

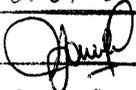
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



JULIANA LACORTE CAZOTO

Estudo morfo-anatômico e análise da expressão gênica durante a reprodução vegetativa em *Bryophyllum tubiflorum* e *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>JULIANA LACORTE CAZOTO</i>

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO CARNIER DORNELAS

**CAMPINAS
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C319e

Cazoto, Juliana Lacorte

Estudo morfo-anatômico e análise da expressão gênica durante a reprodução vegetativa em *Bryophyllum tubiflorum* e *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) / Juliana Lacorte Cazoto. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Marcelo Carnier Dornelas.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Embriogênese somática. 2. *Bryophyllum*. 3. Expressão gênica. 4. Hibridização *in situ*. 5. Desenvolvimento vegetal. I. Dornelas, Marcelo Carnier. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Morphological and anatomical study and gene expression analysis during vegetative reproduction in *Bryophyllum tubiflorum* and *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae).

Palavras-chave em inglês: Somatic embryogenesis; *Bryophyllum*; Gene expression; *In situ* hybridization; Plant development.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marcelo Carnier Dornelas, Tamara Canto Fonseca, Sandra Maria Carmello-Guerreiro.

Data da defesa: 09/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 09 de fevereiro de 2009

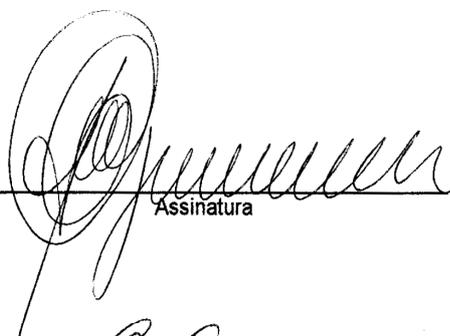
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Camier Domelas
(Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro



Assinatura

Dra. Tamara Canto Fonseca



Assinatura

Prof. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

Assinatura

Dra. Ilene Ribeiro da Silva Passos

Assinatura

AGRADECIMENTOS

A Deus e a meus pais, Roseli e Antonio, por estarem sempre presentes em minha vida.

Ao Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas pela orientação e pelos ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do IB-UNICAMP.

Ao Depto. de Fisiologia Vegetal do IB-UNICAMP pela infra-estrutura.

Ao Prof Dr. Elliot Watanabe Kitajima pela disponibilização do laboratório de microscopia eletrônica (NAP/MEPA) da USP-ESALQ.

À CAPES e à FAPESP (Processo 06/57191-9) pelo apoio financeiro.

Ao Igor por estar ao meu lado, pela atenção, carinho e compreensão.

A minha irmã Luciana, por estar presente durante esta etapa da minha vida.

Aos amigos do Depto. de Fisiologia Vegetal que estiveram presentes durante esses dois anos de estudos.

A todos que, profissional ou pessoalmente, contribuíram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	vi
SUMMARY.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
<i>Embriogênese: definições</i>	<i>1</i>
<i>O controle molecular da embriogênese.....</i>	<i>2</i>
<i>'Propágulos foliares' no gênero Bryophyllum: embriogênese somática in planta ou gemas epifilas?.....</i>	<i>6</i>
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. <i>Material.....</i>	<i>10</i>
3.2. <i>Métodos.....</i>	<i>11</i>
4. RESULTADOS	14
4.1. <i>Análises morfo-anatômicas</i>	<i>14</i>
4.2. <i>Análises moleculares de expressão gênica.....</i>	<i>24</i>
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÕES.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

Espécies do gênero *Bryophyllum*, pertencentes à família Crassulaceae, apresentam uma característica pouco encontrada na natureza: as regiões da margem foliar sofrem diferenciação e desenvolvem pequenas estruturas, que se desprendem da planta e dão origem a novos indivíduos. Tais formações são chamadas de ‘propágulos foliares’ ou ‘bulbilhos’. Entretanto, o estudo da morfologia e desenvolvimento de tais estruturas permitiu que alguns autores as considerassem como embriões, e não apenas ‘brotos’ foliares. A formação natural de embriões somáticos é um fenômeno morfogênico restrito a poucas espécies vegetais. Em *Bryophyllum*, entretanto, eles parecem fazer parte da ontogenia da folha. O presente estudo caracterizou morfológica e anatomicamente essas estruturas foliares em *Bryophyllum tubiflorum* Harv. e *Bryophyllum pinnatum* Lam., nas diferentes fases de seu desenvolvimento, através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica. A expressão diferencial de homólogos aos genes *WUSCHEL*, *MONOPTEROS*, *CUP SHAPED COTYLEDON*, *YABBY* e *LEAFY COTYLEDON1* também foi analisada durante o desenvolvimento dos ‘propágulos’, com a utilização de técnicas de hibridização *in situ*. Os resultados da análise do padrão de expressão gênica, unidos aos da análise morfo-anatômica do desenvolvimento dos ‘propágulos’ permitem classificar essas estruturas como embriões somáticos *in planta* ao menos na espécie *B. tubiflorum*.

SUMMARY

Bryophyllum species from the Crassulaceae family show a rare feature: the margin of the leaf develops structures which detach from the mother plant and give rise to a new organism. These structures are known as 'leaf-plantlets' or 'bulbils'. However, morphological and developmental studies allowed some authors to classify such structures as embryos, and not just foliar buds. The natural formation of somatic embryos is a phenomenon restrict to a few plant species. Nevertheless in *Bryophyllum* this event seems to be part of the leaf ontogeny. This study aimed on the morphological and anatomical characterization of these leaf structures, in their different developmental stages, through scanning electronic microscopy and optical microscopy, in both *Bryophyllum tubiflorum* Harv. and *Bryophyllum pinnatum* Lam. The differential pattern of gene expression was also analyzed for the homologs of *WUSCHEL*, *MONOPTEROS*, *CUP SHAPED COTYLEDON*, *YABBY* e *LEAFY COTYLEDON1* during the development of the leaf 'bulbils' by *in situ* hybridization. Taken together, the result of gene expression analyzes and those from morpho-anatomy of plantlet development allow the classification of these structures as *in planta* somatic embryos, at least for *B. tubiflorum*.

1. INTRODUÇÃO

Embriogênese: definições

Ao contrário do que ocorre nos animais, o estabelecimento dos componentes do corpo das plantas ocorre, em sua maior parte, na fase pós-embrionária. Os meristemas apical caulinar e apical radicular desempenham um papel fundamental durante o desenvolvimento das estruturas vegetais: eles conciliam as atividades de gerar e manter a população de células que os mantêm (divisão celular) e de formar os órgãos (diferenciação). A atividade meristemática atua de maneira que o desenvolvimento vegetal seja, por definição, modular e reiterado, contribuindo para a formação dos diferentes padrões arquiteturais dos corpos vegetais (Garcia-Bellido, 1996; Weigel & Jürgens, 2002; Gross-Hardt & Laux, 2003).

O estabelecimento inicial dos meristemas primários (apical caulinar e apical radicular) acontece durante a embriogênese, que é definida como o processo pelo qual se estabelece uma estrutura bipolar (o embrião), com um meristema apical caulinar e um meristema apical radicular, posicionados em pólos opostos, sem conexão vascular com a planta mãe (Naylor, 1932; Batygina, 2005).

Em plantas, a embriogênese como processo responsável por gerar um indivíduo completo é, na maioria das vezes, resultado do encontro de gametas: um dos núcleos gaméticos do grão de pólen se funde com o núcleo da oosfera, que se encontra no saco embrionário. Essa fusão dá origem a um zigoto (geralmente diplóide) com material genético distinto dos pais, o que garante a variabilidade genética da espécie, característica específica da embriogênese zigótica (Jenik et al., 2007; Chandler et al., 2008). Entretanto, o desenvolvimento de um embrião a partir de uma célula somática pode ser induzido *in vitro* a partir de estímulos adequados (DeKlerk et al., 1997; Fehér, 2008; Passarinho et al., 2008) ou mesmo acontecer

naturalmente em alguns grupos vegetais (Taylor, 1967; Garcês et al., 2007). Embora a embriogênese somática, classificada como reprodução vegetativa, apresente características distintas da embriogênese zigótica como a produção de progênie clonal da planta mãe, características típicas do desenvolvimento de embriões zigóticos são mantidas. A bipolaridade, aspectos da diferenciação celular e histológica, e a autonomia fisiológica, são também encontradas no desenvolvimento de embriões somáticos (Naylor, 1932; Xu & Bewley, 1992; Batygina, 2005).

O controle molecular da embriogênese

Uma importante questão no desenvolvimento embrionário vegetal é a determinação de como as células meristemáticas que dão origem aos ramos e raízes são estabelecidas em pólos opostos no embrião. A instalação da polaridade no embrião e o conhecimento dos mecanismos que o determinam são fundamentais para o entendimento do desenvolvimento vegetal embrionário e pós-embrionário da planta. Tais aspectos são muito estudados na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (para uma revisão recente, veja Chandler et al., 2008). Em *Arabidopsis*, a polaridade do embrião é iniciada já com as primeiras divisões do zigoto e, no limite, já pode ser considerada estabelecida mesmo nos tecidos maternos, como na distribuição das células do saco embrionário (Yadegari & Drews, 2004). A oosfera é encontrada na porção basal do saco embrionário, próxima à micrópila, e possui polarização citoplasmática, com um grande vacúolo na porção inferior e o núcleo na porção superior da célula (Huang & Russell, 1992; Yadegari & Drews, 2004). Após a fecundação, a primeira divisão zigótica também é assimétrica, dando origem a uma célula basal, que formará o suspensor; e a uma célula apical, que formará o embrião propriamente dito. A célula mais distal do suspensor, entretanto, dará origem à

hipófise que, ao longo do desenvolvimento, é responsável por gerar o centro quiescente e a columela da raiz (Long et al., 2002; Jenik et al., 2007).

Um dos principais fatores que determinam o estabelecimento da polaridade em *Arabidopsis*, desde o início do seu desenvolvimento, é o fluxo polar de auxina. Parte do processo de transporte polar de auxinas é realizada por proteínas transmembranares específicas (proteínas PIN), que garantem o efluxo direcional de auxina em direção à base do embrião, estabelecendo nesse local uma alta concentração desse hormônio (Friml et al., 2003; Jenik et al., 2007). O *maximum* de auxina na região basal do embrião (hipófise) determina a formação do meristema apical radicular e, no pólo oposto, determina o meristema apical caulinar.

Alguns fatores influenciam a atuação do fluxo polar de auxina. O gene *MONOPTEROS* (*MP*) codifica um fator de transcrição, ARF5 (Auxin Response Factor), que ativa os genes responsivos à auxina (Hardtke & Berleth, 1998; Hamann et al., 2002). O fator de transcrição ARF5 permanece ligado à proteína Aux/IAA, formando um complexo que inibe a expressão direta de genes. Com a presença de auxina, o Aux/IAA é reconhecido pelo sistema SCF/TIR e é conseqüentemente degradado, permitindo que a transcrição de genes seja ativada (Kepinski & Leiser, 2005). Dessa maneira, a expressão do gene *MP* é indispensável para que o fluxo polar de auxina determine, no caso da embriogênese, o padrão apical-basal (Hardtke & Berleth, 1998).

O gradiente de concentração de auxina gerado pelo seu transporte polar ao longo do eixo embrionário induz a expressão diferencial de genes e, conseqüentemente, a formação de um determinado tecido ou órgão. Dessa maneira, quando um grupo específico de genes é ativado, inicia-se uma programação genética em cascata que culminará no estabelecimento e na

manutenção de estruturas ao longo do desenvolvimento da planta (Friml et al., 2003; Jenik et al., 2007; Chandler et al., 2008).

Genes da família *WOX* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN*) são fatores de transcrição expressos em domínios específicos do embrião, determinando o seu padrão de desenvolvimento inicial (Haecker et al., 2004; Chandler et al., 2008). Os genes *WOX* foram descritos em *Arabidopsis*, mas a conservação evolutiva dos padrões de expressão destes genes em gramíneas indica que provavelmente esta família gênica controla aspectos do desenvolvimento do embrião zigótico na maioria das angiospermas (Haecker et al., 2004; Chandler et al., 2008). Principalmente dois genes *WOX* determinam a compartimentação inicial do embrião: *WOX2* e *WOX8*. O gene *WOX2* é responsável por determinar a identidade da região apical durante o início da embriogênese inicial (Haecker et al., 2004; Chandler et al., 2008). A expressão de *WOX8* é complementar à expressão do *WOX2* e restrita às células basais do embrião inicial (Haecker et al., 2004; Chandler et al., 2008). A influência do fluxo polar de auxina sobre a expressão dos genes *WOX* (ou vice-versa) é atualmente indeterminada. Entretanto, sabe-se que os dois fatores se sobrepõem e determinam zonas no embrião inicial que culminam com a posterior expressão diferencial de genes.

O fator de transcrição *WUSCHEL* (*WUS*) começa a ser expresso no embrião de 16 células, nas duas células centrais do terço superior do embrião. Durante o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário a expressão de *WUS* é restrita ao centro do meristema apical caulinar, sendo responsável pela manutenção das células na região central do mesmo (CZ). O tamanho do meristema caulinar é determinado pela ação conjunta dos genes *WUS* e *CLAVATA* (*CLV*). O produto do gene *WUS* estimula a divisão de células do meristema e ativa a expressão dos genes *CLV*, que

por sua vez inibem a expressão de *WUS*, restringindo a região central do meristema e caracterizando o sistema de retroalimentação *CLV/WUS* (Schoof et al., 2000; Williams et al., 2005).

Enquanto o gene *WUS* contribui para a manutenção do meristema apical caulinar, outro gene, *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* participa, além da manutenção, na formação do meristema. O gene *STM* é expresso nas células precursoras do meristema apical caulinar no estágio globular tardio (Aida et al., 1999). Além disso, *STM* participa também do posicionamento do meristema apical caulinar juntamente com outro gene, *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)*. A expressão de *CUC* ocorre ao redor do meristema, formando um anel entre a região central e as bordas dos cotilédones. Ele é necessário para a expressão de *STM* no centro do meristema, caracterizando um padrão de expressão complementar entre esses genes. Da mesma maneira, a expressão de *STM* é necessária para a expressão de *CUC* para que ocorra a separação dos cotilédones (Aida et al., 1999).

O padrão basal do embrião também é formado a partir de um preciso controle molecular. A organização do meristema apical radicular é regular, com células iniciais de vários tecidos localizadas ao redor do centro quiescente (QC). A formação desse meristema ocorre no embrião na fase globular, por meio da divisão assimétrica da hipófise, que origina o QC (Sabatini et al., 2003).

O fluxo polar de auxina se destaca no processo de posicionamento e de formação de padrão do QC (Aida et al., 2004; Xu et al., 2006; Jenik et al., 2007). A percepção do *maximum* de auxina, que ocorre na região basal do embrião, determina neste local a expressão diferencial de genes. Os genes *PLETHORA (PLT1 e PLT2)* pertencem à família de fatores de transcrição *APETALA 2 (AP2)* e são expressos na região basal do embrião de 8 células, tendo sua expressão regulada

pelo fluxo polar de auxina (Jenik et al., 2007). Esses genes são necessários para a determinação e manutenção do meristema apical radicular. A transcrição dos *PLT* é estimulada pela auxina e é dependente de fatores responsivos à auxina (ARF). A expressão dos *PLT* é mantida restrita ao meristema apical radicular ao longo de todo o desenvolvimento vegetal (Aida et al., 2004; Xu et al., 2006; Jenik et al., 2007).

Os genes *PLT* atuam em uma via juntamente com *SHORT-ROOT (SHR)* e *SCARECROW (SCR)*, que mediam o mecanismo que define a posição e a diferenciação das células derivadas do QC. SHR e SCR são fatores de transcrição pertencentes à família de fatores de transcrição específicos de plantas, denominada GRAS, que possuem sua expressão regulada positivamente pelos genes *PLT* (Xu et al., 2006). O gene *SHR* regula a determinação das células meristemáticas do QC bem como o padrão radial da raiz (Levesque et al., 2006).

‘Propágulos foliares’ no gênero *Bryophyllum*: embriogênese somática *in planta* ou gemas epifilas?

Em espécies do gênero *Bryophyllum*, pertencentes à família Crassulaceae, plantas inteiras se desenvolvem a partir de um grupo de células localizadas na borda de folhas adultas. Em algumas espécies tal característica faz parte do desenvolvimento natural das folhas, como é o caso de *Bryophyllum tubiflorum* (figura 1A). Em outras, a formação dessas estruturas é induzida por estresse, como ocorre em *Bryophyllum pinnatum* (figura 1B), que inicia o desenvolvimento dos propágulos quando a folha é destacada da planta mãe. Tal característica chamou a atenção de pesquisadores no início do século XX, que estudaram exaustivamente a anatomia e morfologia dessas estruturas (Loeb, 1915; Loeb, 1916, 1918; Child & Bellamy, 1920; Reed, 1923; Howe, 1931; Mehrlich, 1931; Naylor, 1932; Yarbrough, 1932; Freeland,

1933; Yarbrough, 1934; Stoudt, 1938). No entanto, a ontogênese desses ‘propágulos’ sempre foi motivo de discussão. A presença do pólo radicular e caulinar foi sempre descrita nos ‘bulbilhos’ de *Bryophyllum*, e embora essas estruturas tenham sido classificadas como embriões (Naylor, 1932; Yarbrough, 1932, 1934), a maioria dos autores nessa época mostrava-se relutante a aceitar tal idéia.

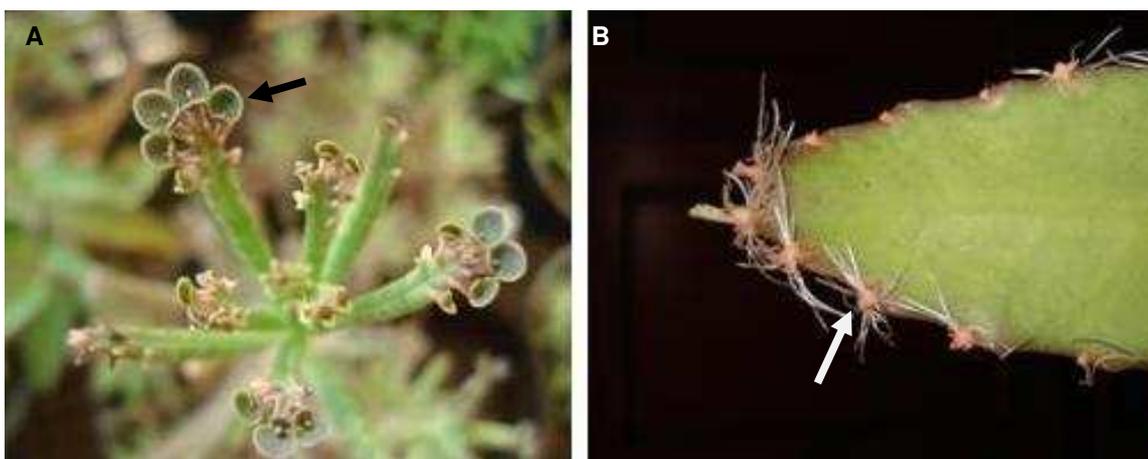


Figura 1: ‘Propágulos foliares’ em *B. tubiflorum* Harv. (A) e em *B. pinnatum* Lam. (B).

Recentemente, Garcês et al. (2007) retomaram esses estudos do início do século XX e dedicaram uma abordagem molecular ao estudo desse fenômeno. Estes autores caracterizaram os ‘propágulos foliares’ como embriões somáticos em *B. tubiflorum* e *B. daigremontianum* através da identificação da expressão do gene embrião-específico *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*) nessas estruturas.

Na planta-modelo *Arabidopsis thaliana*, *LEC1* é expresso exclusivamente durante a embriogênese e seu padrão de expressão é similar em embriões somáticos e zigóticos (Zhang et al., 2002). Mutantes *lec1* de *Arabidopsis* não produzem embriões somáticos (Gaj et al., 2005) e experimentos com RNAi mostraram que a redução de transcritos do homólogo de *LEC1* em *Bryophyllum* também inibiu a produção dos embriões foliares (Garces et al., 2007).

Adicionalmente, a expressão ectópica de *LEC1* em plantas transgênicas é suficiente para induzir a formação de embriões a partir de células somáticas em *Arabidopsis* (Lotan et al., 1998).

O estudo da expressão gênica durante a embriogênese pode ser instrutivo para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo. Dessa maneira, a hipótese deste trabalho foi a ocorrência da conservação dos padrões de expressão de genes homólogos aos envolvidos no desenvolvimento embrionário de *Arabidopsis*, em espécies do gênero *Bryophyllum*. Uma vez verificada, esta conservação poderia atestar a natureza embriogênica dos 'propágulos foliares' em *Bryophyllum*.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos a caracterização e a definição das estruturas desenvolvidas nas margens das folhas de *Bryophyllum pinnatum* e *Bryophyllum tubiflorum*, por meio de técnicas histológicas e de microscopia eletrônica de varredura. Adicionalmente, pretendeu-se examinar o padrão de expressão, pela técnica de hibridização *in situ*, de genes expressos durante o desenvolvimento desses 'propágulos' que pudessem estar potencialmente envolvidos no controle de sua ontogênese.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Material Vegetal

‘Propágulos foliares’ de *B. tubiflorum* em diferentes estágios de desenvolvimento, foram coletados de plantas cultivadas em casa de vegetação do Depto. de Fisiologia Vegetal do IB, Unicamp, em Campinas, SP. Para *B. pinnatum* foram coletadas 42 folhas adultas, divididas posteriormente em 6 grupos com 7 folhas em cada. Estes foram identificados e mantidos em casa de vegetação, em fotoperíodo de dias longos, durante uma semana. Para essa espécie, foram feitas coletas diárias, a partir da retirada das folhas do dia 0 ao dia 5 (D0, D1, D2, D3, D4 e D5). As amostras destinadas às análises morfo-anatômicas e hibridização *in situ* foram fixadas e desidratadas segundo descrito no item 3.2.1.

3.1.2. Seqüências gênicas e sondas

Clones de cDNA codificadores de homólogos de *Bryophyllum* dos genes *WUSCHEL* (*WUS*; Mayer et al., 1998), *MONOPTEROS* (*MP*; Hardtke & Berleth, 1998), *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*; Aida et al., 1997) *YABBY* (*YAB*; Siegfried et al., 1999) e *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*; Lotan et al., 1998) foram primeiramente obtidos por nossa equipe (Dornelas *et al.*, dados não publicados) e posteriormente utilizados como molde para a síntese *in vitro* das sondas marcadas para hibridização *in situ*. As sondas foram marcadas pela incorporação de uracilas conjugadas à digoxigenina (DIG). Para tal, os plasmídeos pSPORT1 contendo os clones de cDNA foram linearizados por digestão com EcoRI por 2h a 37°C e precipitados (10% vol de acetato de sódio 3M e 2 vezes e meia o volume de etanol absoluto), por 20 min a

13.000 rpm. Os plasmídeos linearizados foram ressuspensos em 13 µl de água Mili-Q autoclavada e submetidos à síntese de RNA *in vitro*, de acordo com as instruções do kit de marcação (Roche). Para a síntese das sondas anti-sense, a transcrição *in vitro* foi realizada com a enzima SP6. Sondas sense controle foram marcadas com a enzima T7.

3.2. Métodos

3.2.1. Microscopia óptica e eletrônica de varredura

As amostras vegetais coletadas foram fixadas e preparadas, objetivando a observação sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a obtenção de cortes histológicos seriados para a observação em microscopia óptica (MO) e hibridizações *in situ*. O objetivo de se utilizar duas técnicas de observação microscópica complementares é documentar e determinar a ocorrência de modificações anatômicas durante a formação dos 'propágulos' foliares.

A fixação do material, tanto para MO como para MEV, ocorreu em 4% paraformaldeído (p/v), por 24h a 4°C. Durante os primeiros 20min de fixação, aplicou-se vácuo (60mm Hg). O material a ser submetido à MEV foi desidratado em série etílica, seco ao ponto crítico e metalizado com ouro coloidal (camada de 30nm). A observação foi realizada em microscópio de varredura LEO 435 VP no NAP/MEPA (ESALQ/USP, Piracicaba, SP). As imagens digitalizadas das observações foram obtidas utilizando-se o programa LEOUIF.

Para MO, o material fixado foi desidratado em série etílica e emblocado em resina plástica (Historesin, Leica) seguindo-se as instruções do fabricante do kit. Secções de 4-5 µm foram obtidas com o uso de micrótomo rotativo e foram montadas em lâminas de vidro. Após coloração com azul de toluidina a 0,05% (p/v)

em tampão de tetraborato de sódio (Huber et al., 1968), secagem e montagem das lamínulas em Entellan, as lâminas permanentes foram observadas em microscópio ZEISS modelo AXIOSKOPE e fotografadas.

3.2.2. Análise de expressão gênica por hibridização *in situ*

O padrão de expressão dos homólogos de *Bryophyllum* de cinco genes potencialmente envolvidos no desenvolvimento dos 'propágulos foliares', foi analisado por hibridização *in situ*. As hibridizações foram realizadas utilizando-se sondas não-radioativas, segundo as técnicas já descritas em Dornelas et al., 1999 e Dornelas et al., 2000. Os tecidos fixados e desidratados das amostras vegetais (veja item 3.2.1) foram emblocados em parafina, seccionados (8 µm) e montados em lâminas de vidro pré-tratadas com solução 2% de 3-aminopropiltriétoxissilana em acetona. O material foi desparafinado com dois banhos de 15 minutos cada de xilol puro, seguidos por banhos, também de 15 minutos, em séries de xilol:etanol nas proporções 3:1; 1:1 e 1:3, respectivamente. Para finalizar, foram feitas duas imersões de 10 minutos cada em etanol absoluto e as lâminas foram secas ao ar. As amostras foram submetidas ao tratamento de pré-hibridização com proteinase-K (1µg/ml em Tris-HCl 0,05M pH:7,5) por 12 minutos a 37°C, e lavadas posteriormente em água livre de RNA. Foram adicionados 300 µl de solução de hibridização em cada lâmina (10 mM de Tris-HCl pH:7,5; 300 mM NaCl; 50% formamida deionizada; 1mM EDTA; 1x Denharts; 10% Dextran Sulfato 50% e 600ng de sonda marcada). Elas foram cobertas com filme plástico (Parafilm) e incubadas em câmara úmida a 42°C overnight. O tratamento de pós-hibridização foi conduzido sob condições de stringência apropriadas, através de duas lavagens em solução salina SSC (0,15M NaCl e 0,015M citrato de sódio) quatro vezes concentrada por trinta minutos cada e

duas lavagens em solução salina SSC duas vezes concentrada também por trinta minutos cada. Todas as lavagens foram realizadas à temperatura de 42°C. A seguir, as lâminas foram lavadas em água Mili-Q autoclavada e iniciou-se o processo de imuno-deteção. Para tal, as lâminas foram inicialmente mantidas em cubetas por 5 minutos em DB1 (0,1M Tris-HCl e 0,15M NaCl, pH 7,5). Posteriormente as lâminas foram submetidas ao tratamento de trinta minutos em tampão de bloqueio DB2 que consistiu em uma solução 1% de Blocking reagent (Roche), dissolvido em DB1. Após essa etapa, as lâminas foram enxaguadas em DB1 e, posteriormente, submetidas ao tratamento com solução DB2 contendo anticorpo (anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina, diluição 1:1000), incubando-as por uma hora em câmara úmida. Após esse período foram feitas duas lavagens em DB1 de quinze minutos cada, e uma lavagem de cinco minutos em DB3 (0,1M Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,05M MgCl₂ . 6H₂O; pH9,5). Para a reação de deteção colorimétrica da atividade da fosfatase alcalina, as lâminas foram tratadas com uma solução comercial de NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium chloride/ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine) contendo 1µM de levamisole (Pierce). A reação de deteção ocorreu em câmara úmida e no escuro por cerca de 16h. As lâminas hibridizadas foram observadas ao microscópio e fotografadas para posterior análise.

4. RESULTADOS

4.1. Análises morfo-anatômicas

Apesar dos 'propágulos foliares' em *B. pinnatum* e *B. tubiflorum* apresentarem características similares, como a formação de folhas e raízes que darão origem a um novo indivíduo independente da planta mãe, o estímulo para que tais estruturas se desenvolvam é diferente para cada espécie. Os 'propágulos' em *B. pinnatum* se encontram nos vértices das margens crenadas das folhas adultas (figura 2), e se desenvolvem quando estas são retiradas da planta mãe.



Figura 2- Folha de *B. pinnatum* logo após ser retirada da planta mãe (D0). A seta indica o local onde se desenvolverão os 'propágulos foliares'. Barra=1cm.

A figura 3 ilustra o desenvolvimento dos 'propágulos' em *B. pinnatum*. Após as folhas serem destacadas (D0), a margem foliar dessa espécie apresenta morfologia inalterada quando comparadas às folhas não induzidas e unidas à planta mãe (figura 3A). Nas reentrâncias da margem crenada, foi possível identificar um grupo pré-existente de células, que se caracterizaram pelo citoplasma denso e diâmetro reduzido (figura 3B). Estas características sugerem a identidade de tecidos meristemáticos. A partir do terceiro dia de indução (D3), algumas estruturas puderam ser visualizadas sem a utilização de equipamentos, e em D4, foi possível a

identificação dos ápices caulinares e radiculares na superfície externa das folhas (figura 3C). O pólo caulinar produziu estruturas laminares opostas, localizadas ao redor de uma região meristemática, e o pólo radicular - que também apresentou células com citoplasma denso e diâmetro reduzido - formou-se logo abaixo do ápice caulinar (figura 3D), com conexão vascular estabelecida entre as duas extremidades. Apesar desses pólos estarem conectados entre si, as origens dos meristemas apicais caulinar e radicular parecem ser distintas. A extremidade caulinar desenvolveu-se externamente em relação à folha, com um aumento ordenado no volume de células a partir do meristema original (D0), criando uma continuidade entre a epiderme foliar e a epiderme do recém formado pólo caulinar. Por outro lado, a extremidade radicular apresentou uma formação mais interna, não sendo observável na superfície externa da folha no início de seu desenvolvimento (Figura 3D). Posteriormente, o crescimento dessa estrutura radicular rompeu as camadas celulares periféricas da folha (figura 3E e 3F).

A indução do 'propágulos foliares' em *B. tubiflorum* ocorre de maneira distinta: essas estruturas se desenvolvem no ápice das folhas da planta mãe quando esta é submetida a tratamento de dias longos (comunicação pessoal, Prof. Ivany Valio). A ontogênese dos 'propágulos' nessa espécie também foi diferente da observada para *B. pinnatum*. Em *B. tubiflorum*, a formação dos 'propágulos' fazem parte da ontogênese das folhas. Nesta espécie, os propágulos se desenvolvem sobre estruturas suporte, em formato de concha, localizadas no ápice das folhas (Figura 4). Essas estruturas são definidas em inglês como 'peg' ou 'leaf pedestal' (Batygina, 2005; Garcês et al., 2007).

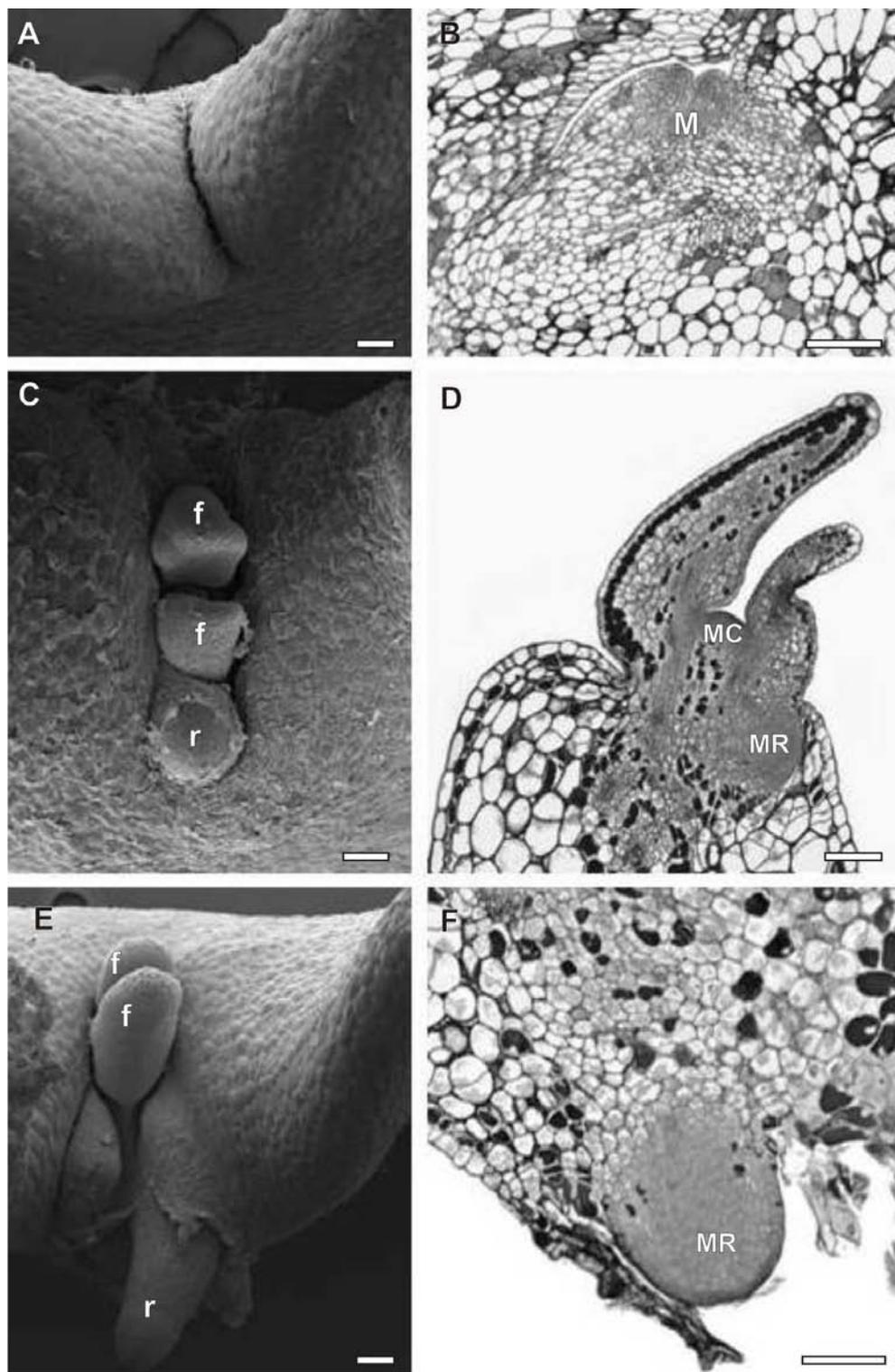


Figura 3- Desenvolvimento dos 'propágulos foliares' em *B. pinnatum*. (A) MEV das reentrâncias da margem foliar em D0. (B) Seção longitudinal do meristema na margem de uma folha adulta. (C) MEV do 'Propágulo foliar' em D4. (D) Seção longitudinal do 'propágulo foliar' em D4. (E) MEV do 'propágulo foliar' em D5. (F) Detalhe da raiz em corte longitudinal rompendo a epiderme foliar em D5. **M:** Meristema; **MC:** Meristema caulinar; **MR:** Meristema radicular; **r:** raiz; **f:** primórdio de folha. Barras = 100µm.

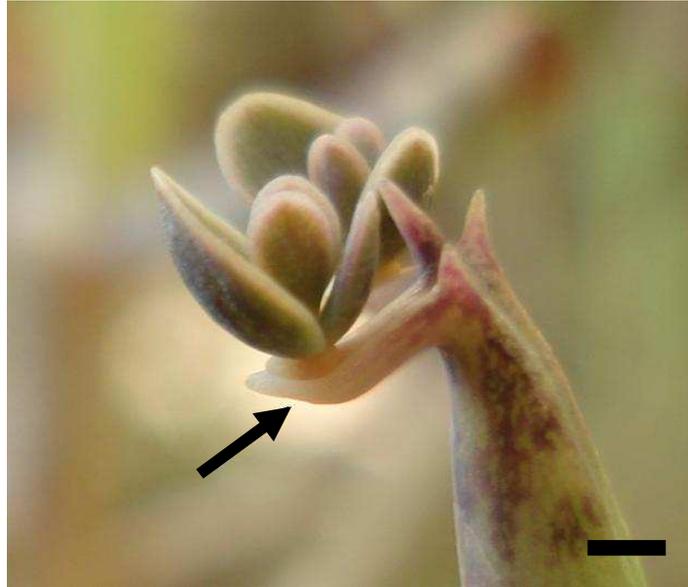


Figura 4- Detalhe do 'suporte foliar' (peg) indicado pela seta em uma folha adulta de *B. tubiflorum*. Barra= 0,5cm

Na figura 5A, a foto em MEV ilustra o desenvolvimento de duas folhas maiores e duas folhas menores (alternadas em relação às primeiras) a partir do meristema apical caulinar em *B. tubiflorum* (detalhado na figura 5B). A diferenciação da região terminal do primórdio foliar determinou a formação de três projeções (figura 5C). Ocasionalmente, outras projeções foram observadas basalmente em relação às anteriores (figura 5D). Nas dobras formadas nas axilas destas estruturas, observou-se a invaginação dos tecidos e a formação de um sulco (figuras 5E e 5F). O crescimento dos tecidos ao longo dos sulcos formados produziu novas projeções, perpendiculares às primeiras, que determinaram os 'suportes' nos quais se desenvolvem os 'propágulos foliares' (figuras 5G e 5H).

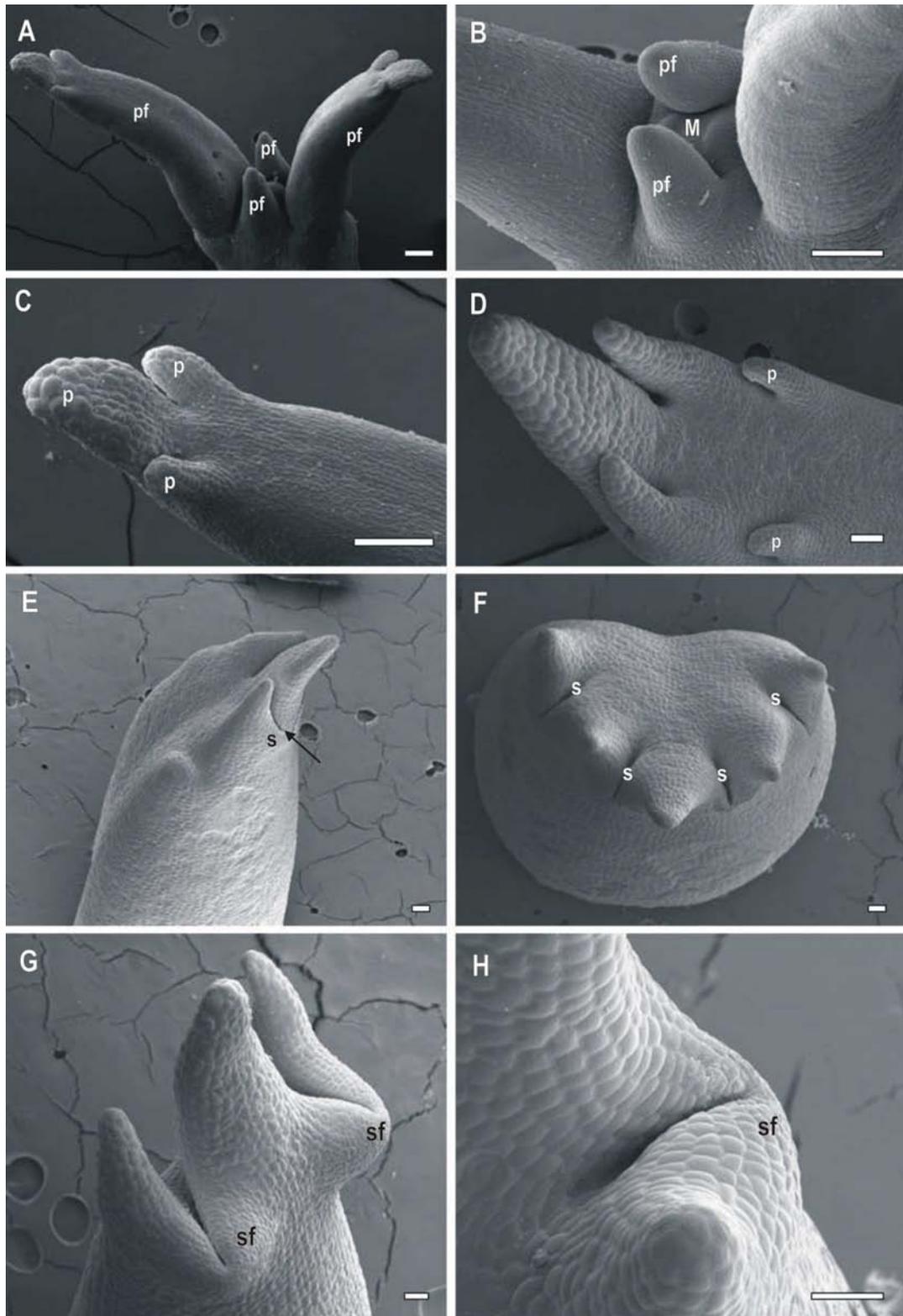


Figura 5- MEV do desenvolvimento dos 'suportes foliares' em *B. tubiflorum*. (A) Ápice caulinar de *B. tubiflorum*. (B) Meristema apical caulinar. (C e D) Projeções celulares no ápice das folhas. (E e F) Formação dos sulcos entre as primeiras projeções foliares. (G e H) Formação dos 'suportes foliares'. **M**: Meristema apical caulinar, **p**: projeção foliar, **pf**: primórdio foliar, **s**: sulco, **sf**: suporte foliar. Barras = 100µm.

Em situação de dias curtos, esses 'suportes' são formados, mas não há produção de 'propágulos'. Com o estabelecimento de dias longos, a espécie *B. tubiflorum* inicia o desenvolvimento dos 'propágulos foliares' sobre os suportes já determinados. Assim, a partir dessa condição, os 'propágulos' iniciam o desenvolvimento na parte mais distal do 'suporte'. A figura 6A ilustra uma folha de *B. tubiflorum* com os 'propágulos' já em início de formação em dois estágios diferentes de desenvolvimento. Geralmente os 'suportes' mais terminais iniciam a formação dos 'propágulos' antes dos localizados mais basalmente. No início do desenvolvimento, um grupo de células na região interna da invaginação dos 'suportes' se dividiu ordenadamente resultando em estruturas globulares que podem ser observadas nas figuras 6B (MEV) e 6D (MO). As células que formam essas estruturas apresentam citoplasma denso e núcleo central bem definido, características distintas das encontradas nas células da folha da planta mãe, sempre maiores e mais vacuolizadas. No estágio seguinte do desenvolvimento, padrões diferenciados de divisão celular nos 'propágulos' resultaram em uma estrutura em forma de coração (figuras 6C e 6E), revestida pela epiderme, que se apresenta contínua com a epiderme foliar da planta-mãe.

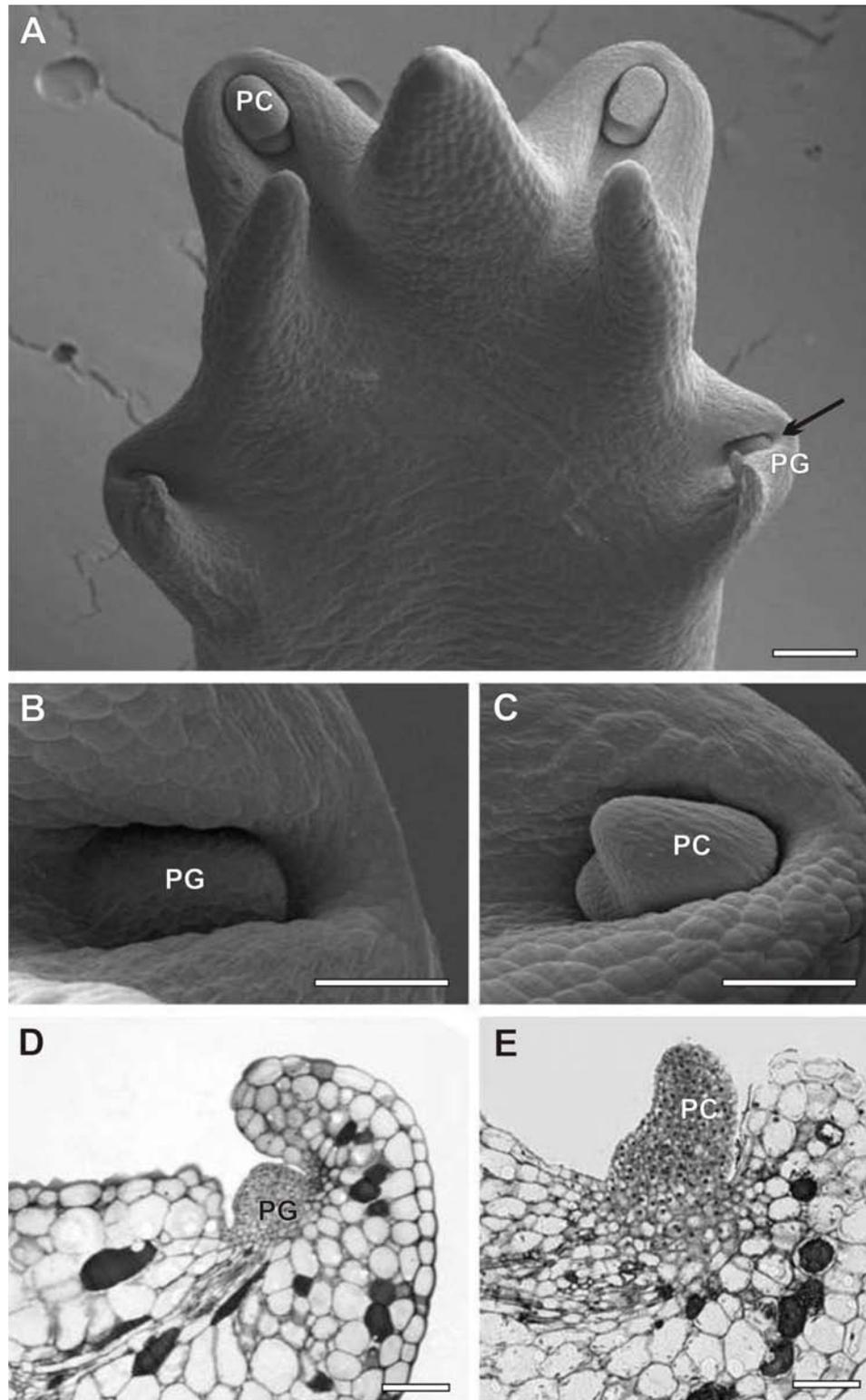


Figura 6- Início do desenvolvimento dos propágulos foliares em *B. tubiflorum*. (A) MEV do ápice foliar com propágulos em diferentes estágios de desenvolvimento: globular (B) e de coração (C). Seção longitudinal dos propágulos nos estágios globular (D) e de coração (E) em MO. PC: 'propágulo' em estágio de coração; PG: 'propágulo' globular. Barras = 100μm.

Numa fase posterior (figura 7A), ocorre crescimento desigual na porção superior do 'propágulo' (figura 7B e 7D). Células meristemáticas puderam ser observadas na região correspondente ao meristema apical caulinar e, também, na porção adaxial do primórdio da primeira folha, posicionada abaxialmente em relação ao eixo formado pelo "suporte foliar" da planta-mãe. O desenvolvimento da entre as projeções que começam a se destacar na porção superior do 'propágulo'. Essas projeções se diferenciam em duas estruturas laminares que se desenvolveram e deram origem ao primeiro par de folhas do novo indivíduo, apresentando filotaxia oposta (figuras 7C e 7E). Há uma diferença de tamanho entre as duas primeiras folhas. Uma delas, posicionada distalmente em relação ao suporte foliar de *B. tubiflorum*, cobre o meristema apical caulinar e a segunda folha. Esta última tem tamanho reduzido, mas estrutura similar à primeira, com o mesmo padrão de organização celular (figura 7E). A região meristemática caulinar localizou-se entre as duas primeiras folhas do propágulo (figura 7E). O padrão de organização do meristema apical caulinar é bem determinado, podendo-se distinguir duas camadas de células mais externas (camada L1 e L2) e uma região meristemática central (CZ) bem desenvolvida (figura 7F). O meristema apical radicular não pôde ser observado nas seções da figura 7D e 7E. Entretanto a formação deste outro pólo é evidente, principalmente quando o desenvolvimento dos propágulos é analisado *in vivo*, mesmo sem a utilização de técnicas de microscopia (figura 8).

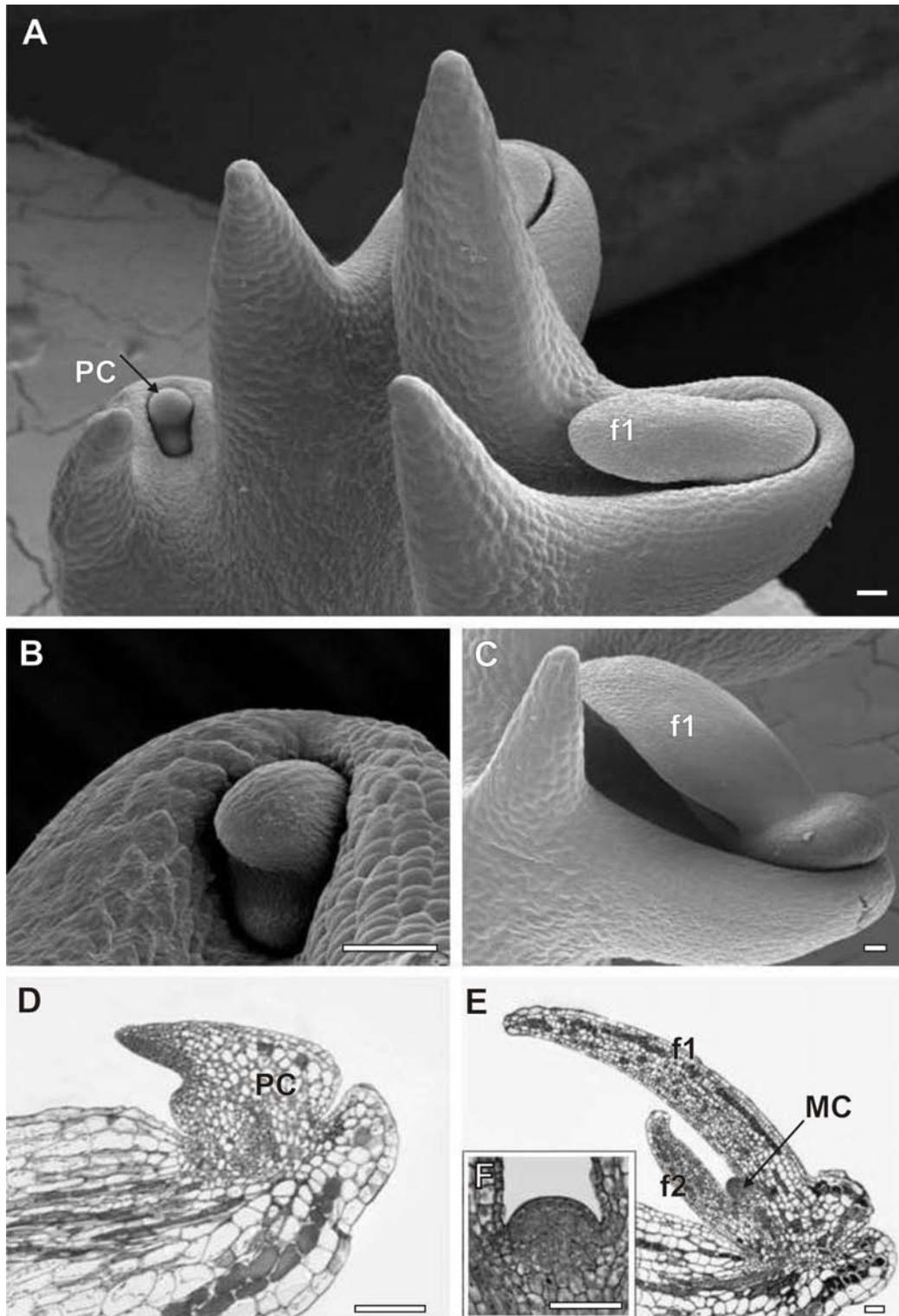


Figura 7- Desenvolvimento dos propágulos de *B. tubiflorum*. (A) MEV do ápice foliar com propágulos em diferentes fases de desenvolvimento: estágio tardio de coração (B) e fase final de formação (C). Seção longitudinal do ‘propágulo’ em estágio tardio de coração (D) e em fase final de desenvolvimento (E). **f1**: primeiro primórdio de folha; **f2**: segundo primórdio de folha; **PC**: ‘propágulo’ em estágio de coração; **MC**: Meristema apical caulinar. Barras = 100µm.



Figura 8- Formação de raízes na base do 'propágulo foliar' em *B. tubiflorum*. Barra=0,5cm

A partir da análise em MO em outro plano de corte, também longitudinal, a estrutura do meristema apical radicular pôde ser observada. A figura 9A apresenta uma região em forma de funil na metade inferior do 'propágulo', com uma concentração de células menores e mais densas na parte mais basal desse funil, a qual, se acredita, represente o meristema apical radicular. Além das células características de regiões meristemáticas, é possível observar elementos de vaso na região mediana dessa estrutura (Figura 9B), que indicam a localização do cilindro vascular central da raiz do 'propágulo'. No estágio final de formação do 'propágulo', observa-se uma zona de abscisão formada por 3 camadas de células que separa completamente o 'propágulo' da planta mãe.

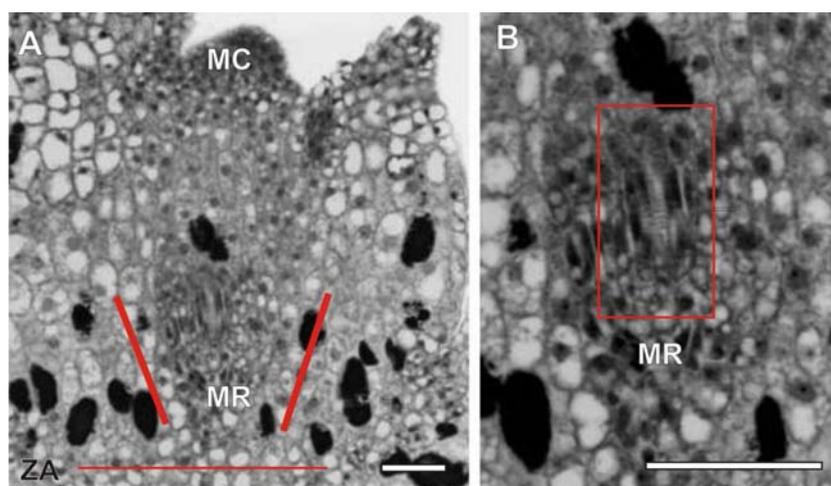


Figura 9- Eixo apical-basal de *B. tubiflorum*. (A) Meristemas apicais caulinar e radicular. Zona de abscisão abaixo do ápice radicular. (B) Detalhe do sistema vascular na região do cilindro central da raiz. **MC**: Meristema apical caulinar; **MR**: Meristema apical radicular; **ZA**: Zona de abscisão. Barras=100µm.

4.2. Análises moleculares de expressão gênica

A expressão do homólogo de *WUS* de *B. tubiflorum* pôde ser observada na região apical do 'propágulo' no final da fase globular e início da fase de coração (figura 10). Adicionalmente, o sinal de hibridização da sonda antisense para o *WUS* de *B. tubiflorum* também foi observado na região limite da folha e do 'propágulo' (figura 10), sendo expresso nas células maternas que estão em contato direto com as novas estruturas.



Figura 10- Seção longitudinal do propágulo mostrando o padrão de expressão do gene *WUS* em *B. tubiflorum* durante estágio globular/ coração e na região de conexão entre o 'propágulo' e a planta-mãe. Setas indicam o local da expressão. Barra = 50 μ m.

A expressão do gene homólogo do gene *MP* em *B. tubiflorum* foi localizada sempre na região interna do 'propágulo'. A figura 11A mostra um corte longitudinal do 'propágulo' na fase de coração com a presença de transcritos de *MP* na região onde se formou o primeiro par de folhas e ao longo do eixo do 'propágulo'. Com o avanço no processo de desenvolvimento, a expressão se tornou mais restrita às regiões onde se formaram os tecidos vasculares da planta e nos primórdios foliares que começaram a se formar próximo à região meristemática (figura 11B).

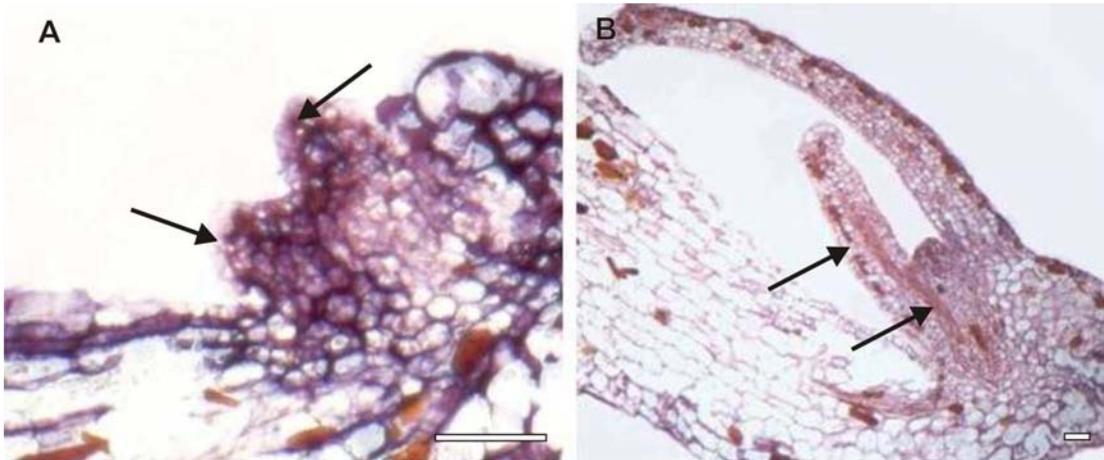


Figura 11- Seção longitudinal do propágulo em diferentes fases de desenvolvimento mostrando o padrão de expressão do homólogo do gene *MP* em *B. tubiflorum*. **(A)** 'Propágulo foliar' em estágio de coração. **(B)** 'Propágulo foliar' maduro. Setas indicam o local da expressão. Barras=100µm.

O padrão de expressão de um homólogo do gene *CUC* também foi analisado durante a formação dos propágulos foliares em *B. tubiflorum*. O sinal da hibridização *in situ* pôde ser observado na região apical do 'propágulo', principalmente nas duas projeções que originaram o primeiro par de folhas (figura 12).

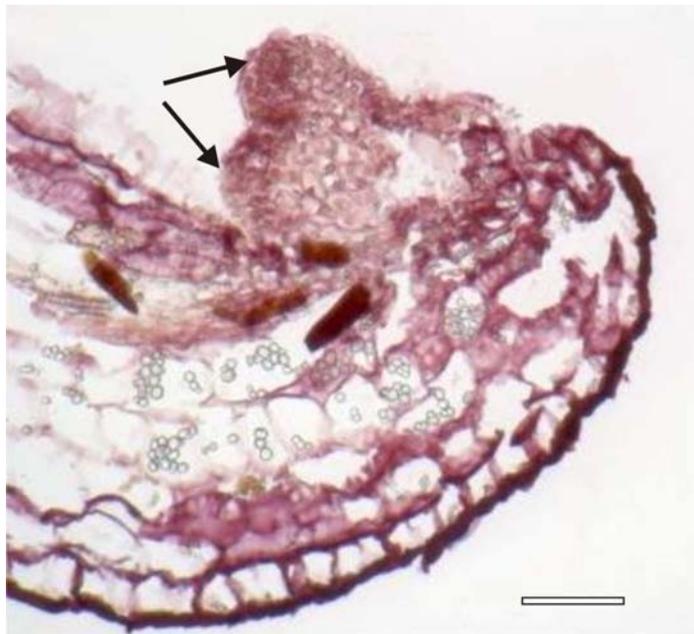


Figura 12- Seção longitudinal mostrando o padrão de expressão de um homólogo do gene *CUC* no 'propágulo foliar' de *B. tubiflorum* em estágio de coração. Setas indicam o local da expressão. Barras=100µm.

O sinal de hibridização *in situ* para o homólogo do gene *YABBY* também foi encontrado na região dos primórdios foliares no 'propágulo' de *B. tubiflorum* na fase de coração (figura 13). Entretanto, o RNAm do homólogo de *YABBY* concentrou-se preferencialmente na porção abaxial dos primórdios e foi excluído da região correspondente ao meristema apical caulinar em formação.

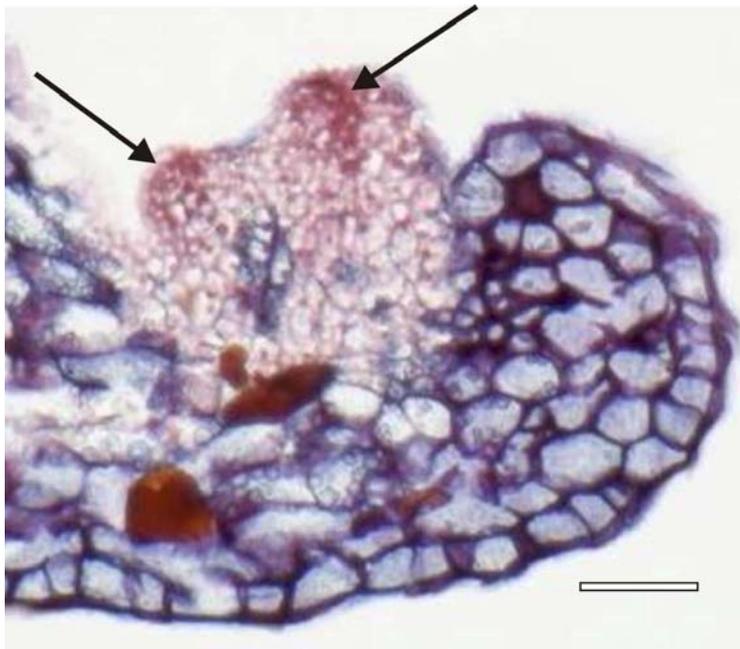


Figura 13- Seção longitudinal mostrando o padrão de expressão do homólogo do gene *YABBY* de *B. tubiflorum* no 'propágulo foliar' em estágio de coração. Setas indicam o local da expressão. Barras=100 μ m.

A expressão do homólogo do gene *LEC1* pôde ser detectada ao longo de todo o desenvolvimento dos 'propágulos foliares' em *B. tubiflorum*. Durante a fase globular e de coração, o sinal de expressão foi detectado na região apical dos 'propágulos', principalmente nas regiões dos primeiros primórdios foliares (figura 14A e 14B), incluindo a região de formação do meristema apical caulinar. A expressão continuou presente na região mais central das folhas quando estas se encontravam mais desenvolvidas, em um estágio posterior ao da formação dos 'propágulos' (figura 14C).

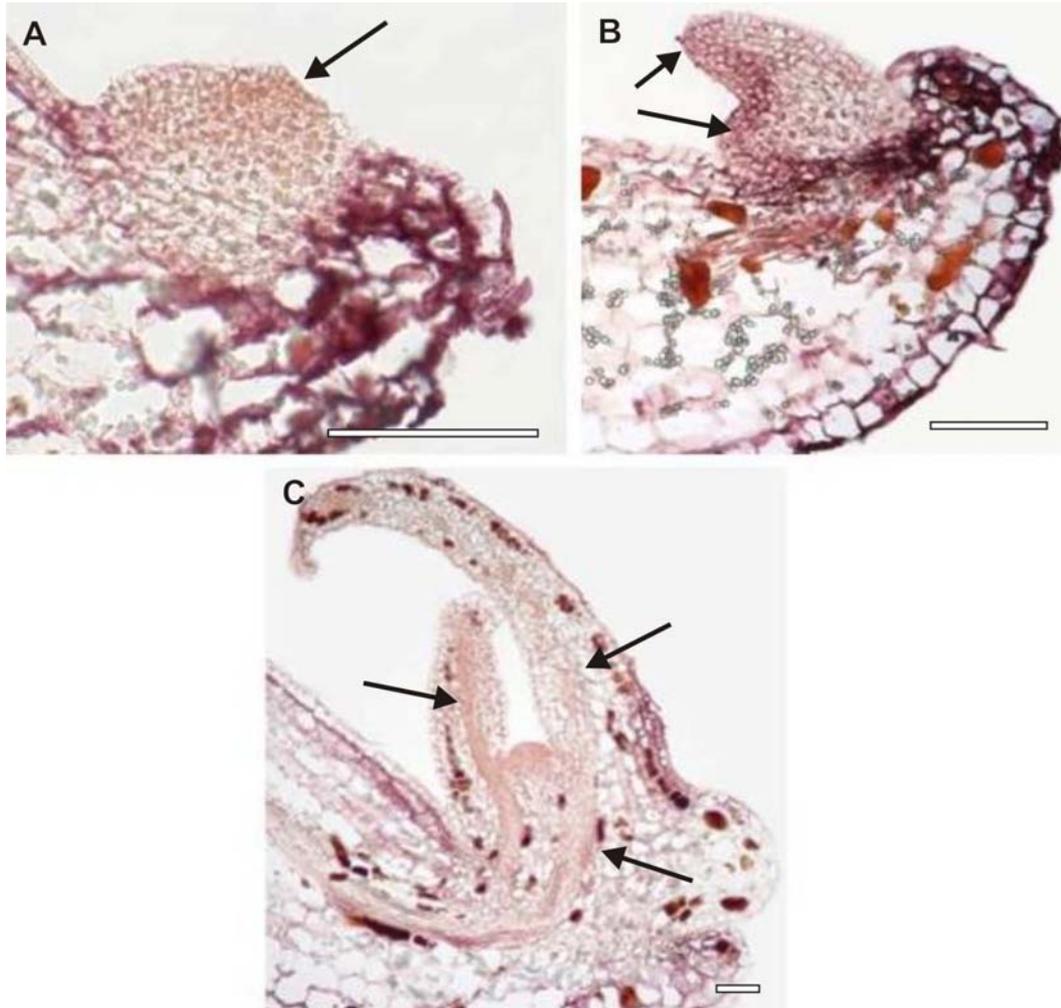


Figura 14- Seção longitudinal do propágulo em diferentes fases de desenvolvimento mostrando o padrão de expressão do homólogo do gene *LEC1* em *B. tubiflorum*. **(A)** 'Propágulo foliar' em estágio globular. **(B)** 'Propágulo' em estágio de coração. **(C)** 'Propágulo' em estágio final de desenvolvimento. Setas indicam o local da expressão. Barras=100 μ m.

5. DISCUSSÃO

Quando analisado anatomicamente, o desenvolvimento dos 'propágulos foliares', tanto em *B. pinnatum* quanto em *B. tubiflorum*, apresenta características ausentes do desenvolvimento de embriões zigóticos clássicos de dicotiledôneas. Considerando-se a definição morfo-anatômica de que o embrião é uma estrutura bipolar, com os meristemas apical caulinar e radicular localizados em extremidades opostas e conectados entre si por tecido condutor e, adicionalmente, sem conexões vasculares com a planta mãe (Long et al., 2002; Batygina, 2005), o processo de desenvolvimento dos 'propágulos foliares' nas espécies do gênero *Bryophyllum* não poderia ser definido como embriogênese.

De fato, os primeiros estudos realizados no início do século XX classificaram o processo de desenvolvimento das estruturas reprodutivas vegetativas de várias espécies do gênero *Bryophyllum* como organogênese (Reed, 1923; Howe, 1931; Stoudt, 1938). Os autores se referiram a esse fenômeno reprodutivo como regeneração de órgãos, e basearam suas conclusões em análises morfo-anatômicas que identificaram as mesmas características observadas neste estudo: formação não-simultânea dos meristemas caulinar e radicular em *B. pinnatum*, além da evidente conexão vascular presente entre os 'propágulos foliares' e a planta mãe, característica observada tanto em *B. pinnatum* como *B. tubiflorum*. Tais peculiaridades anatômicas são, ainda atualmente, consideradas necessárias para a caracterização de uma estrutura como embrião, e corroboram fortemente a idéia de que a reprodução vegetativa no gênero *Bryophyllum* é resultado de um processo organogênico.

Por outro lado, embora a presença de conexão vascular entre a planta mãe e o 'propágulo' seja realmente uma característica incomum para estruturas

embriogênicas, ela não deve ser fator determinante para a classificação dos 'propágulos foliares' no gênero *Bryophyllum*. A embriogênese pode ser facilmente induzida em meios de cultura em diversas espécies, apresentando embriões com morfo-anatomia e desenvolvimento bastante semelhantes ao que são encontrados em embriões zigóticos. Entretanto, a formação de embriões anômalos é um fenômeno comum nos processos de embriogênese somática. Na maior parte dos casos, não há a formação do suspensor em embriões formados *in vitro*. Entretanto, no embrião zigótico, esta estrutura é essencial, tendo função haustorial e de ancoragem (Xu & Bewley, 1992). Além disso, os cotilédones podem se desenvolver concrecidos formando uma estrutura em forma cilíndrica ou de anel no terço superior do embrião. Tais características, no entanto, não impossibilitam a classificação dos embriões somáticos obtidos *in vitro* como tais. Elas apenas refletem certa flexibilidade no programa que controla a embriogênese, mostrando que este pode estar sujeito à modificações e/ou à falhas.

No caso do gênero *Bryophyllum*, o desenvolvimento de estruturas reprodutivas na margem foliar, das espécies estudadas nesse trabalho, já caracteriza uma condição anômala e única no mecanismo reprodutivo adotado por esse gênero.

A formação dos 'propágulos foliares' em *B. pinnatum* apresenta características que podem ser comparadas ao processo de embriogênese zigótica. O desenvolvimento do meristema apical caulinar e as duas estruturas laminares, localizadas em lados opostos do mesmo são, respectivamente, semelhantes ao desenvolvimento do meristema apical caulinar em embriões zigóticos clássicos e às estruturas de cotilédones. Além disso, existe a conexão estabelecida por tecido condutor entre as extremidades caulinar e radicular, fortalecendo a caracterização de

uma estrutura única, que apresenta bipolaridade estabelecida (Naylor, 1932; Yarbrough, 1932, 1934; Batygina, 2005).

B. tubiflorum também apresenta características morfo-anatômicas embriogênicas. Além de desenvolver as estruturas já descritas para *B. pinnatum*, o desenvolvimento dos 'propágulos foliares' em *B. tubiflorum* segue padrões morfológicos semelhantes aos encontrados em embriões zigóticos, podendo dividir o processo de formação dessas estruturas em pelo menos três etapas: inicial globular, de coração e maduro. Essas fases estabelecidas no desenvolvimento desses 'propágulos' em *B. tubiflorum* são muito semelhantes às encontradas ao longo do desenvolvimento embrionário zigótico da planta-modelo *Arabidopsis thaliana*, podendo ser paralelamente comparadas aos embriões nas fases globular, de coração e torpedo (Jenik et al., 2007; Chandler et al., 2008).

Outras similaridades podem ser encontradas quando o processo de formação dos 'propágulos' em *B. tubiflorum* é comparado ao processo de embriogênese em *Arabidopsis*. Muitos genes envolvidos na embriogênese já foram identificados em *Arabidopsis*, estando os padrões de expressão dos mesmos bem determinados (Chandler et al., 2008).

O gene *WUS*, por exemplo, é expresso desde o início da embriogênese em *Arabidopsis*, estando envolvido na formação do meristema apical caulinar. O RNAm de *WUS* possui um padrão de expressão bastante restrito, sendo limitado ao terço superior do embrião (Schoof et al., 2000; Williams et al., 2005; Jenik et al., 2007). Em *B. tubiflorum*, o homólogo de *WUS* expressou-se em células apicais de 'propágulos' em estágios de transição entre a fase globular e de coração, local de desenvolvimento do meristema apical caulinar. Este padrão é bastante semelhante ao descrito para embriões zigóticos (Williams et al., 2005), indicando que o gene

WUS em *B. tubiflorum* apresenta conservação de função quando comparado ao seu homólogo de *Arabidopsis*.

Entretanto, um padrão de expressão adicional foi observado para esse gene em *B. tubiflorum*. Transcritos do homólogo do gene *WUS* em *B. tubiflorum* foram detectados também na planta mãe, na região limite 'propágulo' – folha. Tal padrão de expressão também não é incomum no modelo *Arabidopsis*. Durante o processo de formação *de novo* do meristema apical caulinar *in vitro*, a expressão do gene *WUS* delimita regiões que darão origem aos novos meristemas (Gordon et al., 2007). Posteriormente, com o desenvolvimento dos meristemas apicais caulinares, a expressão de *WUS* é restringida ao centro meristemático, juntamente com os outros genes envolvidos nesse processo.

O padrão de expressão do homólogo ao gene *MP* de *Arabidopsis* também foi analisado em *B. tubiflorum*. O gene *MP* codifica um fator de transcrição modulado por auxina denominado ARF5 (auxin response factor). A atividade da proteína ARF5 é promovida pela presença de auxina, com a ativação conseqüente de cascatas gênicas específicas (Hardtke & Berleth, 1998; Hamann et al., 1999; Hamann et al., 2002). Em *Arabidopsis*, os transcritos de *MP* são expressos na porção central dos embriões globulares e na fase de coração. Na fase de torpedo os mRNAs de *MP* são encontrados ao longo do eixo apical-basal, concentrando-se na região de diferenciação vascular, inclusive nos primórdios dos cotilédones (Hamann et al., 2002).

O padrão de expressão do homólogo do gene *MP* encontrado nos propágulos foliares de *B. tubiflorum* foi bastante semelhante ao descrito para embriões zigóticos de *Arabidopsis* (Hamann et al., 2002). Uma vez que o produto deste gene está relacionado com a resposta ao transporte polar de auxina, o gene *MP* também

contribui para a formação do padrão apical-basal durante a embriogênese. Mutantes *mp* de *Arabidopsis* apresentam embriões mal-formados, sem um eixo apical-basal bem definido (Hardtke & Berleth, 1998). A polarização dos 'propágulos foliares' em *B. tubiflorum* é bem determinada, sugerindo que a expressão do gene *MP* observada ao longo de todo o desenvolvimento do 'propágulo' está relacionada com a instalação e manutenção do padrão apical-basal dos mesmos.

Uma vez que a polaridade é estabelecida, a formação da extremidade caulinar nos 'propágulos foliares' de *B. tubiflorum* também é determinada, sendo o primeiro pólo a ser instalado ao longo do desenvolvimento. Em *Arabidopsis*, um dos genes envolvidos com a formação desse padrão apical caulinar é o *CUC*. Ele está relacionado com a regionalização do terço superior do embrião, sendo fundamental para a separação espacial dos cotilédones. O padrão de expressão desse gene é bem estabelecido: inicialmente os transcritos de *CUC* encontram-se em todo o terço superior do embrião e, posteriormente, concentram-se em um anel de células ao redor do meristema apical caulinar maduro, onde determinam os limites de expressão dos genes responsáveis pela formação do meristema apical caulinar (Aida et al., 1999; Vroemen et al., 2003).

Em *B. tubiflorum*, o homólogo do gene *CUC* expressou-se na região superior do 'propágulo' no início do estágio de coração, com padrão de expressão bem similar ao encontrado em *Arabidopsis*. O gene *CUC* também participa na determinação dos limites dos órgãos durante o desenvolvimento pós-embriônico, participando do processo de compartimentação necessário para a definição de regiões especializadas no corpo da planta (Aida et al., 1999; Vroemen et al., 2003; Gordon et al., 2007).

Genes relacionados à compartimentação e determinação de destinos celulares durante a embriogênese apresentam normalmente alta taxa de conservação funcional entre as espécies vegetais. Dessa maneira, o homólogo do gene *CUC* em *B. tubiflorum* está provavelmente envolvido com a formação e a separação espacial dos primórdios de folhas do 'propágulo', da mesma maneira o gene *CUC* em *Arabidopsis* determina a separação dos cotilédones da região meristemática dos embriões.

Além da separação espacial dos órgãos diferenciados do meristema, a determinação das faces adaxial e abaxial das estruturas aéreas é fundamental para o desenvolvimento das plantas. A expressão do gene *YABBY* especifica o destino celular abaxial em *Arabidopsis* (Siegfried et al., 1999). Durante a embriogênese ele é expresso na região abaxial dos cotilédones, desde o início do desenvolvimento dos primórdios cotiledonares no final da fase globular do embrião (Siegfried et al., 1999). Em *B. tubiflorum* o homólogo do gene *YABBY* é expresso na região abaxial do primeiro par de folhas do 'propágulo' em estágio de coração, com padrão de expressão muito parecido ao encontrado no embrião de *Arabidopsis*.

Garcês et al. (2007) utilizaram a presença dos transcritos de um homólogo de *LEC1*, um gene embrião-específico de *Arabidopsis*, para classificar como embriões somáticos *in planta* os 'propágulos foliares' em *B. daigremontianum*. Nesta espécie, a expressão do homólogo de *LEC1* ocorre no início do desenvolvimento embrionário, durante as fases globular e de coração, tanto em embriões somáticos quanto em embriões zigóticos de *B. daigremontianum* (Garces et al., 2007). Além disso, a expressão de *LEC1* é suficiente para induzir embriões a partir de células somáticas em *Arabidopsis* (Lotan et al., 1998; Gaj et al., 2005).

A expressão do homólogo de *LEC1* também foi analisada em *B. tubiflorum* e a presença de transcritos deste gene pôde ser observada ao longo de todo o desenvolvimento dos 'propágulos foliares'. Como *LEC1* é um gene embrião-específico, este resultado permite sugerir que os 'propágulos foliares' em *B. tubiflorum* são embriões somáticos *in planta*. A formação de embriões a partir de tecido somático em plantas inteiras, não submetidas ao cultivo *in vitro*, é um fenômeno raro, descrito apenas para algumas espécies de orquídeas (Taylor, 1967). *LEC1* provavelmente está relacionado com a regulação inicial de outros genes envolvidos com o processo embriogênico em *B. tubiflorum*.

O padrão de expressão dos homólogos dos genes *WUS*, *MP*, *CUC*, *YABBY* e *LEC1* aliado à análise morfo-anatômica dos 'propágulos foliares' em *B. tubiflorum* possibilitam a comparação do processo de desenvolvimento dessas estruturas reprodutivas com a embriogênese estudadas na planta-modelo *Arabidopsis*. Entretanto, tanto em *B. tubiflorum* quanto em *B. pinnatum*, foram encontradas também características tipicamente organogênicas. Semelhanças durante a organogênese e embriogênese já foram descritas e, aparentemente, esses processos apresentam mecanismos moleculares regulatórios conservados (Batygina, 2005; Xu et al., 2006; Garces et al., 2007). Os elementos moleculares que controlam o desenvolvimento da raiz primária nos embriões de *Arabidopsis*, por exemplo, são os mesmos ativados durante a formação de raízes laterais adventícias e/ou na organogênese *de novo* da raiz, em cultura de tecidos (Xu et al., 2006).

6. CONCLUSÕES

Por longo tempo a formação de 'propágulos foliares' em espécies de *Bryophyllum* foi descrita como organogênese. A partir dos resultados apresentados nesse estudo, a natureza embriogênica dessas estruturas pôde ser sugerida para *B. tubiflorum*.

A embriogênese é sempre descrita como um fenômeno responsável pela geração de uma estrutura bipolar a partir do zigoto ou de uma única célula somática, com os meristemas apicais caulinares e radiculares formados simultaneamente em pólos opostos e conectados por tecido vascular. Entretanto, no caso de *B. tubiflorum*, os embriões se desenvolvem a partir de grupos específicos de células posicionados em regiões determinadas na folha. Além disso, a diferenciação do meristema apical caulinar e radicular não é simultânea. Cada meristema é independentemente formado, separado por um período de tempo.

Adicionalmente, considerando-se que os processos ontogênicos são produtos da expressão diferencial de genes, o padrão de expressão dos homólogos aos genes *WUS*, *MP*, *CUC*, *YABBY* e *LEC1* foram estudados em *B. tubiflorum* e revelaram padrões de expressão conservados, semelhantes aos observados durante os processos embriogênicos na planta modelo *A. thaliana*. Conjuntamente, os resultados da análise morfo-anatômica e os obtidos com a hibridização *in situ*, permitem sugerir que os propágulos foliares observados em *B. tubiflorum* são embriões somáticos formados *in planta*.

Foi observada a ocorrência de fenômenos intermediários entre embriogênese e organogênese no gênero *Bryophyllum*, uma vez que os mesmos mecanismos

moleculares acionados durante a embriogênese zigótica e durante a organogênese foram detectados durante o desenvolvimento dos embriões foliares *in planta*.

Embora análises moleculares não tenham sido realizadas na espécie *B. pinnatum*, semelhanças morfo-anatômicas durante o desenvolvimento foram encontradas entre as duas espécies estudadas. A proximidade filogenética entre elas permite sugerir que os 'propágulos foliares' em *B. pinnatum* são determinados por mecanismos regulatórios comuns, ao menos parcialmente, aos encontrados durante o processo de embriogênese somática *in planta* em *B. tubiflorum*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B** (2004) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* **119**: 109-120
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: An analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* **9**: 841-857
- Aida M, Ishida T, Tasaka M** (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* **126**: 1563-1570
- Batygina T** (2005) Sexual and asexual processes in reproductive systems of flowering plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **47**: 51-60
- Chandler J, Nardmann J, Werr W** (2008) Plant development revolves around axes. *Trends in Plant Science* **13**: 78-84
- Child CM, Bellamy AW** (1920) Physiological isolation by low temperature in *Bryophyllum*. *Botanical Gazette* **70**: 249-267
- DeKlerk GJ, ArnholdtSchmitt B, Lieberei R, Neumann KH** (1997) Regeneration of roots, shoots and embryos: Physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* **39**: 53-66
- Dornelas M, van Lammeren A, Kreis M** (2000) *Arabidopsis thaliana* SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. *The Plant Journal* **21**: 419-429
- Dornelas MC, Wittich P, von Recklinghausen I, van Lammeren A, Kreis M** (1999) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. *Plant Molecular Biology* **39**: 137-147
- Fehér A** (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis* **52**: 53-56
- Freeland RO** (1933) Some morphological and physico-chemical changes accompanying proliferation of *Bryophyllum* leaves. *American Journal of Botany* **20**: 467-480

- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jurgens G** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 147-153
- Gaj MD, Zhang S, Harada JJ, Lemaux PG** (2005) *LEAFY COTYLEDON* genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* **222**: 977-988
- Garces HMP, Champagne CEM, Townsley BT, Park S, Malho R, Pedroso MC, Harada JJ, Sinha NR** (2007) Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 15578-15583
- Garcia-Bellido A** (1996) Symetries through organic evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 14229-14232
- Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, Meyerowitz EM** (2007) Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development* **134**: 3539-3548
- Gross-Hardt R, Laux T** (2003) Stem cell regulation in the shoot meristem. *Journal of Cell Science* **116**: 1659-1666
- Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T** (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**: 657-668
- Hamann T, Benkova E, Baurle I, Kientz M, Jurgens G** (2002) The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting *MONOPTEROS*-mediated embryo patterning. *Genes & Development* **16**: 1610-1615
- Hamann T, Mayer U, Jurgens G** (1999) The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **126**: 1387-1395
- Hardtke CS, Berleth T** (1998) The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *Embo Journal* **17**: 1405-1411
- Howe MD** (1931) A morphological study of the leaf notches of *Bryophyllum calycinum*. *American Journal of Botany* **18**: 387-390

- Huang BQ, Russell SD** (1992) Female germ unit - Organization, isolation and function. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* **140**: 233-293
- Huber JD, Parker F, Odland GF** (1968) A basic fuchsin alkalized methylene blue rapid stain for epoxy-embedded tissue. *Stain Technology* **43**: 83-87
- Jenik PD, Gillmor CS, Lukowitz W** (2007) Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**: 207-236
- Kepinski S, Leiser O** (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**:446-451
- Levesque MP, Vernoux T, Busch W, Cui HC, Wang JY, Blilou I, Hassan H, Nakajima K, Matsumoto N, Lohmann JU, Scheres B, Benfey PN** (2006) Whole-genome analysis of the *SHORT-ROOT* developmental pathway in *Arabidopsis*. *Plos Biology* **4**: 739-752
- Loeb J** (1915) Rules and mechanism of inhibition and correlation in the regeneration of *Bryophyllum calycinum*. *Botanical Gazette* **60**: 249-276
- Loeb J** (1916) Further experiments on correlation of growth in *Bryophyllum calycinum*. *Botanical Gazette* **62**: 293-302
- Loeb J** (1918) Chemical basis of correlation I. Production of equal masses of shoots by equal masses of sister leaves in *Bryophyllum calycinum*. . *Botanical Gazette* **65**: 150-174
- Long JA, Woody S, Poethig S, Meyerowitz EM, Barton K** (2002) Transformation of shoots into roots in *Arabidopsis* embryos mutant at the *TOPELESS* locus. *Development* **129**: 2797-2806
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MAL, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (1998) *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**: 1195-1205
- Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jurgens G, Laux T** (1998) Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**: 805-815
- Mehrlich FP** (1931) Factors affecting growth from the foliar meristems of *Bryophyllum calycinum*. *Botanical Gazette* **92**: 0113-0140

- Naylor E** (1932) The morphology of regeneration in *Bryophyllum calycinum*.
American Journal of Botany **19**: 32-40
- Passarinho P, Ketelaar T, Xing MQ, van Arkel J, Maliepaard C, Hendriks MW, Joosen R, Lammers M, Herdies L, den Boer B, van der Geest L, Boutilier K** (2008) *BABY BOOM* target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. Plant Molecular Biology **68**: 225-237
- Reed E** (1923) Hypothesis of formative stuffs as applied to *Bryophyllum calycinum*.
Botanical Gazette **75**: 113-142
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B** (2003) *SCARECROW* is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. Genes & Development **17**: 354-358
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jurgens G, Laux T** (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. Cell **100**: 635-644
- Siegfried KR, Eshed Y, Baum SF, Otsuga D, Drews GN, Bowman JL** (1999) Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. Development **126**: 4117-4128
- Stoudt HN** (1938) Gemmipary in *Kalanchoe rotundifolia* and other Crassulaceae.
American Journal of Botany **25**: 106-110
- Taylor RL** (1967) The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. Canadian journal of Botany **45**: 1553-1556
- Vroemen CW, Mordhorst AP, Albrecht C, Kwaaitaal M, de Vries SC** (2003) The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. Plant Cell **15**: 1563-1577
- Weigel D, Jürgens G** (2002) Stem cells that make stems. Nature **415**: 751-754
- Williams L, Grigg SP, Xie MT, Christensen S, Fletcher JC** (2005) Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA *miR166g* and its *AtHD-ZIP* target genes. Development **132**: 3657-3668
- Xu J, Hofhuis H, Heidstra R, Sauer M, Friml J, Scheres B** (2006) A molecular framework for plant regeneration. Science **311**: 385-388

- Xu NF, Bewley JD** (1992) Constrasting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfafa (*Medicago sativa*) as revealed by scanning electron microscopy Plant Cell Reports **11**: 279-284
- Yadegari R, Drews GN** (2004) Female gametophyte development. Plant Cell **16**: S133-S141
- Yarbrough JA** (1932) Anatomical and developmental studies of the foliar embryos of *Bryophyllum calycinum*. American Journal of Botany **19**: 443-453
- Yarbrough JA** (1934) History of leaf development in *Bryophyllum calycinum*. American Journal of Botany **21**: 467-484
- Zhang S, Wong L, Meng L, Lemaux PG** (2002) Similarity of expression patterns of *knotted 1* and *ZmLEC1* during somatic and zygotic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). Planta **215**: 191-194