



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Amanda Santos de Alencar

**Alterações epigenéticas na morfogênese *in vitro*:
estudo comparativo de padrões de metilação de DNA durante a
organogênese e a embriogênese somática em
Solanum melongena L. (berinjela)**

Rio de Janeiro

2019

Amanda Santos de Alencar

Alterações epigenéticas na morfogênese *in vitro*: estudo comparativo de padrões de metilação de DNA durante a organogênese e a embriogênese somática em *Solanum melongena* L. (berinjela)

Dissertação apresentada, como requisito para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação de Utilização da Biodiversidade.

Orientadora: Prof.^a Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dra. Jaqueline Gusmão da Silva

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

A368 Alencar, Amanda Santos de.
Alterações epigenéticas na morfogênese in vitro: estudo comparativo de padrões de metilação de DNA durante a organogênese e a embriogênese somática em *Solanum melongena* L. (berinjela)/ Amanda Santos de Alencar– 2019.
93 f. : il.

Orientadores: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira, Jaqueline Gusmão da Silva
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Berinjela – Teses. 2. Genética vegetal – Teses. I. Oliveira, Elisabeth Atalla Mansur de. II. Silva, Jaqueline Gusmão da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 582.951.4

Patricia Bello Meijinhos – CRB/7 – 5217 – Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Amanda Santos de Alencar

Alterações epigenéticas na morfogênese *in vitro*: estudo comparativo de padrões de metilação de DNA durante a organogênese e a embriogênese somática em *Solanum melongena* L. (berinjela)

Dissertação apresentada, como requisito para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação de Utilização da Biodiversidade.

Aprovada em 09 de agosto de 2019.

Orientadores:

Prof.^a Dra Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra Jaqueline Gusmão da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca examinadora:

Prof.^a Dra Georgina Pacheco Peters de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr Fabiano Salgueiro
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Gilberto Sachetto Martins
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

À Célia, Maria e José por tudo que me possibilitaram todos esses anos.

Aos meus pais pela dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós e pais, que me deram a possibilidade de estudar e me tornar o que eu sou hoje. Devo isso a vocês. Muito obrigada por todo o apoio e por fazerem o melhor. À minha irmã Duda pela compreensão da minha ausência. À minha tia Vânia pelo apoio e conversas.

Às minhas amigas Vic e Renata, por serem as minhas irmãs. Eu não tenho como explicar o quanto vocês são importantes pra mim. Muito obrigada por todas as palavras de carinho, os conselhos e o apoio. Vocês fazem parte da família que eu escolhi para mim. Amo vocês!

À Ana, Vinicius e Tielen, por estarem nessa jornada louca comigo. Muito obrigada pelo apoio e pelas (intermináveis) risadas. Saber que eu poderia contar com vocês a qualquer hora do dia ou da noite fez toda a diferença. Não sei se posso dizer que vocês tornaram o caminho mais leve, mas com certeza o tornaram muito mais divertido! “Only lab partner has no end!”

À Amanda Teski, pela imensurável ajuda e apoio nos últimos meses. Muito obrigada pelo ombro amigo e por estar sempre disponível para ouvir. Parte da conclusão deste trabalho não seria possível sem você.

À Prof^a. Elisabeth Mansur, pelo amadurecimento ao longo destes dois anos. Obrigada por todos os ensinamentos, pelos puxões de orelha, pela paciência e por me tornar uma profissional melhor a cada dia, extraíndo sempre o melhor de mim. Ainda tenho muito que aprender (inclusive as regras para a utilização de crase), mas ter sido sua aluna com certeza foi uma parte de extrema importância para a minha formação.

À Prof^a. Jaqueline Gusmão, por todo o apoio e confiança durante todos esses cinco anos. Muito obrigada por embarcar comigo nessa etapa “nova” para nós duas, por acreditar em mim quando nem eu mesma mais acreditava, por me impulsionar e me fazer evoluir a cada dia mais. Considero-me muito sortuda de ter encontrado uma pessoa tão sensacional quanto você.

À Renatinha, por toda a imensurável ajuda. Você é uma das pessoas mais maravilhosas que eu já conheci. Muito obrigada pelo apoio em todos os momentos difíceis. Você é a alma do LABMIT!

À Georgia, por sempre estar disponível para ajudar e trocar ideias.

À equipe do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, LABPLAN, LABMIT e LMMP, entre alunos, professores e técnicos, e em especial para Bianka, por me receberem de braços abertos e por estarem de prontidão para ajudar.

À Karina Morelli, pela ajuda com os protocolos de recuperação de fragmentos.

Ao Rafael Perigeorge, pela imensa ajuda com os *motifs* de LFY.

À UERJ, por ser a minha segunda casa, não poderia ter escolhido melhor!

À CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

“O conhecimento liberta”

**“Quando as coisas parecerem mais
sombrias, que o mostre a luz.”**

RESUMO

ALENCAR, AS. **Alterações epigenéticas na morfogênese *in vitro*: estudo comparativo de padrões de metilação de DNA durante a organogênese e a embriogênese somática em *Solanum melongena* L. (berinjela).** 2019. 93f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Embora diversos protocolos para a indução de organogênese e embriogênese somática *in vitro* tenham sido estabelecidos para a berinjela, os mecanismos moleculares que controlam esses processos são pouco compreendidos. Neste trabalho, a técnica MSAP (*Methylation Sensitive Amplified Polymorphism*) foi aplicada em calos organogênicos e embriogênicos em diferentes estágios de desenvolvimento, a fim de identificar possíveis diferenças epigenéticas entre as duas vias de regeneração. O sistema de cultivo *in vitro* utilizado caracteriza-se por apresentar o desenvolvimento simultâneo de ambos os tipos de calos em diferentes regiões de explantes cotiledonares em resposta ao mesmo regulador de crescimento. Sementes de berinjela cv. Florida Market foram descontaminadas com hipoclorito de sódio e inoculadas em meio MS $\frac{1}{2}$ (concentração de sais pela metade). Após 21 dias, segmentos cotiledonares foram excisados e inoculados em meio sólido MS + BAP 5 mg/L. O DNA foi extraído do explante original e de calos formados após 7, 10 e 14 dias de cultura. Para a análise MSAP, o DNA foi digerido com *EcoR* I, *Msp* I e *Hpa* II, seguido pela ligação de adaptadores, pré-amplificação e amplificação seletiva com 19 combinações de *primers*. A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida desnaturante a 6% e corados com nitrato de prata. Entre os 19 *primers* testados, 15 tiveram um padrão de banda analisável, com um total de 715 bandas. Considerando todos os *primers*, a metilação total correspondeu a 43,9% dos eventos epigenéticos, seguida de demetilação (26,96%), metilação externa (20,63%) e metilação interna (8,9%). Os dois tipos de calos apresentaram diferentes dinâmicas de taxas de metilação completa ao longo do tempo de cultura. Mudanças nos padrões de bandas ao longo do período de cultivo (0, 7, 10 e 14 dias) e polimorfismos entre os calos organogênicos e embriogênicos foram observadas em 11 *primers*, e um total de 34 potenciais marcadores epigenéticos associados a cada via de regeneração foram visualizados. A combinação de *primers* *EcoR* I + CAG x *Msp* I - *Hpa* II + GTCA apresentou 188 fragmentos amplificados, dos quais 22 polimórficos, sendo considerado o melhor desempenho entre os *primers* testados. A reconstrução da sequência genômica compreendida pelo sítio de corte 5'-CCGG-3' e pelo *primer* seletivo *Msp* I-*Hpa* II + GTCA forma o *motif* 5'-CGGTCA-3'. Resultados de busca em bancos de dados apontaram que este *motif* corresponde à parte da sequência de reconhecimento do domínio de ligação ao DNA da proteína LFY (LEAFY) em *Arabidopsis thaliana*, que está envolvida com a diferenciação e identidade de meristemas florais, atuando como fator de transcrição. Deste modo conclui-se que a técnica de MSAP pode ser utilizada para a detecção de padrões de metilação específicos em calos organogênicos e embriogênicos de berinjela. O MSAP também pode ser aplicado de modo direcionado por meio da construção de *primers* seletivos com *motifs* de interesse, possibilitando a inferência da atividade de genes presentes no fragmento compreendido pelo *primer*.

Palavras-chave: Calogênese. Indução simultânea. BAP. MSAP. LFY.

ABSTRACT

ALENCAR, AS. **Epigenetic changes in *in vitro* morphogenesis: a comparative study of DNA methylation patterns during organogenesis and somatic embryogenesis in *Solanum melongena* L. (eggplant).** 2019. 93f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Although several protocols for *in vitro* organogenesis induction and *in vitro* somatic embryogenesis have been established for eggplant, the molecular mechanisms that control these processes are poorly understood. In this work, the MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) technique was applied to organogenic and embryogenic calli at different developmental stages in order to identify possible epigenetic differences between the two regeneration pathways. The *in vitro* culture system used displays simultaneous development of both callus types in different regions of cotyledon explants in response to the same growth regulator. Eggplant seeds cv. Florida Market were washed with sodium hypochlorite and germinated in MS $\frac{1}{2}$ medium (half salt concentration). After 21 days, cotyledon segments were excised and inoculated in MS + BAP 5 mg/L solidified medium. DNA was extracted from the original explant and from calli formed after 7, 10 and 14 days of culture. For MSAP analysis, the DNA was digested with *EcoR* I, *Msp* I and *Hpa* II, followed by adapters ligation, preamplification and selective amplification with 19 primer combinations. Electrophoresis was performed on 6% denaturing polyacrylamide gels and stained with silver. Among the 19 primers tested, 15 had an analyzable band pattern, with a total of 715 bands. Considering the entire primer set, total methylation corresponded to 43.9% of epigenetic events, followed by demethylation (26.96%), external methylation (20.63%) and internal methylation (8.9%). The two types of calli showed different of complete methylation dynamics along the culture period. Changes in band patterns along the culture period (0, 7, 10 and 14 days) and polymorphisms between organogenic and embryogenic calli were observed in 11 primers. A total of 34 potential epigenetic markers associated with each regeneration pathway were visualized. The combination of *EcoR* I + CAG x *Msp* I - *Hpa* II + GTCA primers showed 188 amplified fragments, of which 22 were polymorphic, being considered the best performance among the tested primers. The reconstruction of the genomic sequence comprehended of the 5'-CCGG-3' cut site and the selective *Msp* I-*Hpa* II + GTCA primer forms the 5'-CGGTCA-3' motif. Database search results indicated that this motif corresponds to the part of the recognition sequence of the LFY (LEAFY) DNA binding domain in *Arabidopsis thaliana*, which is involved with the differentiation and identity of floral meristems, acting as a factor of transcription. Thus, it can be concluded that the MSAP technique can be used for the detection of specific methylation patterns in eggplant embryogenic and organogenic calli. MSAP can also be applied in a targeted manner by constructing selective primers with motifs of interest, allowing the inference of the activity of genes present in the primer fragment.

Key-words: Callogenesis. Simultaneous induction. BAP. MSAP. LFY.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modificações epigenéticas em histonas.....	25
Figura 2 -	Representação esquemática da produção e ação dos miRNAs...	27
Figura 3 -	Representação esquemática do efeito da metilação de DNA sobre a transcrição gênica.....	29
Figura 4 -	Esquema representativo do pareamento dos adaptadores <i>EcoR</i> I, <i>forward</i> (5'-3') e reverso (3'-5') ao sítio de corte da enzima.....	34
Figura 5 -	Esquema representativo do pareamento do <i>primer EcoR</i> I + C pareado com a sequência reversa do seu adaptador específico.....	35
Figura 6 -	Obtenção de explantes cotiledonares de <i>Solanum melongena</i> cv. Florida Market.....	44
Figura 7 -	Indução de calogênese a partir de segmentos cotiledonares de <i>Solanum melongena</i> cultivados em meio MS1/2 ou MS suplementado com BAP a 5 mg/L, por diferentes períodos.....	54
Figura 8 -	Gel de poliacrilamida desnaturante 6% corado com nitrato de prata com fragmentos de DNA de cotilédones, calos organogênicos e embriogênicos de <i>Solanum melongena</i> nos tempos de 0, 7, 10 e 14 dias de cultura amplificados pelo conjunto de primers CAG x GTCA.....	56
Figura 9 -	Fragmentos de DNA de <i>Solanum melongena</i> cv. Florida Market reamplificados a partir de bandas em gel de poliacrilamida 6% desnaturante.....	67
Figura 10-	Reconstrução do <i>motif</i> formado pelo sítio de corte 5'-CCGG-3' e o primer <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + GTCA.....	68

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1-	Genes envolvidos no processo organogênico.....	21
Quadro 2-	Genes envolvidos no processo embriogênico.....	22
Quadro 3-	Sítio de corte das enzimas <i>EcoR</i> I, <i>Hpa</i> II e <i>Msp</i> I em cada situação de citosina metilada.....	33
Quadro 4-	Padrões de bandas observados em gel de poliacrilamida para as digestões de <i>Msp</i> I e <i>Hpa</i> II.....	36
Quadro 5-	Sequências dos adaptadores utilizados para ligação aos fragmentos gerados na etapa de digestão.....	46
Quadro 6-	<i>Primers</i> utilizados nas etapas de pré-amplificação (configuração +1) e amplificação seletiva (configurações +3 e +4) da análise de MSAP de calos organogênicos e embriogênicos de <i>Solanum melongena</i>	47
Quadro 7-	Combinações de <i>primers</i> utilizadas na etapa da amplificação seletiva da análise de MSAP de calos organogênicos e embriogênicos de <i>Solanum melongena</i>	49
Tabela 1 -	Número de eventos de metilação de DNA observados em todos os conjuntos de <i>primers</i> testados para o explante inicial e em calos organogênicos e embriogênicos induzidos a partir de explantes cotiledonares de <i>Solanum melongena</i> cultivados em meio MS suplementado com BAP 5 mg/L.....	59
Tabela 2	Combinações de <i>primers</i> que apresentaram mudanças no padrão de metilação de DNA ao longo do tempo de cultura ou entre calos organogênicos e embriogênicos de <i>Solanum melongena</i> cv. Florida Market	61
Tabela 3-	Lista de marcadores epigenéticos selecionados como potencialmente envolvidos com a ativação e desenvolvimento da via organogênica em explantes cotiledonares de <i>Solanum melongena</i> cultivados em meio MS + BAP 5 mg/L.....	64

Tabela 4 - Marcador epigenético selecionado como potencialmente envolvido com a ativação e desenvolvimento da via embriogênica em explantes cotiledonares de <i>Solanum melongena</i> cultivados em meio MS + BAP 5 mg/L.....	65
Tabela 5 - Lista de marcadores epigenéticos que apresentavam padrão diferencial entre os tecidos organogênico e embriogênico em explantes cotiledonares de <i>Solanum melongena</i> cultivados em meio MS + BAP 5 mg/L.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Taxas totais de eventos de metilação de DNA de calos embriogênicos e organogênicos de *Solanum melongena* cv. Florida Market cultivados em meio MS suplementado com BAP 5 mg/L, considerando-se todos os *primers* e tempos de cultura 57
- Gráfico 2- Taxas de eventos de metilação de DNA observados em calos organogênicos e embriogênicos de *Solanum melongena* cv. Florida Market cultivados em meio MS suplementado com BAP 5 mg/L nos períodos de 0, 7, 10 e 14 dias, considerando-se todos os *primers*..... 58
- Gráfico 3- Número de eventos de mudança de padrão de metilação entre calos organogênicos e embriogênicos ao longo do tempo de cultura para cada conjunto de *primers* testados..... 62
- Gráfico 4- Padrão de metilação de DNA observado em calos organogênicos e embriogênicos para o conjunto de *primers* *EcoR* I + CAG x *Msp* I - *Hpa* II + GTCA ao longo do tempo de cultura..... 63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AIA	Ácido 3-indoleacético
ANA	Ácido α -naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
BS-Seq	Sequenciamento por bissulfito
CLAE	Cromatografia líquida de Alta Eficiência
DNMTs	DNA-metiltransferases
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
MSAP	<i>Methylation Sensitive Amplified Polymorphism</i>
PAs	Poliaminas
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês " <i>Polymerase chain reaction</i> ")
SD8339	Adenina 6-benzil-9-tetrahidropirano
TET	<i>Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase</i>
NGS	Sequenciamento de nova geração (do inglês " <i>New generation sequencing</i> ")
TFs	Fatores de transcrição (do inglês " <i>Transcription factors</i> ")

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	18
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1	Morfogênese <i>in vitro</i>.....	18
2	ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS.....	25
2.1	Variações no nível de metilação do DNA durante a regeneração de plantas <i>in vitro</i>.....	29
3	DETECÇÃO DO STATUS EPIGENÉTICO.....	32
4	A BERINJELA COMO MODELO PARA A MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i>	38
5	OBJETIVOS.....	42
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
6.1	Material vegetal e condições de cultura.....	43
6.2	Germinação <i>in vitro</i>	43
6.3	Indução de calogênese	43
6.4	Extração de DNA.....	44
6.5	Técnica de MSAP.....	45
6.5.1	<u>Digestão com enzimas de restrição.....</u>	45
6.5.2	<u>Preparação dos adaptadores.....</u>	46
6.5.3	<u>Ligação dos adaptadores.....</u>	47
6.5.4	<u>Preparação dos <i>primers</i>.....</u>	47
6.5.5	<u>Amplificação por PCR.....</u>	48
6.5.5.1	Pré-amplificação.....	48
6.5.5.2	Amplificação seletiva.....	49
6.6	Individualização de fragmentos e reamplificação de bandas.....	52
6.7	Reconstrução de sequência genômica correspondente a região de corte de seleção +3 do <i>primer Msp I - Hpa II + GTCA</i> e busca em banco de dados.....	52
7	RESULTADOS.....	54
7.1	Material vegetal e cultura <i>in vitro</i>.....	54
7.2	Análise de fragmentos gerados na amplificação seletiva.....	55
7.3	Individualização de fragmentos e reamplificação.....	67
8	DISCUSSÃO.....	69
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
	PERSPECTIVAS.....	77

REFERÊNCIAS.....

INTRODUÇÃO

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Morfogênese *in vitro*

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta importante para a biotecnologia vegetal, consistindo na indução do desenvolvimento de células e tecidos em meios artificiais assépticos, a partir de pequenos segmentos de tecido vegetal, denominados explantes (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Esta metodologia possui diversas aplicações, entre as quais destacam-se a micropropagação (multiplicação de plantas a partir de explantes derivados de uma planta matriz), a conservação *in vitro*, o melhoramento genético, a produção de metabólitos secundários e a pesquisa em diversas áreas, tais como bioquímica, fisiologia e genética.

A morfogênese *in vitro* baseia-se na totipotência e na competência celular. A totipotência é a propriedade que possuem as células vegetais de sofrerem desdiferenciação e rediferenciação em resposta a determinados estímulos, podendo gerar novos indivíduos completos idênticos à planta-matriz. Em geral, a totipotência é inversamente proporcional ao grau de diferenciação do tecido. A competência refere-se à capacidade das células vegetais de gerar respostas específicas quando submetidas a determinado estímulo, dando origem a uma determinada linhagem celular (TORRES et al., 2000; GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008)

A morfogênese *in vitro* pode ocorrer por meio de três vias distintas: i) desenvolvimento de tecidos meristemáticos pré-existentes, ii) organogênese ou iii) embriogênese somática (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

O desenvolvimento de tecidos meristemáticos pré-existentes ocorre a partir de explantes constituídos por células não diferenciadas, como meristemas apicais (ápices de caule ou raiz) e gemas axilares (segmentos nodais). Essa via é recomendada para a propagação clonal, pois como os meristemas seguem sua via natural de desenvolvimento, a possibilidade de surgimento de variações genéticas é muito reduzida (ANDRADE, 2002).

A organogênese *in vitro* é o processo de formação de órgãos ou gemas adventícias a partir de tecidos diferenciados, que sofrem processos de desdiferenciação e rediferenciação. Na desdiferenciação, as células retornam a um estágio similar ao meristemático, desenvolvendo novas competências. A rediferenciação consiste em uma reprogramação gênica que possibilita a formação de novos órgãos e tecidos. Este processo pode ocorrer de forma indireta ou direta. A via indireta caracteriza-se por apresentar um estágio intermediário de calo, que é uma massa celular de crescimento desorganizado a partir da qual podem ser formadas novas estruturas. No processo direto, a fase de calo não ocorre, sendo observada a neoformação de órgãos diretamente a partir do explante.

Na embriogênese somática, ocorre a formação de embriões a partir de células somáticas, ao contrário dos embriões zigóticos, que se originam da fusão de gametas. O desenvolvimento dos embriões somáticos é análogo ao de embriões zigóticos, passando pelos estágios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Esses embriões não possuem conexão vascular com o tecido original e apresentam uma estrutura bipolar, com ápices caulinar e radicular. Assim como a via organogênica, a embriogênese somática pode ocorrer de forma direta ou indireta (GUERRA; NODARI, 2006; GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; ZIMMERMANN, 2014).

A morfogênese *in vitro* é influenciada por diversos parâmetros, tais como luminosidade, temperatura, composição do meio de cultura, reguladores de crescimento, genótipo, idade e estágio de diferenciação do explante (ANDRADE, 2002; DELPORTE et al., 2014). A luminosidade é responsável pelo fototropismo das plantas e tem influência direta sobre o seu metabolismo. Deste modo, a intensidade luminosa, o comprimento de onda e o fotoperíodo sobre a cultura irão influenciar a resposta morfogênica obtida (LAZZARINI et al., 2017). A temperatura atua diretamente sobre o crescimento vegetal, sendo um dos fatores mais importantes para o sucesso da cultura *in vitro*. Para um crescimento adequado, é necessário que a temperatura de cultivo esteja de acordo com as necessidades fisiológicas da planta (CID; TEIXEIRA, 2014). O meio de cultura é constituído por macro e micronutrientes, além de vitaminas, água e uma fonte de carbono (geralmente sacarose). O balanço dos compostos presentes pode ser ajustado de acordo com as necessidades da espécie cultivada e de acordo com o resultado desejado. Os reguladores de crescimento são compostos sintéticos análogos aos hormônios

vegetais endógenos, os quais podem ser adicionados ao meio de cultura, gerando respostas fisiológicas específicas nas células de acordo com cada tipo de regulador (auxinas, citocininas ou giberelinas, por exemplo), podendo influenciar seu padrão de crescimento. A idade e o estágio de diferenciação do explante influenciarão a capacidade de desdiferenciação e rediferenciação do tecido. Quanto mais maduro ou diferenciado é um tecido, devido à redução do potencial de totipotência, mais difícil é a obtenção de novas competências (CID; TEIXEIRA, 2014).

As taxas de hormônios endógenos são determinadas pelo genótipo. O balanço entre as concentrações dos reguladores de crescimento adicionados e as taxas endógenas de hormônios presentes em cada explante determinará qual via será ativada (PACHECO et al., 2007; ROSA; BELLO; DORNELAS, 2015). A organogênese direta e indireta foi observada em explantes internodais de *Passiflora suberosa* em meios de cultura suplementados com BAP (6-benzilaminopurina) ou em combinação com ANA (ácido α -naftalenoacético) (GARCIA et al., 2011). A utilização de citocininas no gênero *Passiflora* para a formação de brotos já é bem estabelecida, porém a ativação do processo dependerá da concentração de auxinas endógenas (DORNELAS; VIEIRA, 1994; LOMBARDI et al., 2007).

Apesar do grande número de trabalhos em cultura de tecidos vegetais, os mecanismos que estão envolvidos com as vias organogênica e embriogênica ainda permanecem pouco esclarecidos. Dessa forma, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de investigar processos morfogênicos *in vitro* em nível molecular, incluindo análises da expressão gênica, proteômica e epigenética.

Estudos de controle da expressão gênica durante a morfogênese *in vitro* já foram realizados para as vias organogênica e embriogênica. Os genes já identificados na literatura estão especificados nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 - Genes envolvidos no processo organogênico

Gene	Função	Referência
<i>SRD1</i>	Rediferenciação em brotos.	YASUTANI et al., 1994 OZAWA et al., 1998
<i>SRD2</i>	Rediferenciação em brotos.	YASUTANI et al., 1994 OZAWA et al., 1998
<i>SRD3</i>	Rediferenciação em brotos.	YASUTANI et al., 1994 OZAWA et al., 1998
<i>ESR1</i>	Codifica fator de transcrição; estimula a transição de células do estado vegetativo para organogênico.	BANNO et al., 2001
<i>CRE1</i>	Receptor de citocinina.	INOUE et al., 2001
<i>CKI1</i>	Estimula o desenvolvimento de brotos; receptor para citocininas.	KAKIMOTO, 1996; HWANG; SHEEN, 2001
<i>CLV</i>	Promove a transição de células meristemáticas em organogênicas.	FLETCHER, 2002
<i>SHO</i>	Controla a taxa de transição celular dos centros meristemáticos para a zona periférica; envolvido com a organização do primórdio foliar.	FLETCHER, 2002
<i>MGO</i>	Promove a transição das células da zona periférica do centro meristemático para primórdios de órgãos.	FLETCHER, 2002
<i>WOX11</i>	Envolvido com as etapas iniciais do processo de rediferenciação durante a organogênese em raiz.	LIU et al., 2014
<i>WOX12</i>	Envolvido com as etapas iniciais do processo de rediferenciação durante a organogênese em raiz.	LIU et al., 2014
<i>YUC</i>	Organogênese de raiz induzida por auxina.	CHEN et al., 2016
<i>WOS 5</i>	Promove o início do desenvolvimento do primórdio radicular durante a organogênese.	HU; XU, 2016
<i>WOX 7</i>	Promove o início do desenvolvimento do primórdio radicular durante a organogênese.	HU; XU, 2016

Quadro 2 - Genes envolvidos no processo embriogênico.

Gene	Função	Referência
<i>TIR1</i>	Formação de células embriogênicas mediadas por auxina.	RUEGGER et al., 1998
<i>AtGRP5</i>	Ativo durante as primeiras modificações anatômicas que levam ao desenvolvimento da embriogênese somática.	MAGIOLI et al., 2001b
<i>LEC1</i>	Codifica uma subunidade do fator de transcrição CCAATbox-binding; estimula a embriogênese somática em conjunto com cofatores.	LOTAN et al., 1998
<i>LEC2</i>	Codifica uma subunidade do fator de transcrição domínioB3, que induz o desenvolvimento de embriões.	STONE et al., 2001
<i>WUS</i>	Manutenção de identidade da célula embriogênica.	ZUO et al., 2002b
<i>PGA6</i>	Regulador positivo para embriogênese e organogênese.	ZUO et al., 2002b
<i>SERK1</i>	Atua na transição do tecido vegetativo para o embriogênico.	SCHMIDT et al., 1997
<i>SHR</i>	Promove a divisão celular assimétrica durante a embriogênese, influenciando na rediferenciação.	VON ARNOLD et al., 2002
<i>FUS3</i>	Maturação do embrião.	VON ARNOLD et al., 2002
<i>ABI3</i>	Maturação do embrião.	VON ARNOLD et al., 2002
<i>BBM</i>	Conversão do estágio vegetativo para crescimento embriogênico.	BOUTILIER et al., 2002
<i>AGL15</i>	Direciona processos semente-específicos no embrião em desenvolvimento.	HECK et al., 1995
<i>GLB2</i>	Formação de células embriogênicas mediadas por auxina.	ELHITI et al., 2013
<i>PCR2</i>	Mantém a estabilidade de células já totalmente diferenciadas, evitando desdiferenciação indesejada.	IKEUCHI et al., 2015
<i>GhAGL15s</i>	Promove a formação de calos embriogênicos.	YANG et al., 2014
<i>ARF6</i>	Participa da ativação de genes induzidos por auxina na embriogênese somática.	SU et al., 2016
<i>ARF8</i>	Participa da ativação de genes induzidos por auxina na embriogênese somática.	SU et al., 2016

Os genes ativos em determinado tecido ou momento celular podem modular a expressão de proteínas. A proteômica é o estudo do conjunto de todas as proteínas expressas em um tecido, célula ou sistema biológico em dado momento do ciclo celular. A proteômica estrutural consiste na avaliação de proteínas expressas em resposta a condições distintas, enquanto que a proteômica funcional visa caracterizar suas atividades biológicas.

A separação de proteínas pode ser feita por diferentes metodologias, como espectrometria de massas, cromatografia líquida ou eletroforese bidimensional (TEIXEIRA; ARAUJO, 2006). Os mapas proteicos podem ser utilizados na comparação de diferentes estágios de desenvolvimento de tecidos vegetais durante a morfogênese *in vitro*, sendo possível a inferência da atividade de genes responsáveis pela produção de proteínas específicas (SALVATTO; CARVALHO, 2010). Além disso, os perfis proteicos são utilizados do mesmo modo na comparação de indivíduos com características distintas, identificando-se suas moléculas contrastantes e realizando o estudo das suas funcionalidades (TEIXEIRA; ARAUJO, 2006). A proteômica também pode ser aplicada como parte do processo de melhoramento genético e transgenia, por meio da manipulação de proteínas responsivas a efeitos bióticos e abióticos, e para a avaliação das modificações da expressão de proteínas causada por mutações (RUEBELT et al., 2006; SANTONI et al., 1994).

A epigenética é a área de estudo que visa à compreensão de processos associados à regulação da expressão gênica, sem que ocorram alterações na estrutura primária do DNA, ao contrário de eventos como a substituição de bases ou deleções. Apesar de não estarem associados diretamente à sequência de bases do genoma, padrões epigenéticos podem ser herdáveis através da divisão mitótica, ao contrário de alterações na expressão gênica propriamente dita, ou mutáveis ao longo do ciclo vital, podendo ser modificados em resposta a fatores endógenos e exógenos (FANTAPPIÉ, 2013). Portanto, modificações epigenéticas permitem o desenvolvimento de características distintas em células com o mesmo material genético (US-CAMAS et al., 2014).

A ocorrência de alterações epigenéticas é bastante comum, tanto em plantas *in vivo* quanto *in vitro*. O processo epigenético é um dos pilares da plasticidade fenotípica das plantas em resposta a fatores bióticos e abióticos (BRAUTIGAM et al., 2013), característica que é de vital importância para um ser vivo sésstil. Dessa forma,

o ambiente tem forte influência sobre as modificações epigenéticas que ocorrerão ao longo do desenvolvimento de um organismo vegetal.

Plantas cultivadas *in vitro* precisam lidar com o estresse inerente à própria técnica, tais como a composição do meio de cultura basal, a adição de reguladores de crescimento e alta umidade (VANSTRAELEN; BENKOVÁ, 2012). Deste modo, durante o processo de micropropagação podem ocorrer aberrações fenotípicas e genômicas, também conhecidas como variações somaclonais, que podem ser causadas por mutações ou alterações epigenéticas (JULLIEN; BERGER, 2010).

As alterações epigenéticas também possuem papel fundamental ao longo do processo morfogênico de plantas *in vitro*. Para a formação de novas células, tecidos e a ativação de vias de regeneração, é necessária uma ação orquestrada entre os mecanismos genético e epigenético (MIGUEL; MARUM, 2011; SMULDERS; DE KLERK, 2011). Em *Agave fourcroydes* e *A. angustifolia* foi observado que a metilação dos marcadores H3K4me3 e H3K9me2 regula a expressão do gene KNOX1, que está relacionado diretamente com o desenvolvimento *in vitro* (DE-LA-PENA et al., 2012). O mesmo marcador também regula o gene WOX4, que tem sua expressão diminuída durante a embriogênese somática (NIC-CAN et al., 2013).

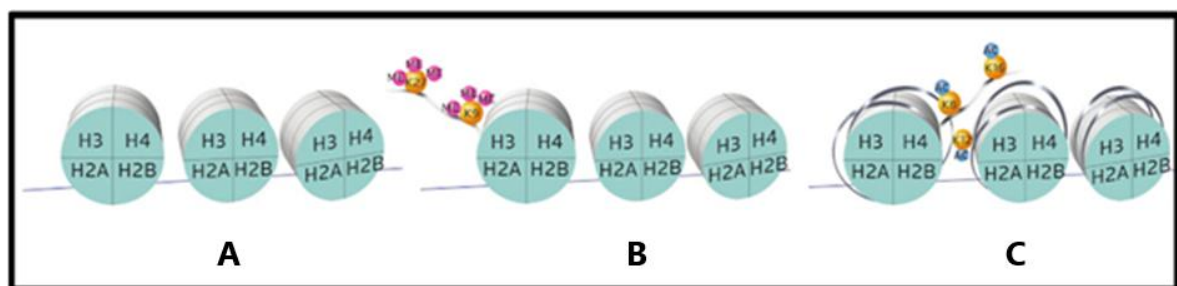
As alterações epigenéticas também são capazes de criar marcas epigenéticas que fornecem memória transitória ou herdável para a planta. Esse fenômeno é conhecido como memória epigenética, e influencia as respostas das células a condições ambientais futuras e durante processos morfogênicos (ROUDIER; TEIXEIRA; COLOT, 2009; SMULDERS; DE KLERK, 2011). Um exemplo de memória epigenética é o *stress imprint*. Plantas sobreviventes a condições de estresse tendem a responder mais rapidamente quando submetidas a uma segunda exposição. Esse comportamento “otimizado” muitas vezes é observado nas linhagens descendentes sem que elas tenham sido apresentadas ao fator de estresse (KINOSHITA; SEKI, 2014). Evidências apontam que processos epigenéticos também estabilizam parcialmente a diferenciação de células nos momentos iniciais do processo no qual o “destino” celular ainda está sendo definido, evitando com que a célula regrida erroneamente para um estágio de desenvolvimento menos diferenciado (BIRNBAUM; ROUDIER, 2017). Devido à sua importância na morfogênese *in vitro*, alterações epigenéticas podem ser consideradas como biomarcadores desse processo (CAUSEVIC et al., 2006).

2 ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

As alterações epigenéticas podem ocorrer através de modificações de histonas, a ação de microRNAs ou modificações nos padrões de metilação do DNA, sendo esta última a mais estudada em eucariotos (MIGUEL; MARUM, 2011). As modificações em histonas são alterações conformacionais no enovelamento da fita de DNA no nucleossomo, causadas pela adição ou perda de grupos metila, acetil e ubiquitina, entre outros, nos resíduos de aminoácidos ligados às histonas (Figura 1). A metilação de histonas costuma aumentar a tensão da fita de DNA sobre o nucleossomo, reduzindo o processo de transcrição da região. Em contrapartida, a acetilação de histonas está geralmente ligada ao aumento da transcrição, por diminuir a tensão da fita de DNA em relação ao nucleossomo, facilitando o acesso da maquinaria de transcrição aos genes.

Cada grupamento químico ligado a histona induzirá maior ou menor enovelamento da fita de DNA no nucleossomo, porém esse comportamento variará de acordo com o aminoácido e a histona à qual o grupamento está associado. Em plantas, a metilação de histonas H3 no resíduo de lisina 4 causa aumento da transcrição, enquanto que a ligação de grupos metila ao resíduo de lisina 9 resulta na repressão da transcrição (DU et al., 2015).

Figura 1 - Modificações epigenéticas em histonas

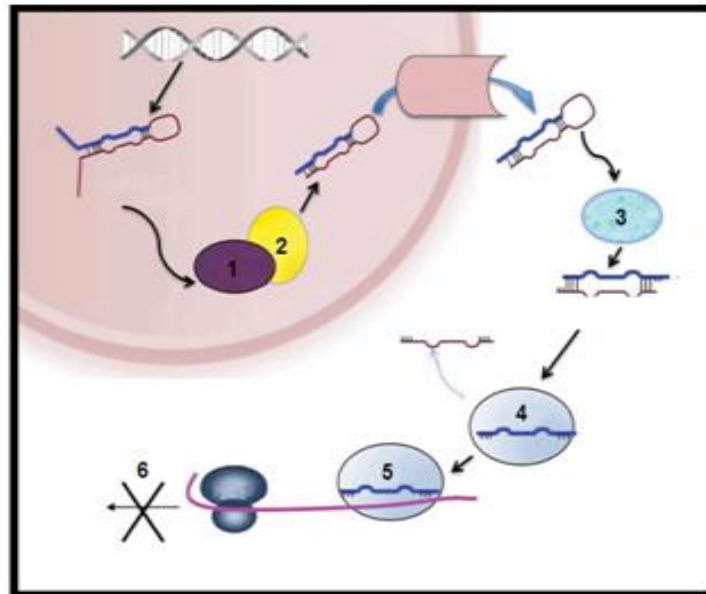


Legenda: Representação esquemática de histonas (A) com modificações epigenéticas que alteram a conformação da cromatina, podendo provocar o empacotamento (B) ou desempacotamento (C) da fita de DNA do nucleossomo, causando repressão ou aumento do processo de transcrição, pela adição de grupos metila (esfera rosa) ou grupos Acil (esferas azuis), respectivamente.

Fonte: adaptado de Trevilatto; Werneck, 2014.

MicroRNAs são pequenas sequências de RNAs não-codificantes capazes de atuar diretamente sobre mRNAs específicos, funcionando como moléculas guia para o silenciamento de genes a nível transcricional e pós-transcricional (HA; KIM, 2014). Além da ação direta sobre o mRNA, impedindo a transcrição de proteínas específicas, os microRNAs também podem agir como sinalizadores que direcionam modificações epigenéticas no genoma de suas células alvo (US-CAMAS et al., 2014). Apesar do grande progresso no campo da epigenética, em comparação com os outros tipos de modificações, existe pouca informação disponível sobre os microRNAs. Em plantas, os microRNAs estão envolvidos com a geração de respostas ao estresse e defesa, possuindo também papel importante na morfogênese *in vitro* (SUNKAR; LI; JAGADEESWARAN, 2012; CHEN; LI, 2013). Acredita-se que este mecanismo, além de ser um dos principais moduladores de respostas às condições bióticas e abióticas da cultura *in vitro* (luz, disponibilidade de nutrientes, concentração de reguladores de crescimento) e sinalização hormonal (LIANG; WHITE; WATERHOUSE, 2012), também seja responsável pela comunicação celular no processo de diferenciação (US-CAMAS et al., 2014). Um esquema simplificado da biossíntese e ação dos microRNAs está apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática da produção e ação dos miRNAs



Legenda: O núcleo produz um dos precursores do microRNA, que passará por complexos de endorribonucleases (círculos 1 e 2) para a retirada de *hairpins*. Após ser transportado para fora do núcleo, a fita dupla de RNA será separada por uma RNase (círculo 3), mantendo-se apenas uma fita guia, que formará o microRNA (4). Através deste mecanismo, o microRNA pode interagir com o mRNA produzido (5), inibindo a tradução (6).

Fonte: Adaptado de Gayosso-Gómez et al., 2013.

A metilação de DNA modula os processos de ativação/silenciamento de genes através da presença ou ausência de grupos metila ligados na posição 5' do anel pirimidínico da citosina (DU et al., 2015). A presença abundante de grupos metila dificulta o acesso da maquinaria de transcrição e aumenta o tensionamento da fita de DNA, impedindo a transcrição e silenciando a região gênica em questão. Sob o mesmo raciocínio, regiões hipometiladas, por serem mais acessíveis e menos tensionadas, resultam em um aumento na expressão dos genes ali presentes (Figura 3). Deste modo, o nível de metilação observado em determinada região funciona como indicador indireto do seu nível de expressão (IRVINE; LIN; HSIEH, 2002; LUCZAK; JAGODZIŃSKI, 2006; LIDDLE; JIRTLE, 2006).

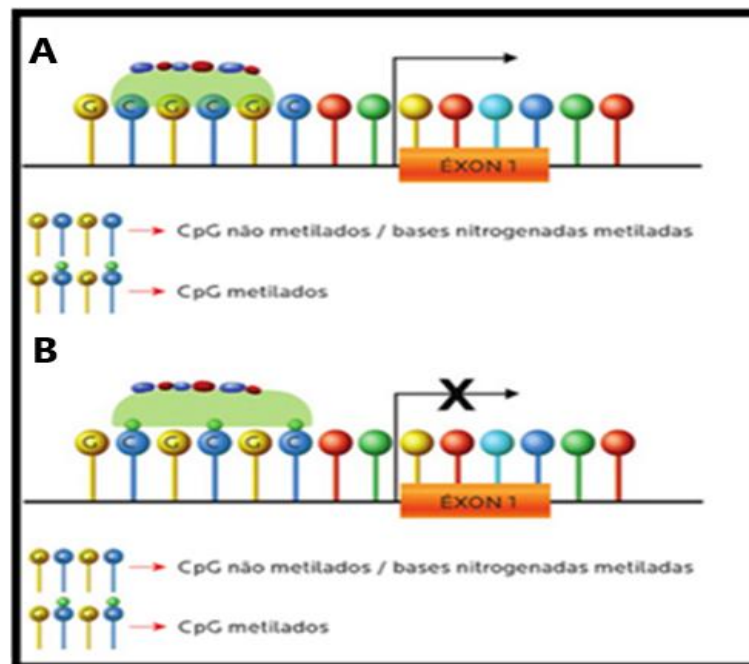
A metilação do DNA é resultante de uma reação coordenada de adição catalisada por enzimas da família DNA-metiltransferases (DNMTs), DNA glicosilases e fatores de remodelamento da cromatina, formando as 5-metilcitidinas, ou citosinas metiladas (FAN et al., 2009; DU et al., 2015). As DNMTs possuem atividades de

manutenção e de metilação *de novo*. A atividade de manutenção reconhece sítios hemimetilados (metilação presente em somente uma das fitas do DNA) e copia o padrão pré-existente para a nova fita. A metilação *de novo* consiste na adição do grupo metila em um sítio não metilado previamente, estabelecendo novos padrões.

Os padrões de metilação não são fruto somente da atividade das DNMTs, mas também dos eventos de demetilação. Estes eventos acontecem quando uma citosina previamente metilada perde o grupo metila, seja de modo passivo ou ativo. A demetilação passiva ocorre quando a citosina metilada é substituída por uma citosina não metilada durante o processo de replicação do DNA. Quando o grupo metila é removido ativamente pela enzima da família TET (*Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*) (WU; ZHANG, 2017), demetilases ou pela DNA glicosilase, que é uma enzima de reparo, o processo é chamado de demetilação ativa (BHUTANI; BURNS; BLAU, 2011; KOHLI; ZHANG, 2013; XUE et al., 2016).

A metilação de DNA é categorizada em CG, CHG ou CHH, de acordo com a sequência de citosinas, sendo H equivalente a uma das bases nitrogenadas A, C ou T (MIGUEL; MARUM, 2011; US-CAMAS et al., 2014). Em plantas, este evento possui especificidade para tecidos, organelas e pode ser influenciada pela idade do tecido, sendo capaz de influenciar a estabilidade do genoma, processos celulares e de desenvolvimento. Nestes organismos, os níveis de metilação de DNA podem apresentar grandes variações, flutuando de 6% a 30% (FINNEGAN; KOVAC, 2000; CHEN et al., 2004), o que os torna bons indicadores da proporção de genes expressos em determinado momento. Apesar de ser encontrada nas três categorias, é comum que os sítios CG encontrem-se metilados em maior frequência, seguidos dos sítios CHG e CHH (FENG et al., 2010a). Por exemplo, em *Arabidopsis thaliana*, as citosinas metiladas em grupos CG representam 22-24% do metiloma, seguidas pelas categorias CHG (7-8%) e CHH (2%) (FENG; JACOBSEN; REIK, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática do efeito da metilação de DNA sobre a transcrição gênica



Legenda: Na ausência de citosinas metiladas (A), observa-se que a maquinaria de transcrição, representada pelo semi-círculo verde-claro, é capaz de se aproximar das bases nitrogenadas e seguir a transcrição do fragmento Exon 1, ao contrário do observado em B, onde os grupos metila, representados pelos círculos verde-claro sob o sítio CGCG, dificultam o contato entre a maquinaria e a fita de DNA, impossibilitando a ocorrência de transcrição do Exon 1, que será silenciado.

Fonte: Adaptado de Trevilatto; Werneck, 2014.

2.1 Variações no nível de metilação do DNA durante a regeneração de plantas *in vitro*

As taxas de metilação de DNA variam de acordo com o momento celular analisado. Em estudos sobre a via embriogênica é comum a observação de eventos de demetilação logo nos estágios iniciais da formação do embrião, ocorrendo a seguir um aumento nos níveis de metilação (VIEJO et al., 2010). Essa sequência de eventos pode estar relacionada a uma intensa taxa de replicação do DNA durante o desenvolvimento de tecidos embriogênicos, entre outros fatores. Durante a divisão mitótica, a replicação de um fragmento totalmente metilado gera fitas hemimetiladas. Do mesmo modo, na replicação de fitas hemimetiladas, somente $\frac{1}{4}$ das fitas geradas permanece metilada, o que provoca redução na taxa de metilação total. A

reconstituição dos sítios metilados é feita posteriormente por meio da adição de grupamentos metila pelas enzimas de manutenção. Assim, conforme a taxa de mitose diminui e o processo de rediferenciação é concluído, há o aumento dos níveis de metilação (KREBS; KILPATRICK; GOLDSTEIN, 2014).

Durante o desenvolvimento de linhagens embriogênicas de *Agave fourcroydes*, foram observadas taxas menores de metilação, porém mais variáveis, enquanto linhagens não embriogênicas apresentaram padrão menos dinâmico, porém mais metilado (MONJA-MIO et al., 2018). Resultados semelhantes de diminuição da metilação durante a embriogênese somática foram encontrados em beterraba (MAURY et al., 2012), *Rosa hybrida* (XU; LI; KORBAN, 2004) e ginseng (CHAKRABARTY; YUK, PAEK, 2003). A hipometilação pode ser observada tanto durante a regeneração por embriogênese direta quanto indireta. Em comparação a plantas de *Secale cereale* provenientes de germinação, observou-se até o dobro de sítios não metilados em plantas obtidas por embriogênese somática (GONZALEZ et al., 2013). Taxas menores de hipometilação também já foram observadas para embriogênese direta e indireta em *Freesia hybrida* (1,1% e 1,3%, respectivamente) (GAO et al., 2010). A utilização de 5-azacitidina (substância demetilante) no meio de cultura provocou a perda da capacidade de formação de embriões a partir de linhagens originalmente embriogênicas, demonstrando que o balanço metilação/demetilação é fundamental para essa via (SANTOS; FEVEREIRO, 2002; GRZYBKOWSKA et al., 2018). Em contrapartida, embriões somáticos obtidos por meio de embriogênese indireta foram mantidos por dois meses em meio de cultura com 5-azacitidina, indicando que a embriogênese somática pode também ser induzida não somente pelo balanço metilação/demetilação, mas influenciada também pelas condições estressantes da cultura *in vitro* e o genótipo (LELJAK-LEVANIĆ et al., 2004).

Ao contrário da embriogênese somática, a rota organogênica não apresenta tendência de padrão de metilação definida. Por exemplo, linhagens de calos organogênicos de beterraba apresentaram taxas de metilação de 18,3%, enquanto que linhagens não-organogênicas possuíam taxas mais altas (22,6%), em um período de dez semanas de cultivo (CAUSEVIC et al., 2005). Para outra cultivar, encontraram-se taxas de metilação significativamente mais altas, 74,5% para a linhagem organogênica e 60,3% para a não-organogênica (MAURY et al., 2012). A hipermetilação em plantas obtidas por organogênese direta também foi descrita para

dendê, correspondendo a 50% de metilação total (ROMYANON et al., 2017). Baixos níveis de metilação em tecidos neoformados *in vitro* podem ser associados ao fenótipo jovem (VALLEDOR et al., 2007), porém níveis altos também são encontrados, demonstrando que outros fatores podem influenciar essas taxas (MONTEUUIS; DOULBEAU; VERDEIL, 2008), incluindo tempo de cultura, componentes do meio, genótipo e natureza do explante. Por exemplo, plantas de *Clivia miniata* obtidas de ápice caulinar, folhas e pétalas jovens apresentaram diferenças maiores de 10% entre suas taxas de metilação (WANG et al., 2012). De forma semelhante, plantas de *Jathropa curcas* desenvolvidas a partir de ápices caulinares e explantes foliares por organogênese direta apresentaram, respectivamente, hipermetilação e hipometilação de 25%, quando comparadas às taxas encontradas na planta doadora (RATHORE; JHA, 2016).

3 DETECÇÃO DO STATUS EPIGENÉTICO

A análise da metilação de DNA pode ser feita por meio de diferentes metodologias, tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sequenciamento por bissulfito (BS-Seq) e *Methylation Sensitive Amplified Polymorphism* (MSAP). A técnica de CLAE gera informações quantitativas, refletindo o panorama global de metilação do DNA, expresso em porcentagem de metilação do genoma, sendo muito utilizada em estudos de macroevolução. Apesar de ser uma informação de extrema utilidade, não fornece dados precisos sobre alterações em sítios específicos. A análise por BS-Seq consiste no tratamento do DNA com bissulfito de sódio, que converte citosinas não metiladas em uracilas. Para a identificação das bases convertidas, é feito o sequenciamento do genoma. Embora esta técnica forneça informações sítio-específicas confiáveis, possui um custo alto devido à necessidade de sequenciamento (ALONSO et al., 2015). Em comparação com metodologias que utilizam sequenciamento por bisulfito, a técnica de MSAP é vantajosa por ser confiável, de baixo custo e não requerer informações sobre o genoma do organismo (FULNEČEK; KOVAŘÍK, 2014).

A técnica de MSAP foi desenvolvida inicialmente para fungos (REYNA-LÓPEZ; SIMPSON; RUIZ-HERRERA, 1997) e, posteriormente, adaptada para plantas (XIONG et al., 1999). Tem como base a técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e detecta a metilação do DNA em sítios específicos, por meio da substituição da enzima de restrição de corte frequente, *Mse* I, por dois isoesquizômeros sensíveis à metilação. O DNA genômico é digerido utilizando-se uma enzima de restrição de corte raro (*EcoR* I, hexâmera, que reconhece o sítio de corte 5'-G↓AATTC-3') e duas de corte frequente (um dos isoesquizômeros de *Mse* I, *Hpa* II ou *Msp* I, tetrâmeras, que reconhecem a sequência 5'-CCGG-3'). As duas enzimas de corte frequente (*Hpa* II e *Msp* I) reconhecem a sequência 5'-CCGG-3', porém possuem sensibilidades diferentes para o reconhecimento de citosinas metiladas, em função da sua posição no sítio de clivagem (citosina interna ou externa). Apesar de ambas serem capazes de reconhecer sequências não metiladas, *Hpa* II não atua quando uma ou ambas as citosinas do sítio de corte estão metiladas nas duas fitas de DNA, reconhecendo somente a metilação da citosina externa em uma das fitas. Ao contrário de *Hpa* II, *Msp* I reconhece somente

a metilação da citosina interna em uma ou nas duas fitas (XIONG et al., 1999), como exemplificado no Quadro 3.

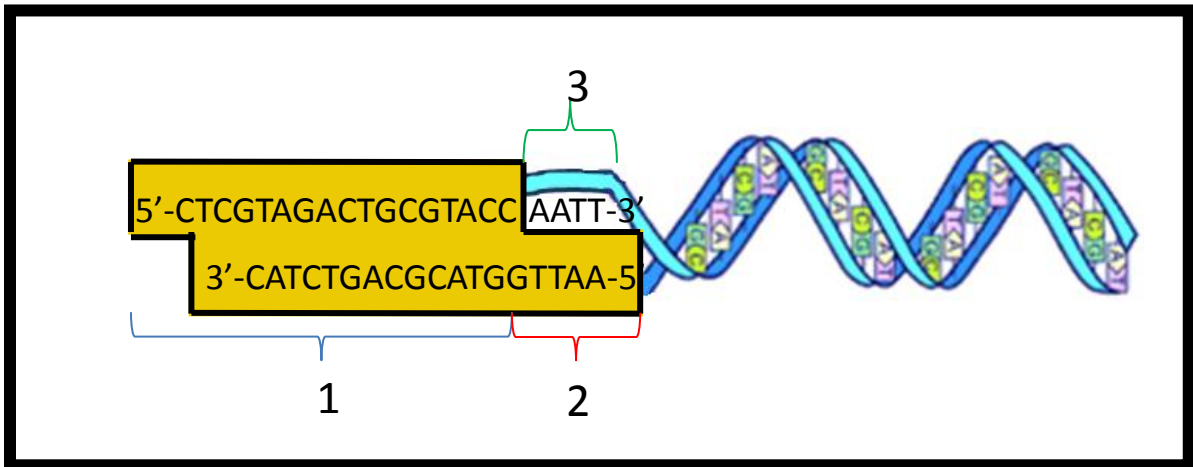
Quadro 3 - Sítio de corte das enzimas *EcoR* I, *Hpa* II e *Msp* I em cada situação de citosina metilada

Enzima	Padrão de corte (5'- 3' 3'- 5')						
	GAATTC CTTAAG	CCGG GGCC	CCGG GGCC	CCGG GGCC	CCGG GGCC	CCGG GGCC	CCGG GGCC
<i>EcoR</i> I	X	-	-	-	-	-	-
<i>Hpa</i> II	-	X	-	-	-	X	X
<i>Msp</i> I	-	X	X	X	X	-	-

Legenda: Citosina metilada: **C**; sítio de clivagem: X ; ausência de corte: -

Os fragmentos gerados durante a digestão são amplificados através de Reação em cadeia da polimerase (PCR) em duas etapas (pré-amplificação e amplificação seletiva), após a ligação de adaptadores às suas extremidades coesivas. Os adaptadores são oligonucleotídeos de fita dupla que possuem a função de se ligar à fita de DNA de modo complementar ao sítio de restrição da enzima utilizada, através de uma ponta coesiva. A etapa de ligação dos adaptadores é de extrema importância, pois por terem a sua sequência conhecida, atuam como região de pareamento para os *primers* utilizados nas etapas posteriores. Estes oligos possuem uma região composta pela sequência do adaptador propriamente dita (1), e uma região complementar ao sítio de restrição da enzima utilizada (2), como exemplificado na Figura 4. Desse modo, parte do adaptador liga-se ao sítio de restrição e parte permanece livre. Os adaptadores não permitem que os sítios de restrição sejam perfeitamente reconstituídos, devido à sua extremidade 5' livre, ou que ocorra a ligação entre adaptadores, visto que não são fosforilados.

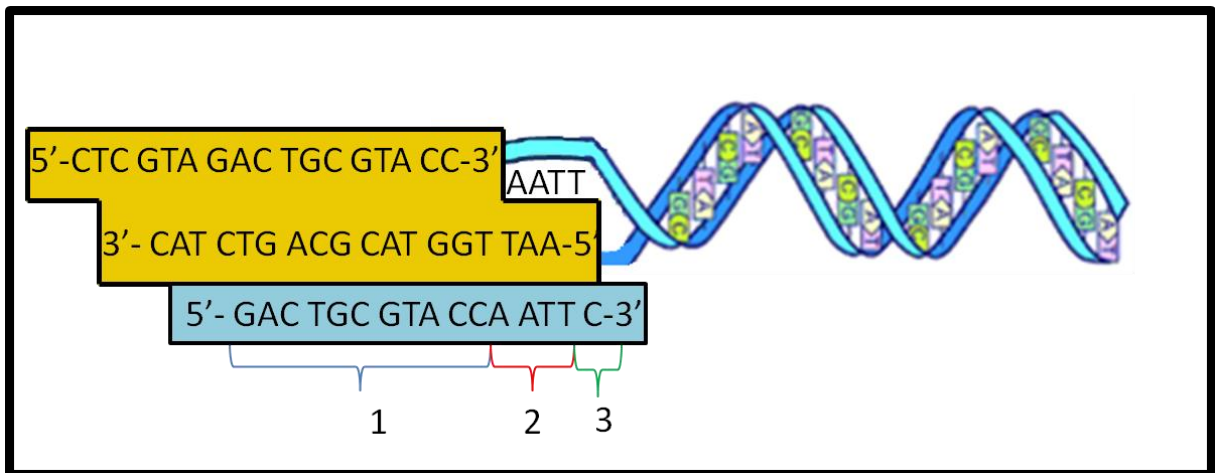
Figura 4 - Esquema representativo do pareamento dos adaptadores *EcoR* I, *foward* (5'-3') e reverso (3'-5') ao sítio de corte da enzima.



Legenda: 1: sequência do adaptador que permanece livre; 2: sequência 3'-TTAA-5' complementar ao sítio de corte; 3: Região clivada pela enzima *EcoR* I, onde houve perda da guanina, formando o sítio 5'-AATT-3'.

Os *primers* utilizados na etapa de pré-amplificação possuem uma configuração específica, sendo constituídos por extremidade 5' complementar à extremidade 3' do seu adaptador específico reverso (região 1) + região 3' complementar à extremidade 5' da sequência reversa do adaptador (região 2) + extremidade 3' que pode possuir de zero a quatro nucleotídeos de seleção (região 3) (Figura 5). Os nucleotídeos de seleção são bases extras adicionadas ao final da sequência do *primer*, com a função de selecionar e reduzir o número de fragmentos totais amplificados para otimizar a etapa seguinte da metodologia. A etapa de pré-amplificação utiliza *primers* com uma base seletiva.

Figura 5 - Esquema representativo do pareamento do *primer EcoR I + C* pareado com a sequência reversa do seu adaptador específico



Legenda: *Primer EcoR I + C*, representado pelo retângulo azul, pareado com a sequência reversa do seu adaptador específico, representado pela caixa amarela. 1: Sequência do *primer* complementar ao adaptador; 2: região complementar ao sítio de corte reconstituído pelo adaptador; 3: nucleotídeo de seleção C.

Na amplificação seletiva, são utilizados *primers* complementares à sequência reversa do produto de pré-amplificação, porém contendo de dois a quatro nucleotídeos de seleção. Dessa forma, o número total de fragmentos amplificados é reduzido, melhorando a visualização e identificação de marcadores MSAP. Tanto a pré-amplificação como a amplificação seletiva ocorrerão somente para aqueles fragmentos que possuam a base ou a sequência de bases complementares aos nucleotídeos de seleção utilizados.

O padrão de corte que é gerado pelo par de isoesquizômeros e amplificado nas etapas de PCR permite a análise, comparação e detecção de alterações do nível de metilação da citosina de regiões que possuam o sítio de clivagem, gerando quatro configurações possíveis, como exemplificado no Quadro 4. Os fragmentos produzidos são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, formando um padrão de bandas de acordo com a presença/ausência de metilação nos sítios de corte frequente, o que possibilita a visualização de vários marcadores em uma única amostra.

Quadro 4 - Padrões de bandas observados em gel de poliacrilamida para as digestões de *Msp* I e *Hpa* II

Padrão de banda		Padrão de metilação
<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II	
1	1	Ausência de metilação
0	0	Metilação completa
1	0	Metilação interna (digestão com M')
0	1	Metilação externa (digestão com H')

Legenda: M': *Msp* I, H': *Hpa* II, 0: ausência, 1: presença

A técnica de MSAP possui diversas aplicações no campo da biotecnologia vegetal, sendo utilizada em estudos de análise de estabilidade epigenética de plantas micropropagadas (DANN; WILSON, 2011; TIWARI et al., 2013; AL-LAWATI et al., 2016) ou conservadas *in vitro* por longos períodos (CASTILLO et al., 2010; KACKZMARCZYK et al., 2010; HAO; DENG, 2003), plantas de campo (GIMENEZ et al., 2016), além de estudos de fisiologia vegetal (BAURENS et al., 2004; CAUSEVIC et al., 2005; CAUSEVIC et al., 2006; HANAI et al., 2010; LANDEY et al., 2013; BRAVO et al., 2017).

Trabalhos desenvolvidos com o objetivo exclusivo de analisar modificações dos níveis de metilação durante a morfogênese *in vitro* de espécies vegetais por meio do MSAP são bastante escassos. A técnica já foi utilizada para testar a hipótese de que fatores epigenéticos estão relacionados com a maturação de órgãos e consequente perda da capacidade organogênica. Ao longo da maturação de ápices de *Pinus radiata*, observou-se a perda da capacidade de geração de gemas laterais, que foi relacionada ao aumento dos níveis de metilação de DNA ao longo da transição do tecido imaturo para maduro (VALLEDOR et al., 2010).

A análise de modificações nos níveis de metilação ao longo da germinação *in vitro* de *Aeluropus littoralis* revelou uma tendência de aumento de polimorfismos conforme o estágio de desenvolvimento da planta. Também foi observado um aumento na taxa de metilação ao longo do seu desenvolvimento (HASHEMI-PETROUDI et al., 2014). Na comparação entre germinação *in vivo* e organogênese *in vitro* de seis espécies (*Salvadora persica*, *Commiphora wightii*, *Simmonsia chinensis*, *Jatropha curcas*, *Withania coagulans*), foram observadas alterações nos

níveis de metilação e taxas de polimorfismo entre os modelos de cultivo. Esses resultados evidenciam a plasticidade das plantas em resposta a diferentes ambientes. Entretanto, como não foi possível determinar uma relação direta entre as taxas de metilação em resposta aos modelos *in vivo* e *in vitro*, concluiu-se que os genótipos das espécies tiveram maior influência sobre o seu comportamento epigenético do que o modelo de cultura aplicado (RATHORE; MASTAN; AGARWAL, 2015). A comparação de duas linhagens (embriogênica e não-embriogênica) de *Agave fourcroydes* mostrou que a linhagem embriogênica possui padrão menos metilado (18-50%), porém com maior flutuação. A linhagem não embriogênica evidenciou maior metilação (48-56%), porém com menor variação. A diferença de variação nas taxas de metilação entre as duas linhagens é explicada pela formação do embrião, que necessita de uma redução da metilação para a ativação de mais genes logo antes da sua indução (MONJA-MIO et al., 2018).

4 A BERINJELA COMO MODELO PARA A MORFOGÊNESE *IN VITRO*

A berinjela (*Solanum melongena* L.) é uma espécie arbustiva pertencente à família Solanaceae, sendo originária do continente Asiático. Seus frutos são carnosos e podem variar de tamanho, coloração e forma de acordo com a variedade. A espécie possui grande capacidade de regeneração *in vitro*, apresentando vias morfogênicas distintas a partir de diferentes explantes, em resposta a diversos reguladores de crescimento. Dessa forma, a berinjela é utilizada para estudos de morfogênese *in vitro*, transformação genética, avaliação de variação somaclonal, e regulação de expressão gênica em plantas (MAGIOLI; MANSUR, 2005).

O primeiro estudo de regeneração por organogênese em berinjela foi desenvolvido por KAMAT e RAO (1978), que testaram a influência de diferentes reguladores de crescimento sobre a regeneração a partir de hipocótilos. Foi observado que citocininas têm papel importante na indução de gemas por organogênese direta e indireta, obtendo-se taxas ótimas de regeneração (100%) em resposta a citocininas como zeatina, 6-benzilaminopurina (BAP) e adenina 6-benzil-9-tetrahidropirano (SD8339), utilizadas isoladamente ou em combinação com diferentes auxinas. Quando somente auxinas foram adicionadas ao meio, não houve proliferação de gemas. Desde então, a regeneração por meio de organogênese já foi descrita a partir de diferentes tipos de explantes, tais como hipocótilo (PICOLI et al., 2000; SARKER; YESMIN; HOQUE, 2006; KAUR et al., 2011a; PADMA; RAVISHANKAR, 2013; MUTHUSAMY et al., 2014, MUKTADIR et al., 2016), folha (PERRONE; BICO; ROTINO, 1992; MAGIOLI et al., 1998; GISBERT; PROHENS; NUEZ, 2006; KAUR et al., 2011a, MUTHUSAMY et al., 2014; KANNA; JAYABALAN, 2015), cotilédone (MAGIOLI et al., 1998; PICOLI et al., 2000; GISBERT; PROHENS; NUEZ, 2006; SARKER; YESMIN; HOQUE, 2006; KAUR et al., 2011a; MUTHUSAMY et al., 2014; TAGHIPOUR; JAMSHIDI; HUYOP, 2015, TANZENA et al., 2018), nó cotiledonar (KANNA; JAYABALAN, 2010; BHAT et al., 2013), raiz (SARKER; YESMIN; HOQUE, 2006), caule (BERJAK; TIJAN; TAHA, 2002) e ápice caulinar (SARKER; YESMIN; HOQUE, 2006; BHAT et al., 2013)

A embriogênese somática em berinjela foi inicialmente descrita por YAMADA; NAKAGAWA e SINOTO (1967) em embriões zigóticos cultivados em meio MS suplementado com AIA (ácido 3-indoleacético). O potencial embriogênico da

berinjela também foi avaliado para diferentes explantes, tais como hipocótilo (MATSUOKA; HINATA, 1979; Ali; OKUBO; KUNIMITSU, 1991; MAGIOLI et al., 2001b; PICOLI et al., 2000; YU et al., 2003; MIR et al., 2008; MIR et al., 2011; ROBINSON; SARANYA, 2013, HABIB et al., 2016), cotilédone (ALICCHIO; DEL GROSSO; BOSCHIERI, 1982; FOBERT; WEBB, 1988; SAITO; NISHIMURA, 1994; MAGIOLI et al., 2001b; TARRÉ et al., 2004; RAHMAN et al., 2006; HOSSAIN; RAHMAN; BARI, 2007; KAUR et al., 2013, VUKSANI et al., 2014), folha (ALICCHIO; DEL GROSSO; BOSCHIERI, 1982; GLEDDIE; KELLER; SETTERFIELD, 1986; RAO; SINGH, 1991; YADAV; RAJAM, 1997; SALIH; AL-MALLAH, 2000; MAGIOLI et al., 2001b; ROBINSON; SARANYA, 2013), raiz (FRANKLIN; SHEEBA; LAKSHMI 2004; MIR et al., 2008; MIR et al., 2011), epicótilo (MAGIOLI et al., 2001b) e caule (SALIH; AL-MALLAH, 2000; ROBINSON; SARANYA, 2013).

O efeito de poliaminas (PAs) durante a morfogênese *in vitro* foi também estudado utilizando a berinjela. Foi observada uma relação entre a distribuição espacial de PAs endógenas livres e conjugadas, e o potencial morfogênico de diferentes explantes durante a organogênese (YADAV; RAJAM, 1997) e a embriogênese (SCOCCIANI et al., 2000). Poliaminas como a putrescina apresentaram efeito importante sobre a embriogênese somática em diferentes níveis ao longo do processo (SHARMA; RAJAM, 1995; SHARMA; YADAV; RAJAM, 1997; YADAV; RAJAM, 1998). Por outro lado, PAs como a espermidina apresentaram ação principalmente no crescimento da raiz e diferenciação de raízes laterais (SHARMA et al., 1997). Além disso, a berinjela foi utilizada em estudos de fatores de estresse na cultura *in vitro*, tendo sido observado o acúmulo da proteína BiP (pertencente à família *heat shock*) em plantas hiper-hídricas (PICOLI et al., 2001) e de prolina em plantas cultivadas em meios de cultura com concentrações de cloreto de sódio acima de 100mM (ZAYOVA et al., 2017).

Estudos sobre alterações na expressão gênica nos estágios iniciais da embriogênese somática induzida por 2,4-D foram realizados com a berinjela, resultando na identificação de genes com expressão diferencial ou aumentada nos dez primeiros dias de cultura (MOMIYAMA et al., 1996; AFELE et al., 1996). A atividade do gene da luciferase foi analisada em linhagens transgênicas, utilizando o promotor CaMv 35S, tendo sido observada flutuação de sua expressão em resposta a mudanças na temperatura (HANYU et al., 1999). Um transcrito associado à organogênese, dois relacionados à embriogênese e a expressão diferencial do gene

ACC sintase entre tais vias foram identificados a partir de análise de metilação de DNA pela técnica de *Southern Blotting* e expressão gênica utilizando um sistema de suspensões celulares que produziam embriões somáticos ou brotos (BUCHERNA et al., 2001).

Diversos estudos com berinjela já foram desenvolvidos no Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV) da UERJ. Inicialmente, foi estabelecido um protocolo para indução de brotos utilizando o regulador de crescimento TDZ, tendo sido obtida uma resposta organogênica com o uso de concentrações menores do que o previamente descrito para outras espécies vegetais (MAGIOLI et al., 1998). Posteriormente, a partir do estabelecimento de um sistema embriogênico, foi analisada a influência de antibióticos e do co-cultivo com *Agrobacterium* sobre a eficiência do desenvolvimento dos embriões (MAGIOLI et al., 2001a). Um estudo anatômico realizado subsequentemente demonstrou que a embriogênese somática *in vitro* e a iniciação de raízes adventícias têm uma origem comum (TARRÉ et al., 2004).

Na área de transformação genética, foi desenvolvido um protocolo de transformação via *Agrobacterium*, que permitiu o estudo do padrão de expressão do gene *ATGRP-5*, utilizando uma construção contendo seu promotor fusionado ao gene *GUS*. A expressão foi detectada na epiderme do caule e folhas, que são tecidos vulneráveis à penetração de patógenos, sugerindo a possibilidade da sua utilização em programas de melhoramento visando à inserção de genes de resistência (MAGIOLI et al., 2000). Plantas transgênicas contendo *ATGRP-5-GUS* foram utilizadas para o estudo do padrão de expressão do gene *ATGRP-5* durante a embriogênese, observando-se uma alta atividade no início do desenvolvimento de embrião, o que indica sua possível atuação no controle da via embriogênica (MAGIOLI et al., 2001b).

Desse modo, por representar um excelente modelo para a investigação de mecanismos moleculares envolvidos no processo de diferenciação *in vitro*, possibilitando o estudo de diversos aspectos da biologia vegetal, a espécie foi proposta como planta modelo (MAGIOLI; MANSUR, 2005).

Neste trabalho, foi realizada uma comparação das modificações epigenéticas ocorridas durante a embriogênese somática e a organogênese a partir de explantes cotiledonares de berinjela, utilizando análises MSAP. Foi adotado como modelo um sistema de cultura desenvolvido no NBV, o qual possui a característica especial de

apresentar a formação simultânea de calos organogênicos e embriogênicos nas porções distal e proximal do explante, respectivamente (MERHY, 2009), de forma que ambas as vias de regeneração são obtidas a partir de um único explante, em resposta a um mesmo regulador de crescimento. Deste modo, excluem-se variáveis inerentes à utilização de diferentes indivíduos e tecidos, assim como aos diferentes mecanismos de ação dos fitorreguladores, ao contrário do que ocorre em outros modelos adotados com o mesmo objetivo.

5 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi analisar possíveis diferenças epigenéticas no padrão de metilação do DNA de *Solanum melongena* durante o desenvolvimento *in vitro* de calos embriogênicos e organogênicos obtidos a partir de explantes cotiledonares.

Objetivos específicos:

- Obter calos organogênicos e embriogênicos de *Solanum melongena* a partir de explantes cotiledonares cultivados em meio MS suplementado com BAP 5mg/L;
- Adaptar a metodologia de MSAP para a análise de tecidos e calos de *Solanum melongena*;
- Identificar possíveis diferenças nos padrões de metilação do DNA em diferentes etapas do desenvolvimento de calos organogênicos e embriogênicos obtidos de explantes cotiledonares, através da técnica de MSAP;
- Identificar marcadores moleculares possivelmente associados ao desenvolvimento de calos organogênicos e embriogênicos em berinjela.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Material vegetal e condições de cultura

Sementes de *Solanum melongena* cv. Flórida Market foram obtidas comercialmente através da empresa Islã S.A. Para a descontaminação, as sementes foram lavadas com detergente comercial e enxaguadas três vezes com água corrente. Em seguida foram imersas em solução de álcool 70% por 1 minuto sob agitação, enxaguadas novamente, e mantidas em solução de hipoclorito de sódio a 2% contendo 3-4 gotas de detergente Tween a 1%, sob agitação, por 20 minutos. Ao final do processo, as sementes foram enxaguadas com água deionizada estéril (3x), em capela de fluxo laminar.

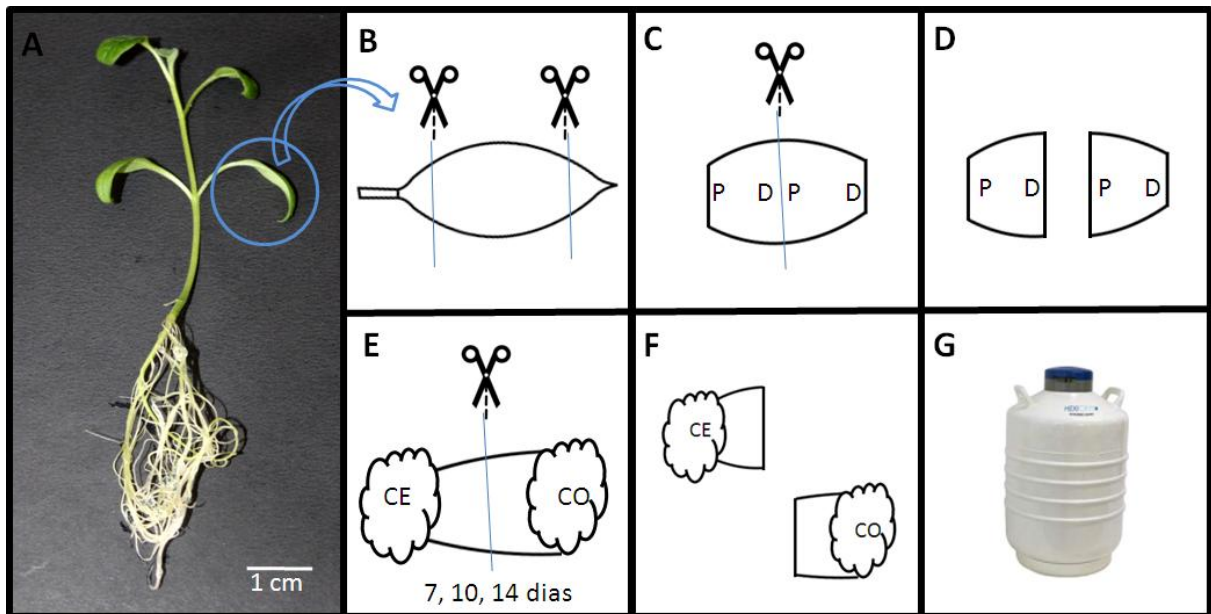
6.2 Germinação *in vitro*

Para a germinação *in vitro*, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo metade da concentração de sais (MS ½), sacarose a 1,5%, solidificado com Agar a 0,7%. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C, sob 1,0 atm. O material foi mantido em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16h, intensidade luminosa de 46 $\mu\text{mol.m}^{-2}$, a 30±2°C.

6.3 Indução de calogênese

Após 21 dias de cultura, os explantes cotiledonares foram excisados, sendo retiradas as extremidades. O cotilédone foi seccionado transversalmente na região central e os segmentos obtidos foram inoculados em meio MS suplementado com BAP na concentração de 5 mg/L (MERHY, 2009). Após períodos de 0 (dia da inoculação/explante inicial), 7, 10 e 14 dias de cultura, os explantes foram seccionados transversalmente, separando-se os calos organogênicos e embriogênicos (Figura 6).

Figura 6 - Obtenção de explantes cotiledonares de *Solanum melongena* cv. Florida Market



Legenda: A) Plântula *in vitro* desenvolvida após 21 dias da inoculação de sementes em meio MS½. B) Excisão do cotilédono e corte das extremidades. C) Corte transversal na linha central do explante, gerando dois fragmentos de tecido com porções proximais (P) e distais (D). D) Separação dos explantes cotiledonares gerados e inoculação em meio MS suplementado com BAP a 5 mg/L. E) Corte transversal na linha central do explante com calos embriogênicos (CE) e organogênicos (CO). F) Separação e individualização dos calos referentes a cada via de regeneração. G) Congelamento dos tecidos em nitrogênio líquido.

6.4 Extração de DNA

A coleta do material vegetal para análises MSAP foi organizada em esquema de *pool*, sendo o agrupamento efetuado por lote de germinação e mantendo-se separadas as porções proximais e distais dos explantes. O material foi mantido em nitrogênio líquido até a extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Dellaporta; Wood; Hicks (1983). O tecido vegetal foi triturado em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino, e acrescido de tampão de extração gelado, composto por 10% de Tris-HCl 1M, 10% de EDTA 0,5 M, 10% de NaCl 5M, 0,07% de 2-mercaptoetanol e água MilliQ para completar o volume. Para a lise completa da parede celular, foram acrescidos, em cada tubo, 104 µL de SDS 10% com posterior incubação a 65°C por 10 minutos. Em seguida, 280µL de KOAc 5M foram adicionados à solução, e os tubos incubados em gelo por 20 minutos e centrifugados

a 13.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o procedimento foi repetido até a obtenção de uma solução translúcida. A precipitação foi feita com 700µL de isopropanol, seguida de incubação das amostras a 4°C *over-night*. Para a próxima etapa, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* seco à temperatura ambiente, que após a secagem, foi solubilizado em 100µL de 50mM Tris/EDTA e adicionados 11 µL de NaOAc 3M, sendo centrifugados a 13.000rpm por 5 minutos, seguido de lavagem com etanol 70% e 100%. Ao final da secagem, o *pellet* foi solubilizado em água MilliQ com RNase 20ng/µL. A quantificação foi feita utilizando NanoDrop 2000 (Thermofisher) e DNA Lambda e o material foi estocado em freezer a -20°C.

6.5 Análise por MSAP

As duplas digestões e todas as etapas seguintes que compreendem a metodologia de MSAP foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Pacheco e colaboradores (2008), com pequenas adaptações.

6.5.1 Digestão com Enzimas de Restrição

A digestão de *EcoR I/Hpa II* foi realizada em duas etapas. Para um volume final de reação de 20 µL, foi utilizado Tampão de digestão Multi-Core 1x (PROMEGA), 3U de enzima *EcoR I* (PROMEGA), 200 ng de DNA de partida, sendo o volume final completado com água MilliQ. As amostras foram submetidas a digestão enzimática em banho-maria por três horas e trinta minutos a 37°C, seguido de inativação a 65°C por 15 minutos, e resfriamento das amostras até temperatura ambiente. Após este período, foram adicionadas 3U de enzima *Hpa II* (PROMEGA) individualmente nos tubos, retornando para o banho a 37°C por três horas e trinta minutos, seguido de inativação a 65°C por 15 minutos e resfriamento até alcançar temperatura ambiente.

Para a digestão de *EcoR I/Msp I*, foram utilizados para um volume final de 20µL de reação: Tampão de digestão B 1x (PROMEGA), 3U de enzima *EcoR I* (PROMEGA), 3U de enzima *Msp I* (PROMEGA), 200 ng de DNA de partida, sendo o

volume final completado com água MilliQ. A digestão foi feita a 37°C por três horas e trinta minutos, seguida de inativação a 65°C por 15 minutos. Os produtos de digestão foram estocados em freezer a -20°C até sua utilização.

6.5.2 Preparação dos adaptadores

Os adaptadores foram sintetizados pela empresa IDT Tecnologia e solubilizados a 0,1 mM de concentração de estoque, utilizando Low TE pH 8 (10 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA). Os adaptadores *Foward* e *Reverso* de *EcoR I* foram aliqotados em um único tubo, unindo-se as sequências de maneira equimolar, na concentração final de 0,005 mM. Os adaptadores de *Msp I-Hpa II* foram aliqotados seguindo o mesmo protocolo, porém com concentração final de 0,05 mM. Para otimizar a junção das fitas, as alíquotas foram postas em banho maria a 65°C por três minutos, e após, deixadas sobre a bancada, imersas em um bécher com a água do banho até atingirem temperatura ambiente. Após este procedimento, os adaptadores foram estocados em freezer a -20°C até sua utilização. A relação de adaptadores utilizados neste trabalho está especificada no Quadro 5.

Quadro 5 - Sequências dos adaptadores utilizados para ligação aos fragmentos gerados na etapa de digestão para a análise MSAP de tecidos e calos embriogênicos e organogênicos de *Solanum melongena*.

Adaptador	Sequência
<i>EcoR I Foward</i>	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'
<i>EcoR I Reverso</i>	3'-CAT CTG ACG CAT GGT TAA-5'
<i>Msp I-Hpa II Forward</i>	5'-GA TCA TGA GTC CTG CT-3'
<i>Msp I-Hpa II Reverso</i>	3'-AGT ACT CAG GAC GAG C-5'

6.5.3 Ligação dos adaptadores

Para a ligação dos adaptadores aos fragmentos gerados durante a digestão, foram adicionados 20µL de produto de digestão à 10 µL de Mix de ligação, composto de: Tampão T4 Ligase 1x (PROMEGA), 1U T4 Ligase (PROMEGA), 5 pmol Adaptador *EcoR* I, 50 pmol de adaptador *Msp* I- *Hpa* II. Os produtos de ligação foram incubados a 22°C por três horas e estocados a -20°C até sua utilização.

6.5.4 Preparação dos primers

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa IDT Tecnologia e solubilizados em Low TE pH 8 (10mM Tris HCl, 0,1mM EDTA), para a concentração de estoque de 0,1 mM e aliquotados a 15 ng/µL de concentração final de uso. A lista de *primers* utilizados está apresentada no Quadro 6.

Quadro 6 - *Primers* utilizados nas etapas de pré-amplificação (configuração +1) e amplificação seletiva (configurações +3 e +4) da análise de MSAP de calos organogênicos e embriogênicos de *Solanum melongena*.

Primer	Sequência
<i>EcoR</i> I + C	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'
<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II +G	5'-ATC ATG AGT CCT GCT CGG-3'
<i>EcoR</i> I + A	5'-GAC TGC GTA CCA ATT A-3'
<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II +A	5'- ATC ATG AGT CCT GCT CGA-3'
<i>EcoR</i> I + CAT	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAT-3'
<i>EcoR</i> I + CAG	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAG-3'
<i>EcoR</i> I + CAAC	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA C-3'

Primer	Sequência
<i>EcoR</i> I + AGA:	5'-GAC TGC GTA CCA ATT AGA-3'
<i>EcoR</i> I + ATC:	5'-GAC TGC GTA CCA ATT ATC-3'
<i>EcoR</i> I + AAG:	5'-GAC TGC GTA CCA ATT AAG-3'
<i>EcoR</i> I + ACG:	5'-GAC TGC GTA CCA ATT ACG-3'
<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II +AAAG:	5'-ATC ATG AGT CCT GCT CGA AAG-3'
<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II +ACCA:	5'-ATC ATG AGT CCT GCT CGA CCA-3'
<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II +AGAC:	5'-ATC ATG AGT CCT GCT CGA GAC-3'
<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II +ATGT:	5'-ATC ATG AGT CCT GCT CGA TGT-3'
<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + GTCA	5'-ATC ATG AGT CCT GCT CGG TCA -3'

6.5.5. Amplificação por PCR

Os fragmentos ligados aos adaptadores foram amplificados em duas etapas:

1) Pré-amplificação, utilizando-se *primers* complementares aos adaptadores com uma base interna de seleção; 2) Amplificação seletiva, utilizando *primers* com três ou quatro nucleotídeos de seleção interna.

6.5.5.1 Pré-amplificação

As reações foram realizadas em 20 µL de volume final, contendo 2 µL do produto de ligação, 30 ng *primer EcoR* I + 1, 30 ng *primer Msp* I – *Hpa* II + 1, 1x Tampão de PCR (PROMEGA), 2U G2 Go *Taq* (PROMEGA), 0,4 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, sendo o volume final completado com água MilliQ. A ciclagem foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems) sob as condições: 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Para verificar a funcionalidade da reação de pré-amplificação, 5 µL de produto de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% por 15

minutos. Para coloração, aplicou-se o corante UniSafe Dye (UniScience) no momento da preparação do gel de acordo com as especificações do fabricante. O produto de reação restante foi mantido a -20°C até sua utilização.

6.5.5.2 Amplificação seletiva

Dezenove diferentes combinações de *primers* foram utilizadas com o objetivo de selecionar aquelas que apresentassem em maior resolução de bandas e diferenciação no padrão de amplificação (Quadro 7).

Quadro 7 - Combinações de *primers* utilizadas na etapa da amplificação seletiva da análise de MSAP de calos organogênicos e embriogênicos de *Solanum melongena*.

Combinações de <i>primers</i> testados		
<i>EcoR</i> I + CAT	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + GTCA
<i>EcoR</i> I + CAG	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + GTCA
<i>EcoR</i> I + CAAC	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + GTCA
<i>EcoR</i> I + AGA	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + AAAG
<i>EcoR</i> I + AGA	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + ACCA
<i>EcoR</i> I + AGA	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + AGAC
<i>EcoR</i> I + AGA	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + ATGT
<i>EcoR</i> I + AAG	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + AACA
<i>EcoR</i> I + AAG	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + AGAC
<i>EcoR</i> I + AAG	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + ATGT
<i>EcoR</i> I + AAG	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + AAAG
<i>EcoR</i> I + ATC	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + AGAC
<i>EcoR</i> I + ATC	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + ATGT
<i>EcoR</i> I + ATC	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + AAAG
<i>EcoR</i> I + ATC	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + ACCA
<i>EcoR</i> I + ACG	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + ACCA
<i>EcoR</i> I + ACG	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + ATGT

Combinações de primers testados		
<i>EcoR</i> I + ACG	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + AAAG
<i>EcoR</i> I + ACG	X	<i>Msp</i> I – <i>Hpa</i> II + AGAC

As reações de amplificação foram realizadas sob as seguintes condições, para volume final de 20 µL: 5 µL de produto pré-amplificado diluído em 1:5, 30 ng de cada *primer*, 1x Tampão de PCR, 1U G2 Go *Taq*, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂ e água MilliQ. A ciclagem foi realizada em termociclador Veriti (Applied biosystems) sob as seguintes condições: um ciclo de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Para os próximos 12 ciclos, as temperaturas e tempos de desnaturação e extensão foram mantidos, porém, a temperatura de anelamento sofreu decréscimo de -0,7°C a cada ciclo, acrescido de 24 ciclos finais de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.

Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (poliacrilamida 6%, 7,5M ureia) em cuba vertical de eletroforese S3S OWL (Thermofisher). Para o preparo do gel, as placas foram previamente lavadas com SDS 10%, enxaguadas com água destilada morna, e tratadas com álcool 70% (3x) e álcool 100% (3x), ou até a completa retirada de impurezas. Após a evaporação completa do álcool, a placa menor, na qual o gel permanece aderido, foi tratada com 1 ml de solução de Bind-Silane (95% etanol absoluto, 4,7% de ácido acético glacial, 0,3% de Bind-Silane), e a placa maior foi tratada com óleo de oliva. Foram utilizados espaçadores de 0,4 mm e as placas foram fechadas com fita PVC e grampos, para evitar vazamentos do gel. Foi adicionado à solução de poliacrilamida, 0,53% de persulfato de amônio (10%) e 0,053% de TEMED (Tetrametiletilenodiamina). Após 1h, foram retirados grampos, fita, pente e espaçador inferior, e as placas foram posicionadas na cuba, com a placa menor em contato com a superfície de aquecimento. Utilizou-se tampão TBE 1x no reservatório superior e TBE 1x + AcONa 1M na inferior, ambos previamente aquecidos. Foi realizada pré-corrída de 60 minutos nas condições de 2200V, 40mA e 55W, pré-aquecendo as placas a temperatura de 50°C. Foi aplicado tampão de formamida nas amostras (98% formamida, 10mM EDTA pH8 0,5M, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xilenocianol), em volume equivalente, e estas foram desnaturadas em termociclador a 94°C por 10 minutos, seguidas de banho de gelo. Dez microlitros de

amostras foram aplicadas no gel, seguida de corrida de 1 hora e 45 minutos, sob 2000V, 40mA e 55W.

Para a coloração com prata, o gel foi tratado com ácido acético 10% por 30 minutos, sob agitação constante. Em seguida, foi mergulhado em recipiente com água destilada por 2 minutos, sob agitação, sendo repetida a operação até a retirada completa da solução de ácido acético 10%. Para a impregnação, o gel foi mergulhado em 1 litro de solução de coloração (nitrato de prata 0,1%, 0,05% de formaldeído) durante 30 minutos, sob agitação e protegida da luz. Em seguida, foi feita a imersão em água destilada por três segundos para retirar o excesso da solução de coloração. A etapa de revelação foi feita com 1 litro de solução reveladora (carbonato de cálcio 3%, formaldeído 0,05% e tiosulfato de sódio 0,002%), por dois minutos ou até a visualização das bandas. Ao final do processo, o gel foi fixado em solução de ácido acético 10%.

A interpretação dos padrões de metilação foi realizada através da análise da presença ou ausência de bandas observadas em M' e H' para seu respectivo tecido. Por exemplo, para análise do padrão de metilação do tecido organogênico referente ao tempo zero, é necessário combinar as informações de O0 M' com O0 H'. O padrão de presença/ausência de bandas informará o nível de metilação dos marcadores em questão, baseando-se nos padrões descritos na introdução deste trabalho. Foram considerados marcadores as bandas visíveis, mesmo que em baixa intensidade, tendo como critério a reprodutibilidade entre as réplicas e a ocorrência de mudanças no padrão de metilação em mais de um sítio de corte. Marcadores com mudanças de padrão de metilação em somente um sítio não foram considerados pois o padrão de metilação pode sofrer mudanças estocásticas, ou seja, que não estejam associadas ao processo morfogênico. Os marcadores foram classificados em "O" (marcadores de organogênese, que apresentavam padrão de metilação estável no calo embriogênico), "E" (marcadores de embriogênese, que apresentavam padrão de metilação estável no calo organogênico) e "D" (marcadores diferenciais, que apresentavam padrão de metilação distinto entre os tecidos analisados). A nomenclatura para identificação dos marcadores baseou-se nos nucleotídeos de seleção do *primer EcoR I* utilizado na etapa de amplificação mais um número sequencial, que sempre se iniciará com o marcador de maior peso molecular. Portanto, o primeiro marcador identificado no conjunto de *primers EcoR I* + CAT/*Msp I-Hpa II* + GTCA foi denominado CAT/GTCA.1, e assim sucessivamente.

6.6 Individualização de fragmentos e reamplificação de bandas

Para a reamplificação de fragmentos de DNA previamente individualizados nos géis de poliacrilamida desnaturante 6% corado com nitrato de prata, bandas de DNA de diferentes intensidades foram sacadas do gel com o auxílio de uma espátula. Os fragmentos foram mantidos em eppendorff com 30 µL de água Milli-Q, e estocados em freezer a -20°C até utilização. Os fragmentos foram descongelados em temperatura ambiente e macerados utilizando micropistilo autoclavado, até que a poliacrilamida ficasse totalmente fragmentada. As reações de reamplificação foram realizadas em duplicatas sob as seguintes condições, para volume final de 20 µL: 7 µL de GoTaq Master Mix (PROMEGA), 2 µL de amostra, 4 µL de primer forward 15 ng/µL, 4 µL de primer reverso 15 ng/µL, 1 µL de água milli-Q, utilizando-se a mesma ciclagem e combinação de *primers* que foi utilizada para a amplificação seletiva do fragmento no MSAP.

Alternativamente, testou-se a reamplificação a partir de produto de PCR proveniente do protocolo descrito acima. Neste caso, foram aplicados 2 µL de produto de PCR diluído 1:5 na reação, ao invés de utilizar-se a amostra original, seguindo-se as mesmas condições de amplificação e ciclagem. Cinco microlitros dos produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2,5%, e realizada eletroforese a 80V por 25 minutos. No caso da presença de mais de uma banda por amostra, 5 µL dos produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose *low melting* 2,5%, e realizada eletroforese a 80V por 25 minutos. Após a separação dos fragmentos, a banda de interesse foi cortada e a amplificação foi repetida.

6.7 Reconstrução de sequência genômica correspondente à região de corte de seleção +3 do *primer Msp I - Hpa II + GTCA* e busca em banco de dados

A sequência genômica alvo da região de corte enzimático 5'-CCGG-3' da endonuclease *Msp I / Hpa II* e os nucleotídeos adjacentes correspondentes a amplificação seletiva pelo *primer Msp I - Hpa II + GTCA* foram reconstruídas, correspondendo a 5' TGACCGG 3'.

Com o objetivo de verificar a ocorrência da sequência 5'-TGACCGG-3' ao longo de *motifs* anotados como pontos de interação DNA-TFs, foi realizada uma busca contra as informações contidas na plataforma PlantTFDB 4.0, em colaboração

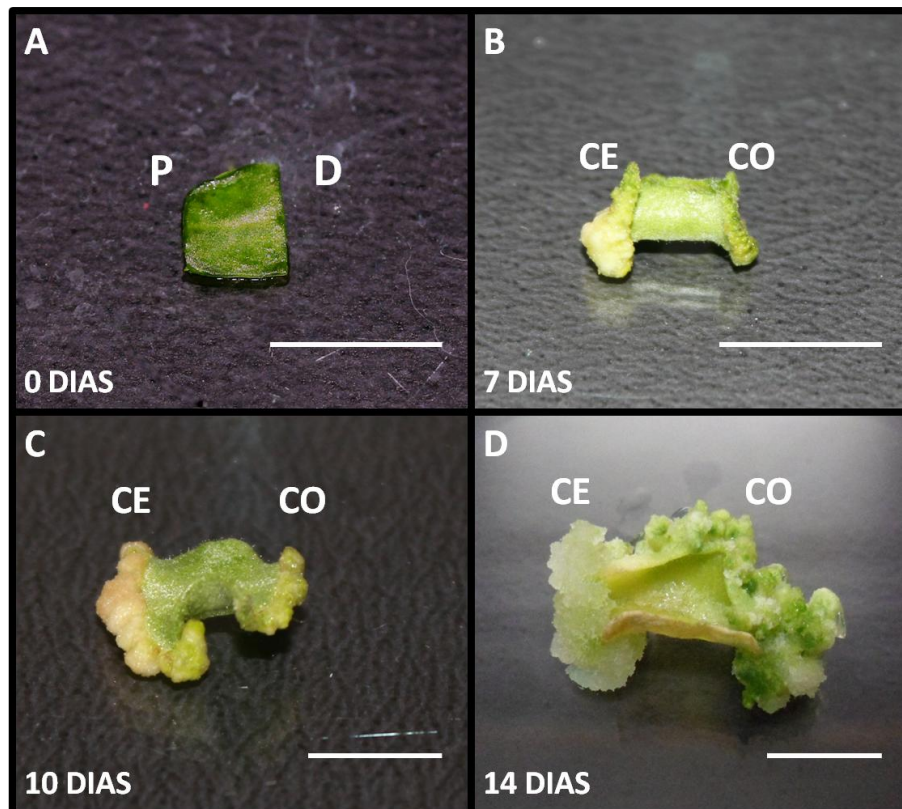
com o Dr. Rafael Perigeorge (UERJ - Depto. de Genética). Devido ao fato de as regiões de interação de fatores de transcrição (TFs) serem passíveis de variação dentro do genoma, essas informações são comumente representadas como matrizes (*Position-Specific Scoring Matrices*), que apresentam a probabilidade de ocorrência de cada resíduo, por posição, dentro do *motif* relacionado com a interação proteína-DNA. Para a recuperação da sequência dos TFs, uma vez que elas não são disponibilizadas pelo banco de dados, foram elaborados Scripts na linguagem de programação *Perl*, tendo como critério para inclusão apenas o resíduo com maior probabilidade em cada uma das posições. Após a recuperação, as sequências foram comparadas contra os produtos do corte enzimático por meio de *Shell script* e checadas manualmente.

7 RESULTADOS

7.1 Indução da calogênese a partir de explantes cotiledonares

A calogênese foi iniciada em torno do quarto dia de cultura, observando-se a formação de pequenos aglomerados de células, que se tornaram visíveis após sete dias (Figura 7). Entre 10 e 14 dias, foram observadas as características específicas de calos embriogênicos e organogênicos, respectivamente nas regiões proximal e distal, confirmando resultados obtidos anteriormente (MERHY, 2009). Após 21 dias, os dois tipos de calos misturavam-se, dificultando sua individualização.

Figura 7 - Indução de calogênese a partir de segmentos cotiledonares de *Solanum melongena* cv. Florida Market cultivados em meio MS suplementado com BAP a 5 mg/L, por diferentes períodos.



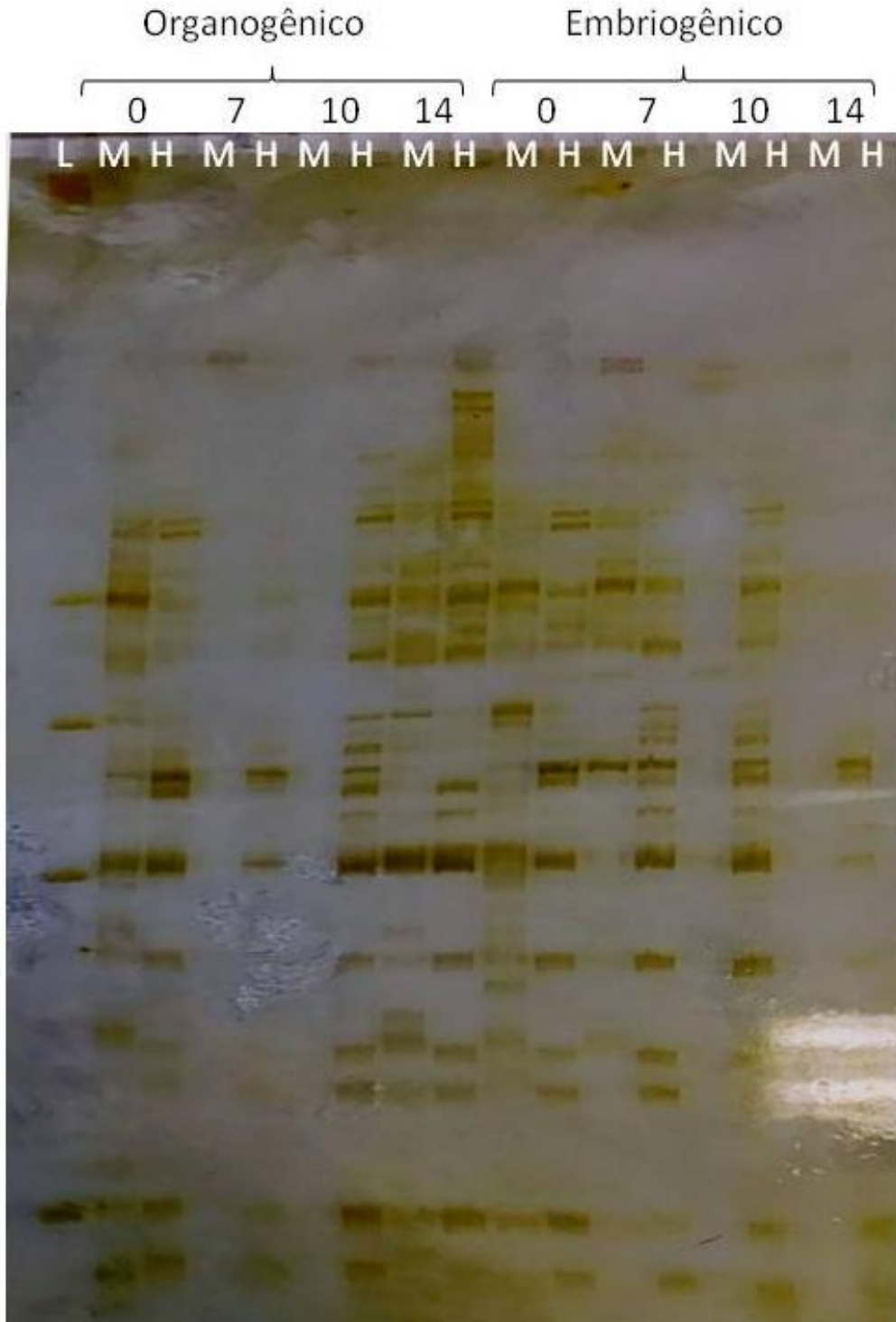
Legenda: A: Segmento cotiledonar logo após a excisão com extremidade proximal (P) e distal (D). B, C e D: calos embriogênicos (CE) e organogênicos (CO) após 7, 10 e 14 dias de cultura, respectivamente. Barra: 1 cm.

7.2 Análise de fragmentos gerados na etapa de amplificação seletiva

Foram testadas 19 combinações de *primers*, das quais 15 apresentaram amplificação satisfatória, com fragmentos individualizados no gel, gerando um total de 715 bandas. O conjunto de *primers* que apresentou o maior número de bandas (188) foi CAG x GTCA (Figura 8). Os *primers* CAAC x GTCA, AGA x AGAC, AGA x ATGT e ATC x ATGT não produziram padrões de fragmentos que pudessem ser analisados (dados não apresentados). Os *primers* com a primeira base seletiva C apresentaram um número maior de bandas e com maior nitidez em comparação com os demais.

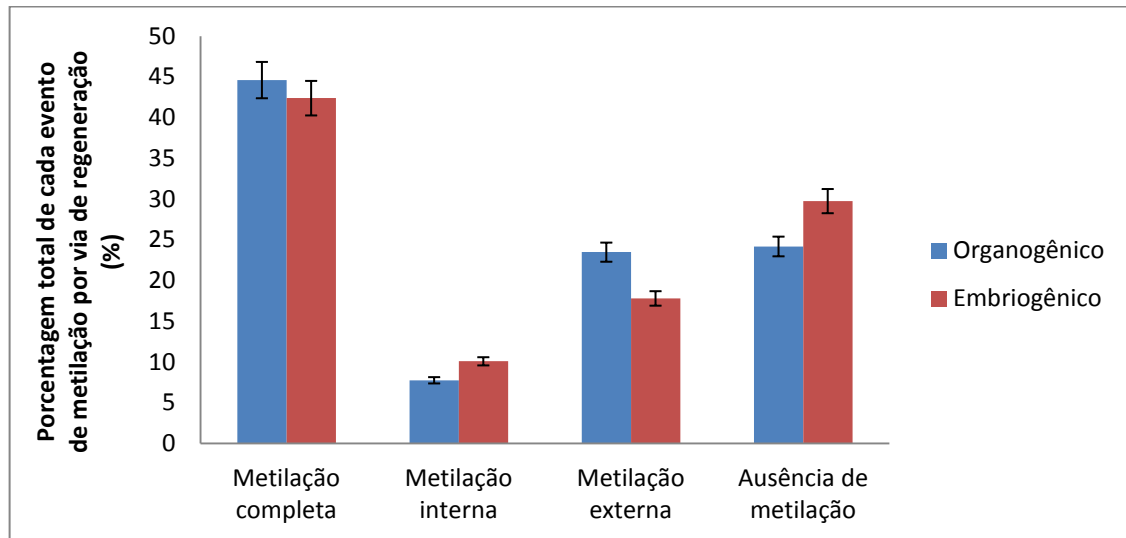
Considerando o conjunto completo de *primers* e um total de 852 eventos de metilação de DNA, a maior frequência foi observada na metilação completa, que correspondeu a 43,9% dos eventos totais, seguida de demetilação (26,96%), metilação externa (20,63%) e metilação interna (8,9%). Analisando-se os eventos epigenéticos por via de regeneração, tanto os calos organogênicos quanto os embriogênicos seguiram o padrão geral observado, porém com valores distintos para cada via (Gráfico 1). A diferença mais expressiva entre as taxas de metilação nos tecidos organogênicos e embriogênicos foi observada nos eventos de demetilação, diferindo 5,57%.

Figura 8 – Gel de poliacrilamida desnaturante 6% corado com nitrato de prata com fragmentos de DNA de cotilédones, calos organogênicos e embriogênicos de *Solanum melongena* nos tempos de 0, 7, 10 e 14 dias de cultura amplificados pelo conjunto de primers CAG x GTCA



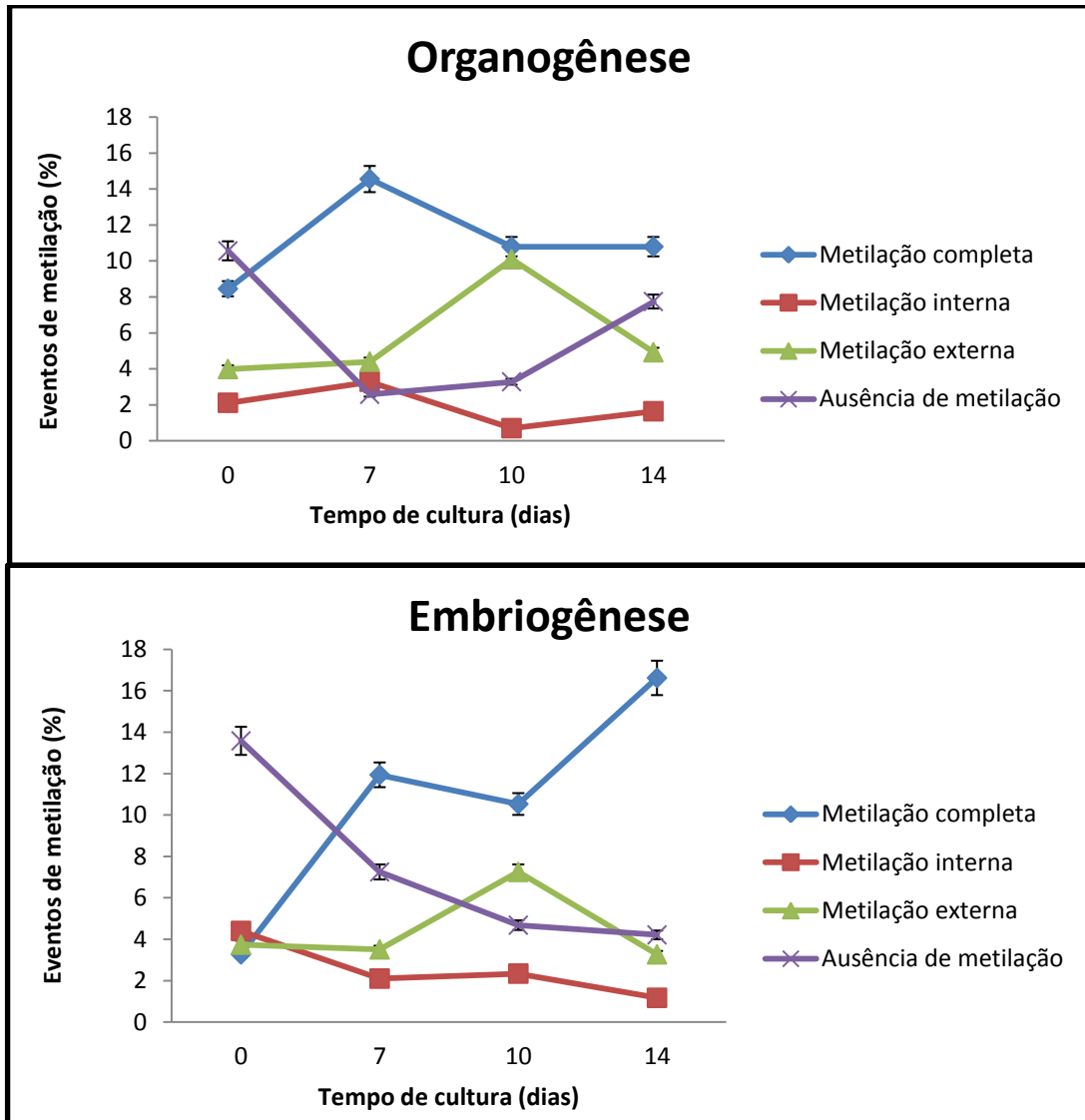
Legenda: L: marcador de peso molecular 100bp; M: digestão com a enzima *Msp* I; H: digestão com a enzima *Hpa* II; 0: tempo inicial de cultura; 7: 7 dias de cultura; 10: 10 dias de cultura; 14: 14 dias de cultura.

Gráfico 1- Taxas totais de eventos de metilação de DNA de calos embriogênicos e organogênicos de *Solanum melongena* cv. Florida Market cultivados em meio MS suplementado com BAP 5 mg/L, considerando-se todos os *primers* e tempos de cultura



As taxas dos eventos de metilação apresentaram flutuação ao longo do período de cultura em ambos os calos organogênicos e embriogênicos. No início do desenvolvimento (sete dias), observa-se aumento dos níveis de metilação em ambos os tipos de calo. Após 10 dias, a taxa de metilação é reduzida, especialmente nos calos organogênicos. Após este período a taxa de metilação completa se mantém constante nos calos organogênicos, observando-se um aumento expressivo dos eventos de demetilação. O tecido embriogênico apresenta aumento nos níveis de metilação e decréscimo nos eventos de demetilação para o tempo de cultura de 14 dias (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Taxas de eventos de metilação de DNA observados em calos organogênicos e embriogênicos de *Solanum melongena* cv. Florida Market cultivados em meio MS suplementado com BAP 5 mg/L nos períodos de 0, 7, 10 e 14 dias, considerando-se todos os primers



Os diferentes tipos de eventos de metilação (metilação completa, metilação interna, metilação externa e demetilação) foram contabilizados por tempo de cultura e via de regeneração, para cada combinação de *primers*, especificados na Tabela 1. O conjunto de *primers* que apresentou o maior número de eventos de metilação foi CAG x GTCA, com um total de 181.

Combinação de primers	Evento de metilação	Organogênese Tempo de cultura (dias)				Embriogênese Tempo de cultura (dias)				Total de eventos
		0	7	10	14	0	7	10	14	
ACG x AGAC	Metilação completa	0	0	1	2	0	2	2	2	9
	Metilação interna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Metilação externa	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	Demetilação	3	1	2	1	3	1	1	1	13
ACG x ATGT	Metilação completa	2	5	7	4	0	7	5	7	37
	Metilação interna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Metilação externa	0	3	1	1	2	0	2	0	9
	Demetilação	7	1	1	4	7	2	2	2	26
AGA x AAAG	Metilação completa	4	8	7	5	2	8	5	11	50
	Metilação interna	1	3	0	1	5	2	1	0	13
	Metilação externa	5	3	6	7	2	2	6	3	34
	Demetilação	4	0	1	1	5	2	2	0	15
AGA x ACCA	Metilação completa	0	0	0	0	0	2	2	3	7
	Metilação interna	0	2	3	2	0	0	1	0	8
	Metilação externa	3	0	0	0	3	0	0	0	6
	Demetilação	0	1	0	1	0	1	0	0	3
ATC x AAAG	Metilação completa	0	4	3	4	0	5	3	4	23
	Metilação interna	5	0	0	0	5	0	0	0	10
	Metilação externa	0	2	3	2	0	1	3	2	13
	Demetilação	1	0	0	0	1	0	0	0	2
ATC x ACCA	Metilação completa	1	1	1	1	0	1	1	1	7
	Metilação interna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Metilação externa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Demetilação	2	2	2	2	3	2	2	2	17
ATC x AGAC	Metilação completa	2	2	2	2	1	2	1	2	14
	Metilação interna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Metilação externa	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	Demetilação	1	1	1	1	2	1	1	1	9

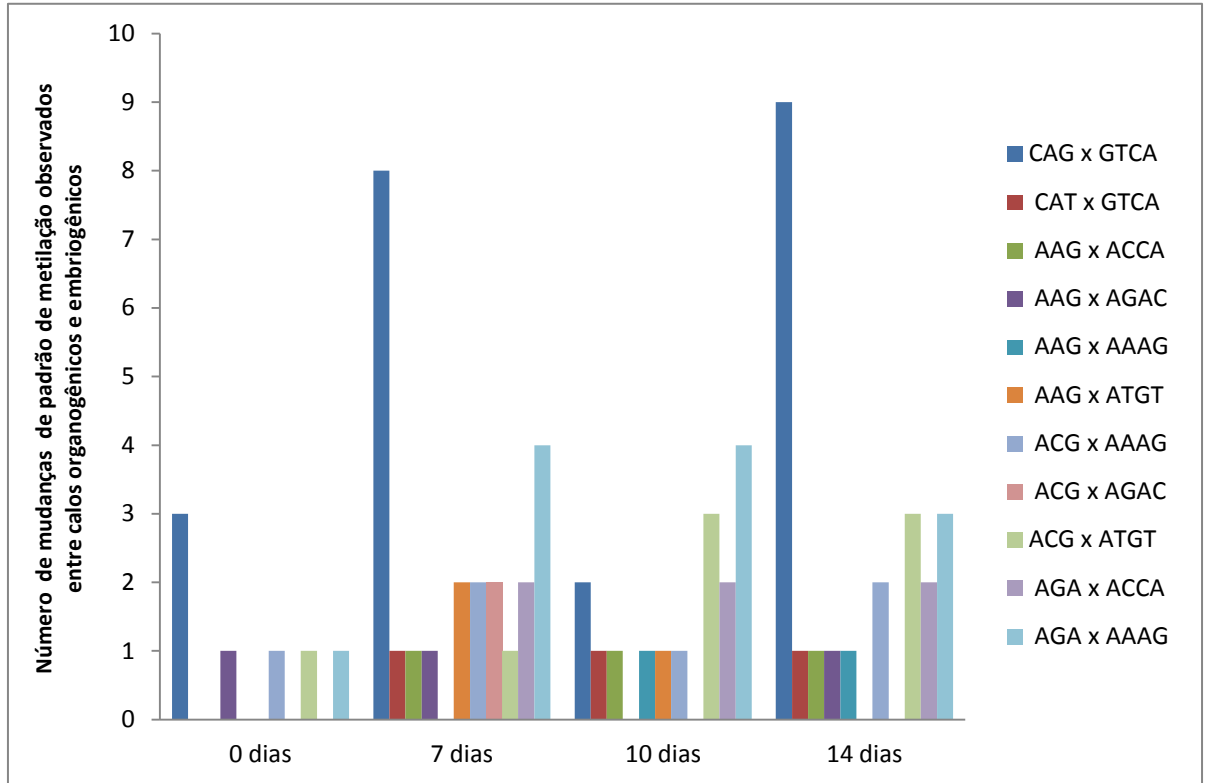
Das 15 combinações de *primers* funcionais para berinjela, 11 apresentaram mudanças no padrão de metilação ao longo do tempo de cultura ou entre os calos analisados. Os *primers* com mudanças de padrão de metilação estão especificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Combinações de *primers* que apresentaram mudanças no padrão de metilação de DNA ao longo do tempo de cultura ou entre calos organogênicos e embriogênicos de *Solanum melongena* cv. Florida Market

Combinações de <i>primers</i> com mudanças de padrão de metilação de DNA
<i>EcoR</i> I + CAG x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + GTCA
<i>EcoR</i> I + ACG x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + AAAG
<i>EcoR</i> I + AAG x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + ACCA
<i>EcoR</i> I + ACG x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + AGAC
<i>EcoR</i> I + AAG x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + AAAG
<i>EcoR</i> I + ACG x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + ATGT
<i>EcoR</i> I + CAT x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + GTCA
<i>EcoR</i> I + AGA x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + AAAG
<i>EcoR</i> I + AAG x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + AGAC
<i>EcoR</i> I + AGA x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + ACCA
<i>EcoR</i> I + AAG x <i>Msp</i> I - <i>Hpa</i> II + ATGT

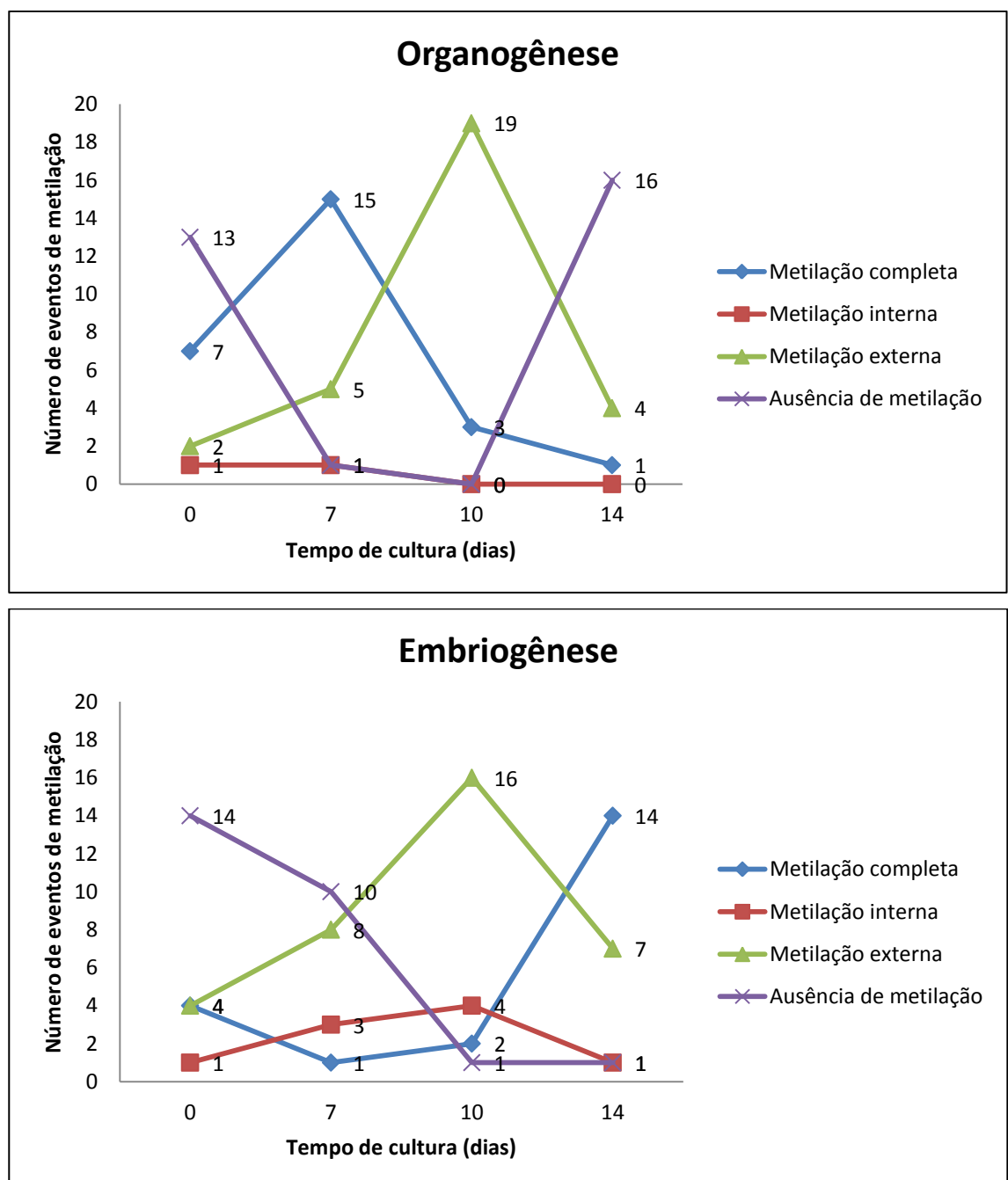
Foram observados ao total 67 eventos de mudança de padrão de metilação comparando-se tecidos organogênicos e embriogênicos para o mesmo tempo de cultura. O conjunto de *primers* *EcoR* I + CAG x *Msp* I - *Hpa* II + GTCA apresentou o maior número de mudanças de metilação (22) entre os tecidos analisados (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Número de eventos de mudança de padrão de metilação entre calos organogênicos e embriogênicos ao longo do tempo de cultura para cada conjunto de *primers* testados.



Analisando-se o padrão de metilação obtido com esses *primers* ao longo do tempo de cultivo, pode-se observar uma dinâmica particular em cada tipo de calo (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Padrão de metilação de DNA observado em calos organogênicos e embriogênicos de *Solanum melongena* cv. Florida Market para o conjunto de *primers* *EcoR* I + CAG x *Msp* I - *Hpa* II + GTCA ao longo do tempo de cultura



Dos fragmentos que apresentaram algum tipo de mudança no padrão de metilação, 34 atendiam aos critérios aplicados para a seleção de marcadores. O maior número de marcadores (11) foi observado no conjunto de *primers* CAG x GTCA, e os menores números nos conjuntos ACG x AGAC, AAG x ACCA e AAG x AGAC, todos com somente um marcador. Somente o conjunto de *primers* CAG x GTCA apresentaram os três tipos de marcadores (organogênicos, embriogênicos e diferenciais). Os marcadores selecionados como possivelmente associados à ativação das vias organogênica ou embriogênica, ou que permitiram a diferenciação entre ambas estão apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5. Seu padrão de metilação está representado por presença (1) e ausência (0).

Tabela 3 - Lista de marcadores epigenéticos selecionados como potencialmente envolvidos com a ativação e desenvolvimento da via organogênica em explantes cotiledonares de *Solanum melongena* cv. Florida Market cultivados em meio MS + BAP 5 mg/L

Marcador	O0 M	O0 H	O7 M	O7 H	O10 M	O1 0H	O14 M	O1 4H	E0 M	E0 H	E7 M	E7 H	E10 M	E1 0H	E14 M	E14 H
CAG/GT CA.1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAT/GT CA.2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAT/GT CA.3	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAT/GT CA.4	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAT/GT CA.5	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAT/GT CA.6	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AGA/AA AG.1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
AGA/AA AG.3	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
AGA/AC CA.1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AGA/AC CA.2	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Legenda: O: tecido organogênico; E: tecido embriogênico; 0: dia da inoculação; 7: 7 dias de cultura; 10: 10 dias de cultura; 14: 14 dias de cultura; M': digestão com *EcoR* I/ *Msp* I; H': digestão com *EcoR* I/ *Hpa* II; azul claro: ausência de metilação; azul médio: hemimetilação; azul escuro: metilação completa.

Tabela 4 - Marcador epigenético selecionado como potencialmente envolvido com a ativação e desenvolvimento da via embriogênica (marcadores embriogênicos) em explantes cotiledonares de *Solanum melongena* cv. Florida Market cultivados em meio MS + BAP 5 mg/L

Marcador	O0 M	O0 H	O7 M	O7 H	O1 0M	O1 0H	O1 4M	O1 4H	E0 M	E0 H	E7 M	E7 H	E1 0M	E1 0H	E1 4M	E1 4H
CAG/GTC A.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0

Legenda: O: tecido organogênico; E: tecido embriogênico; 0: dia da inoculação; 7: 7 dias de cultura; 10: 10 dias de cultura; 14: 14 dias de cultura; M': digestão com *EcoR* I/ *Msp* I; H': digestão com *EcoR* I/*Hpa* II; azul claro: ausência de metilação; azul médio: hemimetilação; azul escuro: metilação completa.

Tabela 5 - Lista de marcadores epigenéticos que apresentavam padrão diferencial (marcadores diferenciais) entre os tecidos organogênico e embriogênico em explantes cotiledonares de *Solanum melongena* cv. Florida Market cultivados em meio MS + BAP 5 mg/L

Marcador	O 0 M	O0 H	O7 M	O7 H	O1 0M	O1 0H	O1 4M	O1 4H	E0 M	E0 H	E7 M	E7 H	E1 0M	E10H	E1 4M	E1 4H
CAG/G TCA.4	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
CAG/G TCA.9	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
CAG/G TCA.5	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
CAG/G TCA.6	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
CAG/G TCA.7	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
CAG/G TCA.8	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
CAG/G TCA.10	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
CAG/G TCA.3	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
ACG/A AAG.5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
CAG/G TCA.13	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
CAT/GT CA.1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
AAG/A AAG.2	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
AAG/A CCA.1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
AAG/A GAC.1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
AAG/A TGT.1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
AAG/A TGT.2	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
ACG/A AAG.2	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
ACG/A GAC.1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
ACG/A TGT.1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
ACG/A TGT.2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
ACG/A TGT.4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
AGA/A AAG.2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
AGA/A AAG.5	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

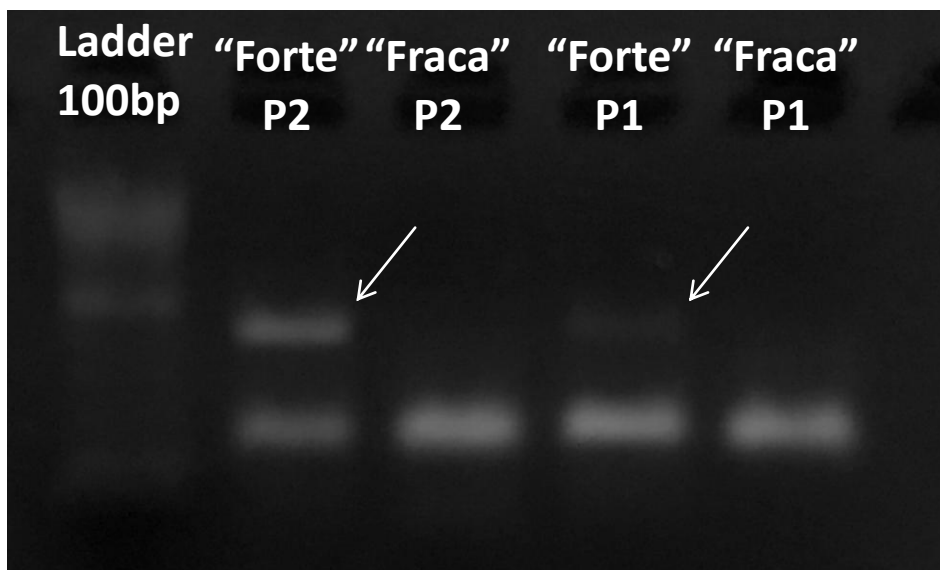
Legenda: O: tecido organogênico; E: tecido embriogênico; 0: dia da inoculação; 7: 7 dias de cultura; 10: 10 dias de cultura; 14: 14 dias de cultura; M': digestão com *EcoR* I/ *Msp* I; H': digestão com *EcoR* I/ *Hpa* II; azul claro: ausência de metilação; azul médio: hemimetilação; azul escuro: metilação completa.

7.3 Individualização de fragmentos e reamplificação

O protocolo utilizado para a reamplificação de fragmentos de DNA a partir de géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata não apresentou diferença na qualidade da amplificação entre bandas “fortes” e “fracas” retiradas do gel de poliacrilamida (Figura 9), sendo geradas bandas bem marcadas e visíveis em ambas as condições.

A amplificação da banda “forte” diretamente do fragmento de poliacrilamida evidenciou duas bandas, sendo uma em baixa intensidade (Figura 8). Ao contrário, a amplificação de “Forte P2” a partir do produto de PCR “Forte P1” resultou em duas bandas de mesma intensidade (Figura 8).

Figura 9 - Fragmentos de DNA de *Solanum melongena* cv. Florida Market reamplificados a partir de bandas em gel de poliacrilamida 6% desnaturante.

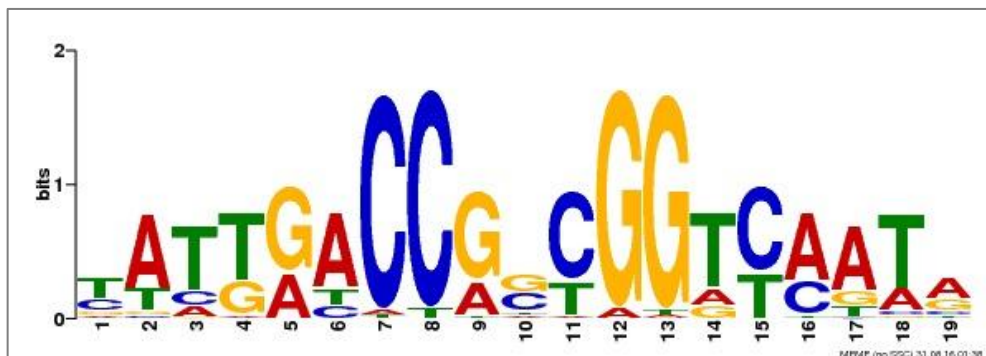


Legenda: “Forte P2”: banda de intensidade forte reamplificada a partir de produto de PCR; “Fracas P2”: banda de intensidade fraca a partir de produto de PCR; “Forte P1”: banda de intensidade forte reamplificada diretamente de fragmento retirado do gel de poliacrilamida; “Fracas P1”: banda de intensidade fraca reamplificada diretamente de fragmento retirado do gel de poliacrilamida; setas indicam banda “extra”.

Com a individualização da banda de interesse, a remoção da banda “extra” (indicada pelas setas em “Forte P1” e “Forte P2”) e a reamplificação do produto a partir do gel de agarose, a banda “extra” não foi mais visualizada.

A reconstrução do *motif* formado pelo sítio de corte 5'-CCGG-3' e o *primer* *Msp* I - *Hpa* II + GTCA gerou no genoma a sequência 5'- CCGGTCA -3' (Figura 10). A análise dos *motifs* recuperados indicou que uma das sequências produzidas pelo corte enzimático (5'-TGACCGG-3') foi verificada ao longo do *motif* atribuído à família LFY (TATT**CGACCGG**CGGTCAATA). A proteína **Sme2.5_00125.1_g00013.1** de *S. melongena* foi anotada a partir de dados experimentais gerados pelo método SELEX na espécie *A. thaliana* (Gene AT5G61850; Swiss-Prot ID: LFY_ARATH), assim como as informações de todos os 282 TFs da espécie presentes no banco de dados. Ambas as proteínas apresentam a mesma arquitetura de domínios funcionais (*DNA Binding Domain (C-terminal) Leafy/Floricaula*; Pfam ID: PF17538.2 e *Floricaula / Leafy protein SAM domain*; Pfam ID: PF01698) e o alinhamento global (Needle) revelou que as duas compartilham 55,8% de identidade (relacionado à homologia da sequência) e 65,5% de similaridade (relacionado às funções da sequência), reforçando sua proximidade.

Figura 10 - Reconstrução do *motif* formado pelo sítio de corte 5'-CCGG-3' e o *primer* *Msp* I - *Hpa* II + GTCA



Legenda: O sítio 5'-CCGGTCA-3' ocorre da posição 10-16. O tamanho das letras estabelece uma relação direta com a probabilidade de uma determinada base ocorrer em determinada posição.

8 DISCUSSÃO

A metilação de DNA é o mecanismo epigenético mais estudado e melhor descrito em eucariotos (MIGUEL; MARUM, 2011; SMITH; MEISSNER, 2013). O padrão de metilação varia de acordo com o momento fisiológico do organismo, sendo responsivo a diversos fatores, tais como processos morfogênicos e fatores ambientais bióticos e abióticos. Na cultura de tecidos vegetais, as condições de estresse às quais materiais *in vitro* são submetidos também podem influenciar diretamente a regulação da expressão gênica por alterações no padrão de metilação de DNA (DE-LA-PEÑA et al., 2012). Deste modo, mudanças observadas nos padrões de metilação de DNA durante processos morfogênicos *in vitro* são bons indicadores da modulação de genes inerentes a cada via de regeneração.

Neste trabalho, o MSAP foi escolhido por ser uma ferramenta de baixo custo, versátil e eficiente para a detecção de alterações sítio-específicas nos padrões de metilação de DNA, detectados por meio de endonucleases de restrição sensíveis à metilação. O material vegetal foi derivado de sementes de uma cultivar comercial de berinjela, para a qual se espera pouca variação polimórfica. Para excluir estes polimorfismos, foram utilizados *pools* de amostras.

Para a realização das análises, foram necessários alguns ajustes nas condições de pré-corrída e corrída eletroforética do protocolo de MSAP desenvolvido por Pacheco e colaboradores (2008). O tempo de pré-corrída foi aumentado para 60 minutos e os tampões foram aquecidos previamente, com o objetivo de obter maior homogeneidade na temperatura da placa. O tempo de corrída foi reduzido de 2:45h para 1:45h, visto que ,ao final desse período, as bandas já estavam satisfatoriamente separadas.

As taxas de cada tipo de evento de metilação de DNA (metilação completa, metilação interna e externa e demetilação) variam de acordo com a espécie utilizada, genótipo, tipo de explante, estado fisiológico e condições físicas (RATHORE; MASTAN; AGARWAL, 2015). Em cotilédones de berinjela e nos dois diferentes tipos calos formados, o evento de metilação completa foi o mais observado, com diferenças em torno de 15% para o segundo evento mais frequente (demetilação). As taxas de metilação de DNA obtidas para cada via estão próximas às descritas para linhagens organogênicas (MAURY et al., 2012) e embriogênicas

(MONJA-MIO et al., 2018) de outras espécies vegetais. Assim como em outros organismos multicelulares complexos, níveis mais altos de metilação podem indicar um controle mais eficiente da ação de transposons e retrotransposons, que são muito frequentes em plantas (MIGUEL; MARUM, 2011), além de uma regulação adicional para controlar o desenvolvimento de diferentes tipos celulares (WANG et al., 2012).

Os marcadores CAG/GTCA.1, CAT/GTCA.2, CAT/GTCA.3, CAT/GTCA.4, CAT/GTCA.5, CAT/GTCA.6, AGA/AAAG.1, AGA/AAAG.3, AGA/ACCA.1 e AGA/ACCA.2 apresentaram-se estáveis durante o desenvolvimento no tecido embriogênico e, portanto, foram classificados como exclusivos de organogênese. Por outro lado, CAG/GTCA.1 e CAT/GTCA.3 apresentaram padrão demetilado no início e ao fim do desenvolvimento de calos, podendo ser úteis para a análise dos genes expressos durante esse período. As combinações CAT/GTCA.4, AGA/AAAG.1 e AGA/AAAG.3 apresentaram padrão demetilado no início da cultura, portanto podem estar associados a regiões gênicas expressas em tecidos diferenciados e no início da formação de calos. Todos os marcadores obtidos com os conjuntos de *primers* CAT x GTCA e AGA x ACCA foram classificados como organogênicos e, portanto, estes *primers* são indicados para a identificação e obtenção de marcadores e genes relacionados com o processo organogênico em berinjela.

O marcador CAG/GTCA.11 foi classificado como exclusivo de embriogênese, já que manteve seu padrão de metilação inalterado no tecido organogênico. No padrão de metilação do tecido embriogênico, o marcador apresentou alterações na posição do grupo metila no início e meio do desenvolvimento, até permanecer totalmente metilado no período final de cultura. A obtenção de marcadores organogênicos e embriogênicos exclusivos aponta a possibilidade de utilização da técnica de MSAP como diagnóstico na diferenciação de tecidos organogênicos e embriogênicos de berinjela. Além disso, a presença de marcadores exclusivos permite o posterior isolamento e sequenciamento destes fragmentos para identificação de genes putativos ligados ao desenvolvimento de cada via separadamente.

Os marcadores classificados como “D” (diferenciais) apresentam padrão de metilação distinto entre os tecidos analisados, porém, ao contrário dos marcadores “O” e “E”, possuem variações nos padrões de metilação em ambas as vias. Os

conjuntos de marcadores CAG/GTCA.4 e CAG/GTCA.9, CAG/GTCA.5 e CAG/GTCA.6, e CAG/GTCA.7, CAG/GTCA.8 e CAG/GTCA.10 apresentaram o mesmo padrão de metilação, podendo estar envolvidos com a regulação de um mesmo grupo de genes ou de uma mesma via de regeneração.

O maior número de modificações de padrão de metilação entre os tecidos organogênico e embriogênico foi observado após sete dias de cultura, apresentando 24 modificações, seguido dos tempos de 14, 10 e 0 dias, com 23, 16 e 6 alterações, respectivamente. No 7º dia de cultura, observou-se em ambos os calos um aumento significativo nos níveis de metilação. No sistema de indução simultânea de calos utilizado neste trabalho, no oitavo dia de cultura foi observada a formação de centros meristemáticos, de mesma origem celular (MERHY, 2009). Para a formação de centros meristemáticos, é necessário que parte do tecido cotiledonar se desdiferencie para recuperar sua totipotência. Para isso, um dos processos necessários é a ocorrência de uma reprogramação epigenética. Deste modo, as células em processo de desdiferenciação perderiam marcadores epigenéticos presentes no genoma das células do tecido original (SMULDERS; DE KLERK, 2011). Assim como o observado neste trabalho, já foi reportado na literatura que o processo de desdiferenciação é acompanhado por um aumento nas taxas de metilação (FRAGA; RODRIGUEZ; CANAL, 2002; CAUSEVIC et al., 2005), possivelmente envolvidas com a repressão de genes ativos no explante inicial.

Nos calos organogênicos, foi observado um aumento das taxas de demetilação e metilação externa, assim como a diminuição da metilação completa, após 10 dias de cultura. O aumento dos níveis de demetilação pode estar relacionado à alta taxa mitótica observada nesse período (MERHY, 2009). Tecidos com alta atividade mitótica podem apresentar redução das taxas de metilação, devido à perda transitória dos grupos metila durante a replicação. No 14º dia de cultura ainda são observadas altas taxas de demetilação, porém o número de eventos de metilação completa permaneceu estável em relação ao 10º dia. A estabilidade dos níveis de metilação e a alta taxa de demetilação podem estar associadas à necessidade de mais genes ativos para a formação de conjuntos de feixes vasculares e para o desenvolvimento indireto de gemas observado nessa fase (MERHY, 2009).

Ao contrário do observado na organogênese, calos embriogênicos apresentaram uma pequena redução nos níveis de metilação e demetilação, após

10 dias de cultura. Entretanto, como a formação de embriões somáticos no modelo utilizado ocorre em torno do 10º dia de cultura (MERHY, 2009), era esperado um aumento dos níveis de demetilação e uma redução da metilação, de forma semelhante ao observado na embriogênese de *Agave fourcroydes* (MONJA-MIO et al., 2018) e *Eleuteroccus senticosus* (CHAKRABARTY; YU; PAEK, 2003) obtida em resposta ao 2,4-D. A utilização de 5-azacitidina, uma substância demetilante, em culturas de *Acca sellowiana* com 2,4-D também já foi relacionada à indução de embriões somáticos (FRAGA et al., 2012). É possível que o uso de BAP ao invés de auxinas na indução de calogênese neste trabalho tenha sido responsável pela redução mais discreta nos níveis de demetilação, ao contrário do observado com auxinas. Resultados semelhantes de reduções discretas das taxas de metilação utilizando BAP foram obtidos em embriões zigóticos de *Castanea sativa* cultivados meio suplementado com 2,4-D e BAP por três semanas, sendo observada uma redução de 2,5% nos níveis de metilação no início da formação do embrião (VIEJO et al., 2010). No período de 14 dias, ocorreu um aumento expressivo nos eventos de metilação, atingindo 16,62% de metilação completa, ao contrário do observado nos calos organogênicos. Um aumento nos níveis de metilação também foi observado durante a formação do eixo embrionário em cultura de embriões zigóticos de *Castanea sativa* após sua transferência de meio de cultura suplementado com 2,4-D e BAP para meio de cultura contendo somente BAP (VIEJO et al., 2010), atingindo valores de metilação global similares.

Os *primers* com maiores números de bandas e qualidade de amplificação possuíam a citosina como primeira base seletiva. Este resultado é um possível indicador de que a composição do genoma de berinjela possui maior proporção de citosinas e guaninas do que timinas e adeninas. O par de *primers* *EcoR* I + CAG x *Msp* I - *Hpa* II + GTCA produziu o maior número de bandas (188) e proporção de bandas variáveis (22) na comparação de calos organogênicos e embriogênicos. O bom desempenho observado neste conjunto comparado aos outros *primers* testados pode estar associado à presença de mais de uma configuração de *motif* de metilação no fragmento, além dos sítios de clivagem de *EcoR* I (5'-GAATTC-3') e *Msp* I/*Hpa* II (5'-CCGG-3'). Sítios de metilação de DNA possuem três tipos de configurações possíveis, sendo CG, CHG ou CHH, no qual N = A, T ou C. A presença de mais de um *motif* de metilação pode indicar regiões com maior influência da metilação em sua regulação.

Analisando-se o padrão de metilação exclusivamente dos *primers EcoR I + CAG x Msp I - Hpa II + GTCA* ao longo do tempo de cultivo, pode-se observar uma dinâmica particular em cada tipo de calo. No período entre 10 e 14 dias de cultura, observa-se o aumento dos eventos de demetilação nos calos organogênicos e aumento dos eventos de metilação completa nos calos embriogênicos. Essa oposição de padrões pode indicar necessidades específicas de expressão/repressão de genes em cada via de regeneração. Considerando-se o número total de bandas, proporção de polimorfismos e a obtenção de padrão de metilação específico para calos de cada via de regeneração, o conjunto de *primers EcoR I + CAG x Msp I - Hpa II + GTCA* torna-se um forte candidato a ser utilizado em análises de expressão gênica em tecidos organogênicos e embriogênicos.

O *primer Msp I - Hpa II + GTCA* compreende no genoma a região 5'-CCGGTCA-3'. Essa sequência de bases abrange parte da sequência de ligação ao DNA da família de proteínas LFY (LEAFY), que é exclusiva em plantas e atua como fator de transcrição de um gene com o mesmo nome (WILLIAM et al., 2004). A proteína LFY se liga diretamente ao domínio gênico FLO/LFY (JIN et al., 2017), formado pelo gene *LEAFY* (LFY) e seu homólogo *FLORICAULA*. Em *Arabidopsis thaliana* o domínio FLO/LFY possui função homeótica, regulando genes responsáveis pelo desenvolvimento do meristema apical, diferenciação floral e mudança de identidade de meristema floral (diferenciação de alguns órgãos florais como pétalas, sépalas, carpelos e estames) (WILLIAM et al., 2004). A ligação do fator de transcrição LFY ao domínio FLO/LFY, regula a expressão de genes A, B e C, que são conjuntos de genes que se expressam em locais específicos do meristema floral, portanto cada grupo terá maior ou menor influência sobre a formação de determinado órgão floral de acordo com sua distribuição (ESPINOSA-SOTO; PADILLA-LONGORIA; ALVAREZ-BUYLLA, 2004). O conjunto A, constituído dos genes *APETALA1* e *APETALA2*, está envolvido na formação de sépalas e pétalas; o grupo B, formado por *APETALA3* e *PISTILLATA*, atua na formação de estames e pétalas; e o grupo C composto pelo gene *AGAMOUS*, tem função na diferenciação de carpelos e estames (ESPINOSA-SOTO; PADILLA-LONGORIA; ALVAREZ-BUYLLA, 2004). A amplificação utilizando o *primer Msp I - Hpa II + GTCA* que compreende o *motif 5'-CCGGTCA-3'* no genoma de cotilédones, calos organogênicos e embriogênicos de berinjela indica a possível amplificação de regiões gênicas reguladas pelo domínio FLO/LFY em outros tipos de meristemas,

possivelmente envolvidas com a diferenciação celular. Em *Vitis vinifera*, foi observada a expressão de *VFL* (ortólogo de *FLO/LFY*) em regiões meristemáticas independente do seu destino celular, sugerindo que *VFL* não atua somente em especificações de meristema floral, mas como na manutenção da indeterminação tecidual antes da rediferenciação de meristemas apicais (CARMONA; CUBAS; MARTÍNEZ-ZAPATER, 2002). Em *Solanum lycopersicum*, os genes *NAM/CUC3*, que estão expressos na base do primórdio foliar, realizam um loop regulatório com *KNOXI/LFY-like*, indicando uma correção no controle da formação de folhas novas (BLEIN et al., 2008). Em tabaco, o gene *UNIFOLIATA (NFL)*, homólogo de *FLO/LFY*, está expresso em tecidos vegetativos, sugerindo que *NFL* também tem papel na determinação de folhas (HOFER et al., 1997). Desta forma, é possível que genes homólogos a *FLO/LFY* sejam identificáveis a partir da combinação de *primers EcoR I + CAG x Msp I - Hpa II + GTCA*. Utilizando os protocolos de recuperação de bandas desenvolvidos é possível localizar estas regiões e utilizando o padrão de metilação do seu fragmento fornecido pela MSAP, inferir sua atividade em cada tipo de tecido analisado.

A utilização do MSAP em conjunto como o sequenciamento de fragmentos é uma abordagem recente da técnica. Além de possibilitar a inferência do nível de atividade dos genes presentes em um determinado fragmento por meio do padrão de metilação, a combinação destas técnicas permite a amplificação e identificação dos *amplicons* de interesse. Já foram realizados estudos relacionando modificações epigenéticas com variações genéticas, fatores ambientais e traços fenotípicos em *Prunus mume*, sendo observado que alguns marcadores estavam ligados com o formato de folhas e o metabolismo energético (MA et al., 2018). Foram também identificadas sequências similares a dois genes (*LACERATA* e *TREALOSE-6-FOSFATO SINTASE S4*) envolvidos com resposta ao estresse em fragmentos com alterações no padrão de metilação obtidos de cultivares de *Colza* sensíveis e resistentes à seca (MARCONI et al., 2013). Além disso, o MSAP associado ao NGS (sequenciamento de nova geração) foi utilizado para a identificação de regiões diferencialmente metiladas em somaclones e para a avaliação da capacidade de fatores que provocam variações somaclonais em duas cultivares estáveis de trigo. Foi identificado que elementos transponíveis são os fatores que tem maior probabilidade de causar alterações somaclonais em plantas (BARÁNEK et al., 2016). Deste modo, o sequenciamento de fragmentos que apresentaram diferenças

no padrão de metilação em calos organogênicos e embriogênicos de berinjela poderá resultar na identificação de regiões gênicas envolvidas nas duas vias morfogênicas estudadas neste trabalho.

Com base nos resultados aqui obtidos, pode-se também propor a amplificação direcionada de fragmentos, utilizando *primers* específicos para regiões gênicas de interesse, como outra forma de utilização da técnica de MSAP. A partir de fragmentos ou do genoma completo de referência disponível em bancos de dados, é possível incluir o *motif* de interesse na sequência dos *primers* da amplificação seletiva, para atuar como nucleotídeos de seleção. Essa abordagem poderá fornecer informações sobre o estado de metilação das regiões com o *motif* selecionado, possibilitando a inferência do nível de expressão da região gênica em questão. Dessa forma, a partir dos dados obtidos neste trabalho com a reconstrução de sequência genômica correspondente à região de corte de seleção +3 do *primer Msp I - Hpa II + GTCA* e busca em banco de dados, essa abordagem poderá ser aplicada utilizando-se o mesmo conjunto de *primers* para a amplificação de regiões com o domínio de ligação de proteínas da família LFY, aumentando a chance de localização de genes sob sua regulação.

Neste estudo, a técnica de MSAP foi utilizada para a avaliação de padrões de metilação de DNA em calos embriogênicos e organogênicos gerados a partir de cotilédones de berinjela. Foram observadas diferenças de padrão de metilação de DNA ao longo do desenvolvimento dos dois tipos de calo, as quais foram relacionadas à análise anatômica da evolução das duas vias, realizada em trabalhos anteriores do grupo (MERHY, 2009). O estudo comparativo dos padrões de metilação de DNA de calos organogênicos e embriogênicos, evidenciou diferenças significativas entre as duas vias de regeneração. O conjunto de *primers EcoR I + CAG x Msp I - Hpa II + GTCA* apresentou o melhor desempenho entre as 19 combinações testadas, produzindo o maior número de bandas e marcadores. Utilizando a sequência do *primer Msp I - Hpa II + GTCA* foi possível localizar na literatura e em bancos de dados que a sequência 5'-CGGTCA-3' corresponde ao sítio de ligação ao DNA de um fator de transcrição LFY, identificado em *thaliana*, responsável pela regulação do domínio FLO/LFY, que pode estar envolvido direta ou indiretamente com os processos *in vitro* de berinjela.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A metodologia de MSAP foi eficiente na detecção de mudanças de padrão de metilação ao longo da cultura de calos organogênicos e embriogênicos e na comparação de tecidos e calos de *Solanum melongena*;
- Calos organogênicos e embriogênicos apresentaram padrões de metilação específicos para cada via, especialmente após o 10^o dia de cultura;
- O conjunto de *primers* *EcoR* I + CAG x *Msp* I – *Hpa* II + GTCA apresentou a melhor qualidade de amplificação e maior número de polimorfismos durante as análises;
- A técnica de MSAP pode ser utilizada de modo direcionado, por meio da construção dos *primers* da etapa de amplificação seletiva com *motifs* de interesse, permitindo a inferência de atividade de expressão gênica no fragmento.

PERSPECTIVAS

- Isolamento de marcadores de interesse utilizando o conjunto de *primers EcoRI + CAG x Msp I – Hpa II + GTCA*;
- Amplificação e sequenciamento dos marcadores utilizando os protocolos de reamplificação de bandas;
- Identificação das regiões genômicas ligadas aos marcadores selecionados.

REFERÊNCIAS

AFELE, J.C.; TABELI, Y.; YAMADA, T.; MOMIYAMA, T.; TAKAIWA, F.; KAYANO, T.; NISHIMURA, S.; NISHIO, T. Identification of mRNAs differentially expressed between embryogenic and non-embryogenic cultivars of eggplant during somatic embryogenesis. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 30, n. 3, p. 175-179, 1996.

ALI, M.; OKUBO, H.; KUNIMITSU, F. *In vitro* multiplication of intra and interspecific *Solanum* hybrids through somatic embryogenesis and adventitious organogenesis. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 60, p. 601-612, 1991.

ALICCHIO, R.; DEL GROSSO, E.; BOSCHIERI, E. Tissue culture and plant regeneration from different explants in six cultivars of *Solanum melongena*. **Experimentia**, v. 38, p. 449-450, 1982.

AL-LAWATI, A.; AL-BAHRY, S.; VICTOR, R.; AL-LAWATI, A.H.; YAISH, M.W. Salt stress alters DNA methylation levels in alfalfa (*Medicago spp*). **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.1, 15018299, 2016.

ALONSO, C.; PÉREZ, R.; BAZAGA, P.; MEDRANO, M.; HERRERA, CM. MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild growing species. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 1 p. 80-90, 2015.

ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Cerrados - Documentos (INFOTECA-E)**, 2002.

BANNO, H.; IKEDA, Y.; NIU, Q-W.; CHUA, N-H. Overexpression of *Arabidopsis* ESR1 induces initiation of shoot regeneration. **Plant Cell**, v. 13, p. 2609-2618, 2001.

BARAÂNEK, M.; ČECHOVAÂ, J.; KOVACS, T.; EICHMEIER, A.; WANG, S.; RADDOVAÂ, J.; NEČAS4, N.; YE, X. Use of Combined MSAP and NGS Techniques to Identify Differentially Methylated Regions in Somaclones: A Case Study of Two Stable Somatic Wheat Mutants. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, e0165749, 2016.

BAURENS, FC.; NICOLLEAU J.; LEGAVRE, T.; VERDEIL, JL.; MONTEUUIS, O. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. **Tree Physiology**, v. 24, n. 4, p. 401–407, 2004.

BERJAK, P; TIJAN, M; TAHA, RM. An *in vitro* production and field transfer protocol for *Solanum melongena* L. plants. **South African Journal of Botany**, v. 68, n. 4, p. 447-450, 2002.

BHAT, S. V.; JADHAV, A.S.; PAWAR, B. D.; KALE, A. A.; CHIMOTE, V.P.; PAWAR, S. V. *In vitro* shoot organogenesis and plantlet regeneration in brinjal (*Solanum melongena* L.). **The bioscan**, v. 8, n. 3, p. 821-824, 2013.

BHUTANI, N.; BURNS, D.M.; BLAU, H.M. DNA Demethylation Dynamics. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 866-872, 2011.

BIRNBAUM, K.D.; ROUDIER, F. Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants. **Regeneration**, v. 4, n. 1, p. 15-20, 2017.

BLEIN, T.; PULIDO, A.; VIALETTE-GUIRAUD, A.; NIKOVICS, K.; MORIN, H.; HAY, A.; JOHANSEN, I.E.; TSIANTIS, M.; LAUFS, P. A Conserved molecular framework for compound leaf development. **Science**, v. 322, p. 1835-1839, 2008.

BOUTILIER, K.; OFFRINGA, R.; KIEFT, H.; QUELLET, T.; ZHANG, L.; HATTORI, J.; JIU, C.; LAMMEREN, A. M.; MIKI, B. L. A.; CUSTERS, J.B.M.; CAMPAGNE, M.M.I. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryogenic growth, **The Plant Cell**, v. 14, p. 1737-1749, 2002.

BRAUTIGAM, K.; VINING, K.J.; LAFON-PLACETTE, C.; FOSSDAL, C.G.; MIROUZE, M.; MARCOS, J.G.; FLUCH, S.; FRAGA, M.F.; GUEVARA, M.A.; ABARCA, D.; JOHNSEN, Ø.; MAURY, S.; STRAUSS, S.H.; CAMPBELL, M.M.; ROHDE, A.; DÍAZ-SALA, C.; CERVERA, M-T. Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 2, p. 399–415, 2013.

BRAVO, S.; BERTÍN, A.; TURNER, A.; SEPÚLVEDA, F.; JOPIA, P.; PARRA, M.J.; CASTILLO, R.; HASBÚN, R. Differences in DNA methylation, DNA structure and embryogenesis-related gene expression between embryogenic and non embryogenic lines of *Pinus radiata* D. don. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, n. 3, p. 521–529, 2017.

BUCHERNA, N.; SZABÓ, E.; HESZKY, L.E.; NAGY, I. DNA methylation and gene expression differences during alternative *in vitro* morphogenetic processes in eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 37, n. 5, p. 672–677, 2001.

CARMONA, M.J.; CUBAS, P.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. **Plant Physiology**, v. 130, n. 1, p. 68-77, 2002.

CASTILLO, N.R.F.; BASSIL, N.V.; WADA, S.; REED, B.M. Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, n. 3, p. 246-256, 2010.

CAUSEVIC, A.; DELAUNAY, A.; OUNNAR, S.; RIGHEZZA, M.; DELMOTTE, F.; BRIGNOLAS, F. HAGÈGE, D.; MAURY, S. DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 681–691, 2005.

CAUSEVIC, A.; GENTIL, M.; DELAUNAY, A.; EL-SOUD, W. A.; GARCIA, Z.; PANNETIER, C.; BRIGNOLAS, F.; HAGÈGE, D.; MAURY, S. Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines. **Planta**, v. 224, n. 4, p. 812-827, 2006.

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

CHALHOUB, BA.; THIBAUT, S.; LAUCOU, V.; RAMEAU, C.; HÖFTE, H.; COUSIN, R. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 22, n. 2, p. 216-218, 1997.

CHEN, L.; TONG, J.; XIAO, L.; RUAN, Y.; LIU, J.; ZENG, M.; HUANG, H.; WANG, J-W.; XU, L. YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 14, p. 4273–4284, 2016.

CHEN, T.; Li, E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 60, p. 55–89, 2004.

CHEN, Y.T.; SHEN, C.H.; LIN, W.D.; CHU, H.A.; HUANG, B.L.; KUO, C.I.; YEH, K.W.; HUANG, L.C.; CHANG, I.F. Small RNAs of *Sequoia sempervirens* during rejuvenation and phase change. **Plant Biology**, v. 15, n.1, p. 27–36, 2013.

CID, LPB.; TEIXEIRA, JB. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. *In*: CID, L.P. Cultivo *in vitro* de plantas. **EMBRAPA**, 3ª edição, 325 p., 2014.

DANN, A. L; WILSON, C. R. Comparative assessment of genetic and epigenetic variation among regenerants of potato (*Solanum tuberosum*) derived from long-term nodal tissue-culture and cell selection. **Plant Cell Reports**, v. 30, n.4, p. 631–639, 2011.

DE-LA-PENA, C.; NIC-CAN, G.; OJEDA, G.; HERRERA-HERRERA, J.; LOPEZ-TORRES, A; WROBEL, K.; ROBERT-DIAZ, M. *KNOX1* is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave spp.* **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 203, 2012.

DELLAPORTA, S.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DELPORTE, F.; PRETOVA, A.; DU JARDIN, P.; WATILLON, B. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. **Protoplasma**, v. 251, p. 1455-1470, 2014.

DORNELAS, MC.; VIEIRA, MLC. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 36, p. 211–221, 1994.

DU, J.; JOHNSON, LM.; JACOBSEN, SE.; PATEL, DJ. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, p. 519-532. 2015.

ELHITI, M.; HEBELSTRUP, K. H.; WANG, A.; LI, C.; CUI, Y.; HILL, R. D.; STASOLLA, C. Function of type-2 *Arabidopsis* hemoglobin in the auxin-mediated

formation of embryogenic cells during morphogenesis. **Plant Journal**, v. 74, n. 6, p. 946-958, 2013.

ESPINOSA-SOTO, C.; PADILLA-LONGORIA, P.; ALVAREZ-BUYLLA, ER. A gene regulatory network model for cell-fate determination during *Arabidopsis thaliana* flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. **The Plant Cell**, v. 16, n.11, p. 2923-2939, 2004.

FAN, H.; ZHAO, Z. J.; CHENG, J.; SU, X. W.; WU, Q. X.; SHAN, Y. F. Overexpression of DNA methyltransferase 1 and its biological significance in primary hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 16, p. 2020-2026, 2009.

FANTAPPIÉ. Epigenética e Memória Celular. **Revista Carbono**, n. 3, 2013.

FENG, S.; COKUS, S. J.; ZHANG, X.; CHEN, P.; BOSTICK, M.; GOLL, M. G.; HETZEL, J.; JAIN, J.; STRAUSS, S. H.; HALPERN, M. E.; UKOMADU, C.; SADLER, K. C.; PRADHAN, S.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S. E. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. **Proceedings of the National Academy of United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8689–8694, 2010a.

FENG, S.; JACOBSEN, S. E.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. **Science**, v. 330, n. 6004, p. 622–627, 2010.

FINNEGAN, E.J; KOVAC, K.A. Plant DNA methyltransferases. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 189–201, 2000.

FLETCHER, J. C. Coordination of cell proliferation and cell fate decisions in the angiosperm shoot apical meristem. **BioEssays**, v. 24, p. 27 – 37, 2002.

FOBERT, P. R.; WEBB, D. T. Effect of polyamines, polyamine precursors, and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena* L.) cotyledons. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, p. 1734-1742, 1988.

FRAGA, HPF.; VIEIRA, LN.; CAPRESTANO, CA.; STEINMACHER, DA.; MICKE, GA.; SPUDEIT, DA.; PESCADOR, R.; GUERRA, MP. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 12, p. 2165, 2012.

FRAGA, M.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. Genomic DNA methylation–demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. **Tree Physiology**, v. 22, p. 813-816, 2002.

FRANKLIN G.; SHEEBA C. J.; LAKSHMI SITA G. Regeneration of eggplant from root explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant**, v. 40, p. 188-191, 2004.

FUERST, R.; SONI, R.; MURRAY, JAH.; LINDSEY, K. Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1023-1033, 1996.

FULNEČEK, J.; KOVAŘÍK, A. How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? **BMC Genetics**, v. 15, p. 2-9, 2014.

GAO, X.; YANG, D.; CAO, D.; AO, M.; SUI, X.; WANG, Q.; KIMATU, J. N.; WANG, L. *In vitro* micropropagation of *Freesia hybrida* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, n. 3, p. 257–267, 2010.

GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 47–54, 2011.

GAYOSSO-GÓMEZ, L.V.; SALINAS-SILVA, L.C.; ZÁRRAGA-GRANADOS, G.; RAMÍREZ-SALAZAR, E.G.; ORTIZ-QUINTERO, B. MicroRNAs como herramienta potencial para el diagnóstico del mesotelioma pleural malign. **Neumología y Cirugía de Tórax**, v. 72, n. 2, p. 175-181, 2013.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G. Plant tissue culture procedure-background. *In: Plant propagation by tissue culture*. **Springer Netherlands**, p. 1-28, 2008.

GIMENEZ, M. D.; YAÑEZ-SANTOS, A. M.; CRISTINA PAZ, R. C.; QUIROGA, M. P.; MARFIL, C. F.; CONCI, V. C.; GARCÍA-LAMPASONA, S. C. Assessment of genetic and epigenetic changes in virus-free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by meristem culture followed by *in vitro* propagation. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 11, p. 129–141, 2016.

GISBERT, C.; PROHENS, J.; NUEZ, F. Efficient regeneration in two potential new crops for subtropical climates, the scarlet (*Solanum aethiopicum*) and gboma (*S. macrocarpon*) eggplants. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 34, p. 55-62, 2006.

GLEDDIE, S.; KELLER, W.A.; SETTERFIELD, G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension derived protoplasts of *Solanum melongena*. **Canadian Journal of Botany**, v. 64, p. 355-361, 1986.

GONZÁLEZ, A. I.; SÁIZ, A.; ACEDO, A.; RUIZ, M. L.; POLANCO, C. Analysis of genomic DNA methylation patterns in regenerated and control plants of rye (*Secale cereale* L.). **Plant Growth Regulation**, v. 70, n. 3, p. 227–236, 2013.

GRZYBKOWSKA, D.; MOROŃCZYK, J.; WÓJCIKOWSKA, B.; GAJ, M. D. Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. **Plant Growth Regulation**, v. 85, p. 243–256, 2018.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Apostila de Biotecnologia, **CCA/UFSC**, Edição Steinmacher, 2006.

HA, M.; KIM, VN. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 509–524, 2014.

HABIB, M.A.; MUKTADIR, M.A.; KABIR, M.R.; MIAN, M.; AKHOND, M. Optimization of somatic embryogenesis protocol for locally adapted eggplant (*Solanum melongena* L.) Varieties in bangladesh. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 77-83, 2016.

HANAI, L.R.; FLOH, E.I.S.; FUNGARO, M.H.P.; SANTA-CATARINA, C.; DE PAULA, FM; VIANA, AM.; VIEIRA, MLC. Methylation patterns revealed by MSAP profiling in genetically stable somatic embryogenic cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 368–377, 2010.

HANYU, H.; MURATA, A.; PARK, E.Y.; OKABE, M.; BILLINGS, S.; JELENKOVIC, G.; PEDERSEN, H.; CHIN, C-K. Stability of luciferase gene expression in a long term period in transgenic eggplant *Solanum melongena*. **Plant Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 403-407, 1999.

HAO, YJ.; DENG, XX. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, n. 3, p. 253–260, 2003.

HASHEMI-PETROUDI, SH.; NEMATZADEH, G.; ASKARI, H.; GHAHARY, S. Involvement of Cytosine DNA methylation in different developmental stages of *Aeluropus littoralis*. **Journal of Plant Molecular Breeding**, v. 2, n. 2, p. 56-67, 2014.

HECK, GR.; PERRY, SE.; NICHOLS, KW.; Fernandez, DE. AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. **Plant Cell**, v. 7, p. 1271–1282, 1995.

HOFER, J.; TURNER, L.; HELLENS, R.; AMBROSE, M.; MATTHEWS, P.; MICHAEL, A.; ELLIS, N. *UNIFOLIATA* regulates leaf and flower morphogenesis in pea. **Current biology**, v. 7, n. 8, p. 581-587, 1997.

HOSSAIN, M. J.; RAHMAN, M.; BARI, M. A. Establishment of cell suspension culture and plantlet regeneration of brinjal (*Solanum melongena* L.). **Journal of Plant Sciences**, v. 2, p. 407-415, 2007.

HU, X.; XU, L. Transcription Factors WOX11/12 Directly Activate WOX5/7 to Promote Root Primordia Initiation and Organogenesis. **Plant Physiology**, v. 172, n. 4, p. 2363-2373, 2016.

HWANG, I.; SHEEN, J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* - cytokinin signal transduction. **Nature**, v. 413, p. 383-389, 2001.

IKEDA, M.; UMEHARA, M.; KAMADA, H. Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. **Plant biotechnology**, v. 23, p.153-161, 2006.

IKEUCHI, M.; IWASE, A.; RYMEN, B.; HARASHIMA, H.; SHIBATA, M.; OHNUMA, M.; BREUER, C.; MORAO, AK.; DE LUCAS, L.; DE VEYLDER, L.; GOODRICH,

J.; BRADY, S.M.; ROUDIER, F.; SUGIMOTO, K. PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in *Arabidopsis*. **Nature Plants**, v. 1, 15089, 2015.

INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, v. 409, p. 1060-1063, 2001.

IRVINE, R. A.; LIN, I. G.; HSIEH, C. DNA methylation has a local effect on transcription and histone acetylation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 19, p. 6689–6696, 2002.

JIN, J.; TIAN, F.; YANG, D-C.; MENG, Y-Q.; KONG, L.; LUO, L.; GAO, G. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. **Nucleic Acids Research**, v.45, n. D1, p. D1040–D1045, 2017.

JULLIEN, PE.; BERGER, F. DNA methylation reprogramming during plant sexual reproduction? **Trends in Genetics**, 26, p. 394–399, 2010.

KACZMARCZYK, A.; HOUBEN, A.; KELLER, E.R.J.; METTE, M. F. Influence of cryopreservation on the cytosine methylation state of potato genomic DNA. **Cryoletters**, v. 31, p. 380–391, 2010.

KAKIMOTO, T. CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. **Science**, v. 274, p. 982-985. 1996.

KANNA, S. V.; JAYABALAN, N. Influence of n⁶-(2-isopentenyl) adenine on *in vitro* shoot proliferation in *Solanum melongena* L. **International Journal of Academic Research**, v. 2, n. 2, p. 98. 2010.

KANNA, S.V.; JAYABALAN, N. Regeneration via direct organogenesis from leaf segments of eggplant (*Solanum melongena* l.). **Journal of Plant Sciences**, v. 10, p. 90-98, 2015.

KAUR, S. M.; DHATT, A.; SANDHU, J.; SINGH, S. A.; SINGH, G. S. Effect of media composition and explant type on the regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 860-866, 2013.

KAUR, S.M.; DHATT, A.; SANDHU, J.; SATBIR, S.G. *In vitro* plant regeneration in brinjal from cultured seedling explants. **Indian Journal of Horticulture**, v. 68, n. 1, p. 61-65, 2011.

KINOSHITA, T.; SEKI, M. Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. **Plant Cell Physiology**, v. 55, n. 11, p. 1859–1863, 2014.

KOHLI, R.M.; ZHANG, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. **Nature**, v. 502, p. 472–479, 2013.

KREBS, J.; KILPATRICK, S.; GOLDSTEIN, E. Epigenetic effects are inherited. *In: Lewi's Genes XI*. **Jones & Bartlett learning**, 11^a edição, p. 840, 2014.

LANDEY, R.B; CENCI, A.; GEORGET, F.; BERTRAND, B.; CAMAYO, G.; DECHAMP, E.; HERRERA, JC.; SANTONI, S.; LASHERMES, P.; SIMPSON, J. High genetic and epigenetic stability in *coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by aflp, msap and the phenotypic variation rate. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, e56372, 2013.

LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; DUARTE, A. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas –Revisão, 2017.

LELJAK-LEVANIC, D.; BAUER, N.; MIHALJEVIC, S.; JELASKA, S. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. **Plant Cell Reports**, v. 23, n. 3, p. 120–127, 2004.

LE MOS, E. E. P. Organogênese. In: CID, L.P. Cultivo *in vitro* de plantas. **EMBRAPA**, 3ª edição, 325 p., 2014.

LIANG, D.; WHITE, R. G.; WATERHOUSE, P. M. Gene Silencing in *Arabidopsis* spreads from the root to the shoot, through a gating barrier, by template-dependent, nonvascular, cell-to-cell movement. **Plant Physiology**, v. 159, n. 3, p. 984–1000, 2012.

LIDDLE, R.A.; JIRTLE, R.L. Epigenetic silencing of genes in human colon cancer. **Gastroenterology**, v. 131, p. 960-962, 2006.

LIU, J.; SHENG, L.; XU, Y.; LI, J.; YANG, Z.; HUANG, H.; XU, L. WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 26, p. 1081–1093, 2014.

LOMBARDI, SP.; PASSOS, IRS.; NOGUEIRA, MCS.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Pasiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 239–247, 2007.

LOTAN, T.; OHTO, M.; YEE, KM.; WEST, MA.; LO, R.; KWONG, RW.; YAMAGISHI, K.; FISCHER, L.; GOLDBERG, RB.; HARADA, JJ. *Arabidopsis* LEAFYCYOTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. **Cell**, v. 93, p. 1195-1205, 1998.

LUCZAK M. W.; JAGODZIŃSKI, P. P. The role of DNA methylation in cancer development. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 44, p. 143-154, 2006.

MA, K.; SONG, Y.; JIANG, X.; ZHANG, Z.; LI, B.; ZHANG, D. Photosynthetic response to genome methylation affects the growth of Chinese white poplar. **Tree Genetics and Genomes**, v. 8, p. 1407–1421, 2012.

MA, K.; SUN, L.; CHENG, T.; PAN, H.; WANG, J.; ZHANG, Q. Epigenetic variance, performing cooperative structure with genetics, is associated with leaf shape traits in widely distributed populations of ornamental tree *Prunus mume*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 41, 2018.

MAGIOLI, C.; MANSUR, E. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. **Acta botanica brasílica**, v. 19, n. 1, p. 139-148, 2005.

MAGIOLI, C.; MARIA BARRÔCO, R.; ROCHA, C. A. B.; DOLORES DE SANTIAGO-FERNANDES, L.; MANSUR, E. Somatic embryo formation in *Arabidopsis* and eggplant is associated with the expression of glycine rich protein gene (*Atgrp-5*). **Plant Science**, v. 161, p. 559-567, 2001b.

MAGIOLI, C.; ROCHA, A.; DE OLIVEIRA, D.; MANSUR, E. Efficient shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 661-663, 1998.

MAGIOLI, C.; ROCHA, A.P.M.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Establishment of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system for eggplant and study of a potential biotechnologically useful promoter. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 43-49, 2000.

MAGIOLI, C.; ROCHA, A.P.M.; TARRÉ, E.; SANTIAGO-FERNANDES, L.D.; OLIVEIRA, D.E.; KRUL, W.R.; MANSUR, E. Effect of morphological factors, antibiotics and *Agrobacterium* co-cultivation in the efficiency of somatic embryogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Journal of Plant Biotechnology**, v.3, p.19-25, 2001a.

MARCONI, G.; PACE, R.; TRAINI, A.; RAGGI, L.; LUTTS, S.; CHIUSANO, M.; GUIDUCCI, M.; FALCINELLI, M.; BENINCASA, P.; ALBERTINI, E. Use of MSAP markers to analyse the effects of salt stress on dna methylation in Rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera*). **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, e75597, 2013.

MATSUOKA, H.; HINATA, K.; NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyls callus of *Solanum melongena* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, p. 363-370, 1979.

MAURY, S.; TRAP-GENTIL, M.; HÉBRARD, C.; WEYENSB, G.; DELAUNAYA, A.; BARNESB, S.; LEFEBVREB, M.; JOSEPHA, C. Genic DNA methylation changes during *in vitro* organogenesis: organ specificity and conservation between parental lines of epialleles. **Physiologia Plantarum**, v.146, n. 3, p. 321-335, 2012.

MERHY, THIAGO SAIDE. Estudo da resposta morfogênica *in vitro* em berinjela (*Solanum melongena* L.) Dissertação de mestrado submetida ao Programa de pós-graduação em Biologia Vegetal (UERJ), 2009.

MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. **Journal of experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, 2011.

MIR, K. A.; DHATT, A. S.; SANDHU, J. S.; GOSAL, S. S. Genotype, explant and culture medium effects on somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 49, p. 182-187, 2008.

MIR, K.A.; DHATT, A.S.; SANDHU, J.S.; SIDHU, A.S. Effect of genotype, explant and culture medium on organogenesis in brinjal. **Indian Journal Horticulture**, v. 68, n. 3, p. 332-335, 2011.

MOMIYAMA, T.; KAYANO, T.; AFELE, J.C.; TABEL, Y.; NISHIMURA, S.; TAKAIWA, F.; NISHIO, T.; TAKAYANAGI, K. Increased expression of antioncogene homolog and activation of retrotransposon during early phase of somatic embryonenesis in eggplant. **Plant Physiology**, v. 111, n. 2, p. 636-636, 1996.

MONJA-MIO, K. M.; QUIROZ-MORENO, A.; HERRERA-HERRERA, G.; MONTERO-MUÑOZ, J. L.; SÁNCHEZ-TEYER, F.; ROBERT, M. L. Analysis of two clonal lines (embryogenic and non-embryogenic) of *Agave fourcroydes* using AFLP and MSAP. **American Journal of Plant Sciences**, v. 09, n. 04, p. 745-762, 2018.

MONTEUUIS, O.; DOULBEAU, S.; VERDEIL, J. DNA methylation in different origin clonal offspring from a mature *Sequoiadendron giganteum* genotype. **Trees**, v. 22, p. 779–784, 2008.

MUKTADIR, A.; HABIB, MA.; MIAN, AK.; AKHOND, AY. Regeneration efficiency based on genotype, culture condition and growth regulators of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Agriculture and Natural Resources**, v. 50, n. 1, p. 38-42, 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MUTHUSAMY, A.; VIDYA, KS.; PRATIBHA, PK.; RAO, M.; RADHAKRISHNA VIDHU, SB.; GURUPRASAD, KP.; RAGHAVENDRA, U.; GOPINATH, PM.; SATYAMOORTHY, K. Establishment of an *in vitro* plantlet regeneration protocol for unique varieties of brinjal (*Solanum melongena* L.) var. Mattu Gulla and Perampalli Gulla. **Indian Journal of Experimental Botany**, v.52, n. 01, 2014.

NIC-CAN, GI.; LOPEZ-TORRES, A.; BARREDO-POOL, F.; WROBEL, K.; LOYOLA-VARGAS, VM.; ROJAS-HERRERA, R.; DE-LA-PENA, C. New insights into somatic embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, e72160, 2013.

OZAWA, S.; YASUTANI, I.; FUKUDA, H.; KOMAMINE, A.; SUGIYAMA, M. Organogenic responses in tissue culture of srdmutants of *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 125, p. 135-142, 1998.

PACHECO, G.; CARDOSO, S.R.S.; GAGLIARDI, R.F.; VALLS, J.F.M.; FERREIRA, P.C.G.; CARDOSO, M.A.; MANSUR, E. Genetic and epigenetic analyses of *in vitro*-grown plants of *Arachis villosulicarpa* Hoehne (Leguminosae) obtained from seed explants through different regeneration pathways. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 737–742, 2008.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R. F.; CARNEIRO, L.A.; CALLADO, C.H.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. The role of BAP in somatic embryogenesis induction from seed

explants of *Arachis* species from sections erectoides and procumbentes. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 88, p. 121-126, 2007.

PADMA, M. N.; RAVISHANKAR, G.A. *In vitro* propagation and genetic fidelity study of plant regenerated from inverted hypocotyl explants of eggplant (*Solanum melongena* L.) cv. Arka Shirish. **Biotechnology**, v. 3, p. 45–52, 2013.

PERRONE, D.; BICO, I.V.; ROTINO, G.L. Effect of gelling agents and activated charcoal on *Solanum melongena* plant regeneration. **Capsicum Newsletter**, v. 11, p. 43-44, 1992.

PICOLI, E.; OTONI, W.; ROBERTO, C. P.; FÁRI, M. Influence of antibiotics on NAA-induced somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Embú). **International Journal of Horticultural Science**, v. 6, p. 88-95, 2000.

PICOLI, E.A.T.; OTONI, W.C.; FIGUEIRA, M.L.; CAROLINO, S.M.B.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, E.A.M.; CARVALHO, C.R.; FONTES, E.P.B. Hyperhydricity *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, v. 160, n. 5, p. 857-868, 2001.

PlantTFDB 4.0. Plataforma de fatores de transcrição. <http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>, acessado em: 21/5/2019.

RAHMAN, M.; ASADUZZAMAN, M.; NAHAR ,N.; BARI, MA. Efficient plant regeneration from cotyledon and midrib derived callus in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Journal of Biological Sciences**, v. 14, p. 31-38, 2006.

RAO P.V.L.; SINGH, B. Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *Solanum melongena* L. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 7-11, 1991.

RATHORE, M. S; JHA, B. DNA methylation and methylation polymorphism in genetically stable *in vitro* regenerates of *Jatropha curcas* L. using methylation-sensitive AFLP markers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 1002–1014, 2016.

RATHORE, MS.; MASTAN, SG.; AGARWAL, PK. Evaluation of DNA methylation using methylation-sensitive amplification polymorphism in plant tissues grown *in vivo* and *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 1, p. 11–19, 2015.

REYNA-LÓPEZ, G. E.; SIMPSON, J.; RUIZ-HERRERA, J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. **Molecular and General Genetics**, v. 25, n. 6, p. 703-710, 1997.

ROBINSON, J. P.; SARANYA, S. An improved method for the *in vitro* propagation of *Solanum melongena* L. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 6, p. 299-306, 2013.

ROMYANON, K.; WATANA, K.; PICHAKUM, A.; MOSALEEYANON, K.; KIRDMANEE, C. Adjustment of medium composition and iso-osmotic potential in

direct-shoot organogenesis produces true-to-type oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantlets. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 58. n. 6, p. 601–612, 2017.

ROSA, Y.B.C.J.; BELLO, C.C.M.; DORNELAS, M.C. Species-dependent divergent responses to in vitro somatic embryo induction in *Passiflora* spp. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 120, p. 69-77, 2015.

ROUDIER, F.; TEIXEIRA, FK.; COLOT, V. Chromatin indexing in *Arabidopsis thaliana*: an epigenomic tale of tails and more. **Trends in Genetics**, v. 25, p. 511–517, 2009.

RUEBELT, MC.; LIPP, M.; REYNOLDS, TL.; SCHMUKE, JJ.; ASTWOOD, JD.; PENNA, DD.; ENGEL, K-H.; JANY, KD. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 3. Assessing unintended effects. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2169-2177, 2006.

RUEGGER, M.; DEWEY, E.; GRAY, W. M.; HOBBIE, L.; TURNER, J.; ESTELLE, E. The *TIR1* protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human *SKP2* and yeast *Grr1p*. **Genes and Development**, v. 12, n. 2, p. 198–207, 1998.

SAITO, T.; NISHIMURA, S. Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Plant Science**, v. 102, n. 2, p. 205-211, 1994.

SALIH, S. M. Plant regeneration from *in vitro* leaf and stem tissues of *Solanum nigrum*. **Agricultural Sciences**, v. 27, p. 64-71, 2000.

SALVATO, F.; I CARVALHO, MCGG. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.727-734, 2010.

SANGUINETTI, CJ.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, n. 5, p. 914-921, 1994.

SANTONI, V, BELLINI, C.; CABOCHE, M. Use of two-dimensional protein-pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. **Planta**, v. 192, p. 557-566, 1994.

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

SARKER, RH; YESMIN, S.; HOQUE, M.I. Multiple shoot formation in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 53-61, 2008.

SCHMIDT, ED.; GUZZO, F.; TOONEN, MA.; DE VRIES, SC. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v. 124, p. 2049-2062, 1997.

SCOCCIANI, V.; SGARBI, E.; FRATERNALE, D.; BIONDI, S. Organogenesis from *Solanum melongena* L. (eggplant) cotyledon explants is associated with hormonemodulated enhancement of polyamine biosynthesis and conjugation. **Protoplasma**, v. 211, p. 51-63, 2000.

SHARMA, P.; RAJAM, M.V. Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embryogenesis from different hypocotyl segments of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 146, p. 658-664, 1995.

SHARMA, P.; YADAV, J.S.; RAJAM, V. Induction of lateral in root cultures of eggplant (*Solanum melongena* L.) in hormone-free liquid medium: A novel system to study the role of polyamines. **Plant Science**, v. 125, p. 103-111, 1997.

SMITH, ZD.; MEISSNER, A. DNA methylation: roles in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 3, p. 204-220, 2013.

SMULDERS, M.; DE KLERK, G. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 137–146, 2011.

SONI, R.; CARMICHAEL, J.P.; SHAH, ZH.; MURRAY, JAH. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. **Plant Cell**, v.7, p. 85-103, 1995.

STONE, SL.; KWONG, LW.; YEE, KM.; PELLETIER, J.; LEPINIEC, L.; FISCHER, R.; GOLDBERG, RB.; HARADA, JJ. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 11806-11811, 2001.

SU, Y.H.; LIU, Y.B.; ZHOU, C.; LI, X.M.; ZHANG, X.S. The microRNA167 controls somatic embryogenesis in *Arabidopsis* through regulating its target genes *ARF6* and *ARF8*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 124, n. 2, p. 405–417, 2016.

SUNKAR, R.; LI, Y.F.; JAGADEESWARAN, G. Functions of microRNAs in plant stress responses. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 4, p. 196–203, 2012.

TAGHIPOUR, F.; JAMSHIDI, S.; HUYOP, F. High performant eggplant *in vitro* regeneration and organogenesis. **Agroecology Journal**, v. 11 n. 2, p. 24-28, 2015.

TANZENA, T.; YESMIN, S.; KHATUN, M.; PROTITY, A.T.; SALIMULLAH, M.; ALAM, I. *In Vitro* regeneration of two high-yielding eggplant (*Solanum melongena* L.) varieties of Bangladesh. **Current Botany**, v. 9, p. 08-12, 2018.

TARRÉ, E.; MAGIOLI, C.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E.; SANTIAGO-FERNANDES, L. D. R. *In vitro* somatic embryogenesis and adventitious root initiation has common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 79-84, 2004.

TEIXEIRA, KÁTIA REGINA DOS SANTOS. Genômica e proteômica / Jean Luiz Simões Araújo. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2006. 37 p.

TIWARI, JK.; SAURABH, S.; CHANDEL, P.; SINGH, BP.; BHARDWAJ, V. Analysis of genetic and epigenetic variation in *in vitro* propagated potato somatic hybrid by AFLP and MSAP marker. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.16, n.6, 2013.

TORRES, AC.; FERREIRA, A.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L. S. NASCIMENTO, A. S. BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. Glossário de biotecnologia vegetal. **Embrapa Hortaliças**, 128p, 2000.

TREVILATTO, P. C.; WERNECK, R. I. Regulação epigenética. *In: Genética Odontológica: Série Abeno*. **Artes Médicas Editora**, - p. 38-42, 2014.

US-CAMAS, R.; RIVERA-SOLÍS, G.; DUARTE-AKÉ, F.; DE-LA-PEÑA, C. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 2, p. 187-201, 2014.

VALLEDOR, L.; HASBÚN, R.; MEIJÓN, M.; RODRÍGUEZ, JL.; SANTAMARÍA, E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M.; FEITO, I.; FRAGA, MF.; CAÑAL, MJ.; RODRÍGUEZ, R. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 91, p. 75–86, 2007.

VALLEDOR, L.; MEIJO, M.; HASBUN, R.; CANAL, MJ.; RODRIGUEZ, R. Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 351–357, 2010.

VANSTRAELEN, M.; BENKOVA, E. Hormonal interactions in the regulation of plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, n.1, p. 463–487, 2012.

VIEJO, M.; RODRÍGUEZ, R.; VALLEDOR, L.; PÉREZ, M.; CAÑAL, M. J.; HASBÚN, R. DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller. **Sexual Plant Reproduction**, v. 23, p. 315–323, 2010.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v. 69, p. 233 – 249. 2002.

VUKSANI, G.; VUKSANI, A.; LEKAJ, P.; ABAZI, U. Regeneration of eggplants *Solanum melongena* var. Sukthi through somatic embryogenesis. **Albanian Journal of agricultural sciences**, 2014.

WANG, QM.; WANG, YZ.; SUN, LL.; GAO, FZ.; SUN, W.; HE, J.; GAO, X.; WANG, L. Direct and indirect organogenesis of *Clivia miniata* and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets. **Plant cell Reports**, v. 31, n. 7, p. 1283-1296, 2012.

WILLIAM, DA.; SU, Y.; SMITH, MR.; LU, M.; BALDWIN, DA.; WAGNER, D. Genomic identification of direct target genes of LEAFY. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 6, p. 775-780, 2004.

WU, X.; ZHANG, Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v.18, p. 517–534, 2017.

XIONG, L. Z.; XU, C. G.; SAGHAI MAROOF, M. A.; ZHANG, O. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 439-446, 1999.

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

XUE, J-H.; XU, G-F.; GU, T-P.; CHEN, G-D.; HAN, B-B.; XU, Z-M.; BJØRÅS, M.; KROKAN, H.E.; XU, G-L.; DU, Y-R. Uracil-DNA glycosylase UNG promotes Tet-mediated DNA demethylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, p. 731-738, 2016.

YADAV, J. S.; RAJAM, M. V. Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1537-1545, 1997.

YADAV, J.S.; RAJAM, M.V. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. **Plant Physiology**, v. 116, p. 617-625, 1998.

YAMADA, T.; NAKAGAWA, H.; SINOTO, Y. Studies on the differentiation in cultured cells I. embryogenesis in three strains of *Solanum* callus. **Botanical Magazine**, v. 80, p. 68-74, 1967.

YANG, Z.; LI, C.; WANG, Y.; ZHANG, C.; WU, Z.; ZHANG, X.; LIU, C.; LI, F. GhAGL15s, preferentially expressed during somatic embryogenesis, promote embryogenic callus formation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Molecular genetics and genomics**, v. 289, p. 873–883, 2014.

YASUTANI, I.; OZAWA, S.; NISHIDA, T.; SUGIYAMA, M.; KOMAMINE, A. Isolation of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the redifferentiation of shoots. **Plant Physiology**, v.105, p. 815-822, 1994.

YU, B.; ZHANG, L.; SUN, Y.; LI, W. Tissue culture and plant regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of eggplant. **Plant Physiology Communications**, v. 39, p. 317-320, 2003.

ZAYOVA, E.; PHILIPOV, P.; NEDEV, T.; STOEVA, D. Response of *in vitro* cultivated eggplant (*Solanum melongena* L.) to salt and drought stress. **AgroLife Scientific Journal**, v. 6, n. 1, p. 276-282, 2017.

ZIMMERMANN, M. J. Embriogênese somática. *In*: CID, L.P. Cultivo *in vitro* de plantas. **EMBRAPA**, 3ª edição, p. 325, 2014.

ZUO, J.; NIU, Q.-W.; IKEDA, Y.; CHUA, N-H. Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration- promoting genes. **Current Opinion on. Biotechnology**. v. 13, p. 173 – 180, 2002b.