número de entrenós. Tanto ao nível do número de entrenós como no número de raízes os resultados não demonstraram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros para qualquer linha. No que diz respeito ao comprimento das raízes uma das linhas transformadas o valor médio foi maior registando-se uma diferença significativa para as outras plantas avaliadas. A outra linha transformada apresentou um crescimento radicular mais reduzido, sendo a diferença também estatisticamente significativa

Todos estes resultados acimas descritos apontam para que esta família de proteínas metiltransferases de RNA em estudo exerça um papel importante no desenvolvimento da planta. Como referido anteriormente esse papel parece ser maior no sistema radicular e embora as diferenças a nível da parte aérea não tenham sido muito acentuadas, os resultados evidenciam também algum envolvimento destas proteínas nesta região da planta.

4.3. Conclusões e perspetivas futuras

Os resultados descritos neste trabalho vêm confirmar estudos anteriores sobre a função da proteína NEP-TC e proteínas homólogas em *Arabidopsis thaliana* no processo de embriogénese somática. Para a *A. thaliana* verificou-se para todas as linhas *knockout* um aumento das taxas de indução de embriogénese somática o que confirma o efeito como regulador negativo que a NEP-TC exerce sobre a embriogénese. Para o tamarilho verificou-se o mesmo embora apenas em algumas linhas transformadas, mas novamente as linhas com silenciamento para a NEP-TC obtiveram maiores taxas de indução confirmando assim o efeito de regulador negativo desta proteína.

No que diz respeito ao desenvolvimento morfológico da planta os resultados permitem concluir que existe uma grande influência destas proteínas a nível radicular. Ao nível da parte aérea da planta os resultados demonstraram um atraso do desenvolvimento das estruturas aéreas da planta nas linhas *knockout* em relação à *wild type* o que pode sugerir que ao contrário do que acontece nas raízes estas proteínas exercem uma influência positiva diminuindo o tempo de desenvolvimento das estruturas.

Com novos dados acerca do efeito funcional destas proteínas abrem-se portas para novos estudos acerca do modo através do qual estas proteínas regulam o processo de embriogénese somática pois embora seja um processo muito utilizado ainda muito se desconhece sobre os mecanismos que o regulam.

5. Referências

Atkinson RG., Gardner RC (1993) Regeneration of transgenic tamarillo plants. *Plant Cell Rep* 12: 347-351.

Bai, B., Su, Y. H., Yuan, J., & Zhang, X. S. (2013). Induction of somatic embryos in Arabidopsis requires local YUCCA expression mediated by the down-regulation of ethylene biosynthesis. *Molecular plant*, *6*(4), 1247-1260.

Bauerle, M. R., Schwalm, E. L, & Booker, S. J. (2015). Mechanistic diversity of radical S-adenosylmethionine (SAM)-dependent methylation. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(7), 3995-4002.

Ben-Hayyim, G., & Neumann, H. (1983) Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in Citrus callus cultures. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie ,110:331-337.

Benson E (2000) Special symposium: In vitro plant recalcitrance in vitro plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 36:141-148

Berman, J., Zhu, C., Pérez-Massot, E., Arjó, G., Zorrilla-López, U., Masip, G., & Bai, C. (2013). Can the world afford to ignore biotechnology solutions that address food insecurity? Plant molecular biology, 83(1-2), 5-19.

Bohs, L., Olmstead, R. G. 1995. Solanum phylogeny inferred from chloroplast DNA sequence data. In: Proceedings of the Fourth International Solanaceae Conference, Adelaide, Australia.

Bonga JM., Klimaszewska KK, Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 100: 241-254

Borlaug, N. E. (2000). Ending world hunger. The promise of biotechnology and the threat of antiscience zealotry. *Plant Physiology*, 124(2), 487-490.

Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, VK., Kieft, H., Ouelle,t T., Zhang L., Hattori J., Liu, C-M., van Lammeren, AAM., Miki, BLA., Custers, JBM., van Lookeren Campage, MM. (2002) Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14: 1737–1749

Boyes, DC., Zayed, AM., Ascenzi, R., McCaskill, AJ., Hoffman, NE., Davis KR, Görlach J. (2001) Growth stage-Based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13: 1499-1510.

Canhoto, JM., Lopes ML., Cruz, GS. (2005) Protocol of somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.). In: SM Jain, PK Gupta (Eds.) Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody plants, Dordrecht, Springer. pp. 379-389.

Cheng, Z, J., Wang, L., Sun, W., Zhang, Y., Zhou, C., Su, Y. H., & Cheng, Y. (2013). Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by *AUXIN RESPONSE FACTOR3*. *Plant Physiology*, 161(1), 240-251.

Cid, L.P.B. (2001) A propagação in vitro de plantas. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, v. 2, n.19, p.16-21,.

Cloutier, P., Lavallée-Adam, M., Faubert, D., Blanchette, M., & Coulombe, B. (2013). A newly uncovered group of distantly related lysine methyltransferases preferentially interact with molecular chaperones to regulate their activity. Public Library of Science Genet, 9(1), e1003210.

Correia, S. I., & Canhoto, J. M. (2012). Biotechnology of tamarillo (Cyphomandra betacea): From in vitro cloning to genetic transformation. *Scientia Horticulturae*, *148*, 161-168.

Correia, SI., Lopes, ML., Canhoto JM. (2009) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): recent advances. *Acta Horticulturae*. 839: 157-164.

Correia S (2011) Somatic embryogenesis in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (tamarillo): optimization and molecular analysis. Tese de doutoramento. Universidade de Coimbra.

De-la-Peña, C., Nic-Can, G, I., Galaz-Ávalos, R. M., Avilez-Montalvo, R., & Loyola-Vargas, V. M. (2015). The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. *Frontiers in plant science*, 6:635.

Dodeman, V. L., Ducreux, G., & Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, *48*(8), 1493-1509.

Ebad, F. A. S., El-Sadek, M. E. L. S. A., & El-Kazzaz, A. A. (2015). Micropropagation of four potato cultivars in vitro. *Academia Journal of Agricultural Research*, *3*(9), 184-188.

Fernandes, P. M. (2014). Embriogénese somática em solanáceas: integração de sistemas modelo alternativos baseados no tamarilho. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra.

Figueroa F., Avalos, R., Vargas, V. (2006) Embryo production trough somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86: 285-301.

Gavish, H., Vardi, A., & Fluhr, R. Extracellular proteins and early embryo development in Citrus nucellar cell cultures. *Physiologia Plantarum*, 82:606-616, 1991.

Gliwicka, M., Nowak, K., Balazadeh, S., Mueller-Roeber, B., & Gaj, M. D. (2013). Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana. *Public library of Science one*, *8*(7), e69261.

Guimarães, MLS., Cruz, S., Montezuma-de-Carvalho, JM. (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 15: 161-167.

Guimarães, M., Tomé, M., Cruz, G., (1996) *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo). Em: Bajaj YPS (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Trees IV. Springer-Verlag. Berlin. pp. 120-137.

Haccius, B., & Lakshmanan, K. K. (1965). Adventiv-Embryonen aus Nicotiana-Kallus, der bei hohen Lichtintensitäten kultiviert wurde. *Planta*: 65, 102-104.

Hecht, V., Vielle-Calzada, J-P., Hartog, MV., Schmid,t EDL., Boutilie,r K., Grossniklaus, U., de Vries, SC. (2001) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* 127: 803–816.

Hermann, A., Gowher, H. Jeltsch, A. (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular Molecular Life Sciences*. 61 2571–2587.

Ikeda-Iwai, M., Satoh, S., Kamada, H. (2002) Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of Arabidopsis somatic embryos. *Journal of Experimental Botany* 53: 1575–1580.

Jurgens, G., Mayer, U. (1992). Arabidopsis. In: *BARD*, J. (ed.). Embryos: A colour atlas of developing embryos. London, Wolfe. P. 32-37.

Cui, K., Xing, G., Zhou, G., Liu, X., & Wang, Y. (1999). The induced and regulatory effects of plant hormones in somatic embryogenesis. *Hereditas/Zhongguo yi chuan xue hui bian ji*, 22(5), 349-354.

Kakutani, T., Kato, M., Kinoshita, T., and Miura, A. (2004). Control of development and transposon movement by DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 69, 139–143.

Li, T., Chen, J., Qiu, S., Zhang, Y., Wang, P., Yang, L., & Shi, J. (2012). Deep sequencing and microarray hybridization identify conserved and species-specific microRNAs during somatic embryogenesis in hybrid yellow poplar. *Public Librabry of Science One*, *7*(8), e43451.

Liu, B., Berr, A., Chang, C., Liu, C., Shen, W. H., & Ruan, Y. (2016). Interplay of the histone methyltransferases SDG8 and SDG26 in the regulation of transcription and plant flowering and development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(4), 581-590.

Lopes, ML., Ferreira, MR., Carloto, JM., Cruz, GS., Canhoto, JM. (2000) Somatic embryogenesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). Em: SM Jain, PK Gupta, RJ Newton (Eds.) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 6. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. pp. 433-455

Meadows, LR. (2002) Growing tamarillo relatives. In: The New Zealand Home Garden. www.naturalhub.com. Acedido em Janeiro 2016

Mueller, L. A., Solow, T. H., Taylor, N., Skwarecki, B., Buels, R., Binns, J., ... & Herbst, E. V. (2005). The SOL Genomics Network. A comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology*, *138*(3), 1310-1317.

Nicot, N., Hausman, JF., Hoffmann, L., Evers, D. (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* Bot 56: 2907-2914.

Ohtani M (2015) Regulation of RNA metabolism is important for in vitro dedifferentiation of plant cells. *Journal of Plant Research* 128(3), 361-369.

Olmstead, R. G., Palmer, J. D. 1992. A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution. Ann. Missouri Bot. Gard. 79: 346- 360.

Prohens, J., Nuez F (2001) The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): a review of a promising small fruit crop. *Small Fruits Review* 1: 43-68.

Piyatrakul, P., Putranto, R-A., Martin, F., Rio, M., Dessailly, F., Leclercq, J., Dufayard, J-F., Lardet, L., Montoro, P. (2012) Some ethylene biosynthesis and AP2/ERF genes reveal a specific pattern of expression during somatic embryogenesis in Hevea brasiliensis. *BMC Plant Biology* 12:244

Podio, M., Felitti, SA., Siena, LA., Delgado, L., Mancini, M., Seijo, JG., González, AM., Pessino, SC., Ortiz, JP. (2014) Characterization and expression analysis of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK)* genes in sexual and apomictic Paspalum notatum. *Plant Molecular Biology* 84: 479. doi:10.1007/s11103-013-0146-9

Qaim, M. (2009) The economics of genetically modified crops. Annu Rev Resour Econ 1:665–693

Ramasamy, C., Selvara,j KN., Norton, GW., Vijayragahavan, VK. (2007) Economic and environmental benefits and costs of transgenic crops: an ex-ante assessment. Tamil Nadu Agricultural University Press, Coimbatore

Ramessar, K., Capell, T., Twyman RM, Quemada, H., Christou, P. (2009) Calling the tunes on transgenic crops: the case for regulatory harmony. *Molecular Breeding* 23:99–112

Rastogi, S., Dwivedi, U. (2007) Manipulation of lignin in plants with special reference to O-methyltransferase. *Plant Science* 174 264–277

Rupps, A., Raschke, J., Rümmler, M., Linke, B., & Zoglauer, K. (2016). Identification of putative homologs of Larix decidua to *BABYBOOM (BBM),*

LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), WUSCHEL-related *HOMEOBOX2 (WOX2) and SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-like KINASE (SERK)* during somatic embryogenesis. *Planta*, 243(2), 473-488.

Santos, D., & Fevereiro, P. (2002). Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in Medicago truncatula. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,70(2), 155-161.

Spooner, D. M., Anderson, G. J. & Jansen, R. K. 1993. Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). Amer. J. Bot. 80: 676- 688.

Stepanova, AN., Alonso, JM. (2003) T-DNA mutagenesis in Arabidopsis. In: E Grotewold (Ed.) *Plant Functional Genomics*, Totowa, NJ: Humana Press. pp. 177-188.

Su, Y. H., Liu, Y. B., Zhou, C., Li, X. M., & Zhang, X. S. (2016). The microRNA167 controls somatic embryogenesis in Arabidopsis through regulating its target genes ARF6 and ARF8. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *124*(2), 405-417.

Tkaczuk, K., Horkawicz, S., Purta, E., Bujnicki, J. (2007) "Structural and evolutionary bioinformatics of the SPOUT superfamily of methyltransferases". *BMC Informatics* 8: 73 – 105

Vasco, C., Avila, J., Raules, J., Svanberg, U., Kamal-Eldin, A. (2009) Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (Solanum betaceum Cav.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*; 60(S7): 278_288

Wang, H., Caruso, LV., Downie, AB., Perry, SE. (2004) The embryo MADS domain protein AGAMOUS-like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *The Plant Cell 16*: 1206–1219

Xiao, W., Custard, K. D., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Harada, J. J., Goldberg, R. B., & Fischer, R. L. (2006). DNA methylation is critical for Arabidopsis embryogenesis and seed viability. *The Plant Cell*, *18*(4), 805-814.

Wieckowski, Y., & Schiefelbein, J. (2012). Nuclear ribosome biogenesis mediated by the DIM1A rRNA dimethylase is required for organized root growth and epidermal patterning in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(7), 2839-2856.

Yang, X., Wang, L., Yuan, D., Lindsey, K., Zhang, X (2013) Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryigenesis. *Journal of Experimental Botany*.

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nature protocols*, 1(2), 641-646.

Zheng, Q., Zheng, Y., & Perry, S. E. (2013). AGAMOUS-Like15 promotes somatic embryogenesis in Arabidopsis and soybean in part by the control of ethylene biosynthesis and response. *Plant Physiology*, 161(4), 2113-2127.

Zhou, T., Yang, X., Guo, K., Deng, J., Xu, J., Gao, W., ... & Zhang, X. (2016). ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton. *Molecular & Cellular Proteomics*, *15*(6), 2108-2124.

Zimmerman, JL. (1993) Somatic embryogenesis: a model of early development in higherplants. *The Plant Cell* 5: 1411-1423