

Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento III



Organizadores

Milene Miranda Praça Fontes

Silvia Tamie Matsumoto

Tatiana da Silva Souza

Tatiana Tavares Carrijo



CCAЕ
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGRÁRIAS E ENGENHARIAS



Organizadores

Milene Miranda Praça Fontes

Silvia Tamie Matsumoto

Tatiana da Silva Souza

Tatiana Tavares Carrijo

**Tópicos Especiais em
Genética e Melhoramento III**

Alegre, ES

CAUFES

2020

Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento
CCAUE-UFES

Centro de Ciências Agrárias e Engenharias
Universidade Federal do Espírito Santo
Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre-ES
Telefone: (28) 3552-8955 – Fax (28) 3552-8903
<http://www.alegre.ufes.br/>

ISBN: 978-65-86981-10-0

Editora: CAUFES

Dezembro 2020

Diagramação:

Wagner Nunes Rodrigues

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Tópicos especiais em genética e melhoramento III
[livro eletrônico] / organizadores Milene Miranda
Praça Fontes ... [et al.]. -- Alegre : CAUFES, 2020.
PDF

Vários autores.

Outros organizadores: Silvia Tamie Matsumoto,
Tatiana da Silva Souza, Tatiana Tavares Carrijo

Bibliografia.

ISBN 978-65-86981-10-0

1. Genética vegetal 2. Plantas - Melhoramento
genético I. Fontes, Milene Miranda Praça.
II. Matsumoto, Silvia Tamie. III. Souza,
Tatiana da Silva. IV. Carrijo, Tatiana Tavares.

20-51618

CDD-631.5233

Índices para catálogo sistemático:

1. Plantas : Melhoramento genético : Agricultura
genética 631.5233

Cibele Maria Dias - Bibliotecária - CRB-8/9427

Os textos apresentados nessa edição são de inteira responsabilidade dos autores. Os organizadores não se responsabilizam pela revisão ortográfica e gramatical dos trabalhos apresentados. Não é permitida a reprodução total ou parcial desta publicação sem a autorização expressa dos organizadores.

PREFÁCIO

Sinto-me muito honrada em prefaciar esta edição do livro “Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento III”. Este livro é a continuidade de um projeto iniciado em 2013 e, em 2020, foi escrito por docentes, discentes, egressos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFES (PPGGM/UFES - Alegre), além de outros autores convidados. Assim, escrevo estas linhas como quem já contribuiu em outras edições e, também, como quem é, de certa forma, uma curiosa aprendiz de assuntos relacionados à grande área da Genética. Estudar Genética foi uma escolha que fiz muito precocemente e sinto-me orgulhosa por poder contribuir com pequenas gotas neste grande oceano de conhecimento. Assim, eu me coloco na situação de quem tem o privilégio de poder fazer uma leitura antecipada, para dizer aos leitores o que aprendi, encontrei ou descobri nesta obra.

A edição 2020 de “Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento III” é composta por 14 capítulos, que versam sobre temas muito atuais em genética, tais como genômica, epigenômica e metabolômica, além de tratar sobre os componentes da diversidade química, fisiológica, ecológica e genética que podem ser aplicados à conservação de espécies e ao melhoramento genético. Todos os temas abordados apresentam caráter atual e sintetizam conhecimentos adquiridos por meio de pesquisas qualitativas e quantitativas, todas realizadas na área de Genética e Melhoramento de Plantas, contemplando os aspectos mais atuais e inovadores desta importante área das Ciências Agrárias e Biológicas.

É importante mencionar o caráter interdisciplinar e multidisciplinar deste livro, em que são tratados assuntos relacionados a conservação da variabilidade genética e química de espécies de interesse agrônomo e silvestres. Inclui-se ainda a proteção e cultivo de espécies raras, ameaçadas de extinção, ou econômica e ecologicamente importantes para a restauração e reabilitação dos ecossistemas. Também foram desenvolvidos estudos de naturezas diversas, que gerem

informações, em nível morfológico, bioquímico, molecular, citotaxonômico, reprodutivo e biogeográfico, contribuindo para a caracterização dos recursos genéticos, que podem subsidiar pesquisas e políticas voltadas à conservação de germoplasma.

O lançamento dessa obra vem proporcionar aos professores, mestrandos, doutorandos, pesquisadores e estudantes em geral um fácil acesso ao “estado da arte” dos diferentes assuntos abordados, levando o leitor até a “fronteira do conhecimento” de alguns tópicos, por meio da apresentação de dados referentes às pesquisas realizadas no âmbito do PPGGM. Assim, este livro consolida-se como uma ferramenta útil aos que buscam incessantemente ampliar e consolidar seus conhecimentos.

Ressalta-se também que esta obra cumpre, de certa forma, um papel relacionado à divulgação científica, uma vez que culmina com o repasse de informações de qualidade, porém de mais fácil compreensão do que muitos artigos científicos e outros relatórios de pesquisa que são mensalmente publicados em periódicos. Isso torna a obra particularmente atraente aos leitores que estão iniciando a sua carreira de pesquisa na área de Genética e Melhoramento, ou mesmo aos leigos, que buscam conhecer mais sobre esta grande área, por sumarizar conceitos e princípios, além de revisar e contextualizar diferentes pesquisas realizadas para cada tópico abordado.

Com a honra e a satisfação de escrever essas linhas para o prefácio desta obra, convido-lhes a mergulhar na leitura destas páginas repletas de conhecimento.

Maria Andréia Corrêa Mendonça
Doutora em Genética e Melhoramento
Professora EBTT do IF Goiano – Rio Verde

LISTA DE AUTORES

Adeilson Frias Dornela. Biólogo. Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: adeilson.fd@hotmail.com.

Adelson Lemes da Silva Júnior. Biólogo. Doutorando em Genética e Melhoramento. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: adelsonlemes@yahoo.com.br.

Adésio Ferreira. Engenheiro Agrônomo. Doutor em Genética e Melhoramento. Professor Associado III. Departamento de Agronomia. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: adesioferreira@gmail.com.

Alda Francisca Rodrigues de Sousa Fernandes. Bióloga. Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: aldarodriguesbio@gmail.com (Bolsista FAPES).

Aline dos Santos Bergamin. Graduanda em Agronomia. Departamento de Agronomia. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: alinebergamin258@hotmail.com

Amélia Carlos Tuler. Bióloga. Doutora em Botânica. Pesquisadora Bolsista PCI. Instituto Nacional da Mata Atlântica (INMA). E-mail: ameliatuler@gmail.com

Andreia Carina Turchetto-Zolet. Bióloga. Doutora em Genética e Biologia Molecular. Professora Adjunta II. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Departamento de Genética. Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mails: carina.turchetto@ufrgs.br; aturchetto@gmail.com.

Bruno Paes de Melo. Bioquímico. Doutor em Bioquímica Aplicada. Pós-doutorando na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Unidade: Recursos

Genéticos e Biotecnologia. Brasília – Distrito Federal. E-mail: brunopaesdemelo@gmail.com

Cristiana Torres Leite. Bióloga. Mestre em Genética e Melhoramento. Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: cristianatorresleite@hotmail.com.

Darley Aparecido Tavares Ferreira. Biólogo. Doutor em Genética e Melhoramento. Professor Substituto. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade do Estado de Mato Grosso. E-mail: darley.ferreira@unemat.br

Dener Cezati Canal. Graduando em Sistemas de Informação. Bolsista FAPES de Iniciação Científica no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Departamento de Computação. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: denercanal@hotmail.com.

Drielli Canal. Bióloga. Doutoranda em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Email: drielliufes@gmail.com

Elias Terra Werner. Biólogo. Doutor em Produção Vegetal. Professor Adjunto II. Departamento de Biologia. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: elias.werner@ufes.br.

Fabiano Costa Santiliano. Biólogo. Mestre em Biociências e Biotecnologia. Docente do Instituto Federal do Espírito Santo – Venda Nova do Imigrante. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: santiliano.ifes@gmail.com

Fábio Demolinari de Miranda. Biólogo. Doutor em Genética e Melhoramento. Professor Adjunto IV. Departamento de Biologia. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: fademolinari@yahoo.com.br.

Francielen Barroso Aragão. Bióloga. Doutoranda em Biologia Vegetal. Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal – UFES. E-mail: francielenaragao@gmail.com. Bolsista Capes.

Francine Alves Nogueira de Almeida. Bióloga. Mestra em Biotecnologia. Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail:frannogueir@yahoo.com.br

Ian Drumond Duarte. Biólogo. Doutor em Biologia Vegetal. Professor efetivo na Secretaria da Educação do Estado do Espírito Santo. E-mail: iandduarte@gmail.com

Iasmini Nicoli Galter. Bióloga. Doutoranda em Genética e Melhoramento. Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento – UFES. E-mail: iasmininicoligalter@gmail.com. Bolsista Fapes/Capes.

Isabel Samila Lima Castro. Bióloga. Doutora em Genética e Melhoramento. Pós-doutoranda do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: isabel.castro@ufv.br

Isane Vera Karsburg. Bióloga. Doutora em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa. Professora Adjunta da Universidade do Estado de Mato Grosso. E-mail: isane.karsburg@unemat.br

João Paulo de Moraes Oliveira. Engenheiro Agrônomo. Doutor em Produção Vegetal. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: joaopaulo.ueg@gmail.com

Jônatas Gomes Santos. Biólogo. Mestrando em Genética e Melhoramento. Departamento de Agronomia. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: gomesjonatas21@gmail.com

Larissa Fonseca Andrade Vieira. Bióloga. Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas. Professora Adjunto II. Departamento de Biologia. Instituto de Ciências Naturais. Universidade Federal de Lavras. E-mail: larissa.vieira@ufla.br.

Layra de Medeiros Cardozo. Farmacêutica. Mestranda no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: layra.cardozo@edu.ufes.br

Liliana Aparecida Ribeiro Martins. Bióloga. Doutora em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: lilianaribeiro235@gmail.com.

Lindisai Fernandes. Engenheira Agrônoma. Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade do Estado de Mato Grosso E-mail: lindisai@hotmail.com

Loren Cristina Vasconcelos. Bióloga. Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: loren-vasconcelos@hotmail.com (Bolsista FAPES).

Luana Walquíria dos Santos. Bióloga. Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Departamento de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: luana.walquiria@ufv.br.

Lucimara Cruz de Souza. Bióloga. Mestre em Genética e Melhoramento. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: lucimaracruz@yahoo.com

Luina Ribeiro Noia. Agrônoma. Doutoranda em Agronomia. Departamento de Agronomia. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. Email: luina.noia@ufes.br

Luiz Fernando de Camargos. Bioquímico. Doutor em Bioquímica Aplicada. Professor EBTT-DI. Núcleo de Ciências Biológicas. Instituto Federal Goiano – campus Urutaí. E-mail: luiz.camargos@ifgoiano.edu.br

Luiza Alves Mendes. Química. Doutoranda em Agroquímica. Departamento de Química. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: luiza.alves@ufv.br

Marcia Flores da Silva Ferreira. Bióloga. Doutora em Genética e Melhoramento. Professora Associada II. Departamento de Agronomia. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: marcia.ferreira@ufes.br, Bolsista Produtividade em Pesquisa

Marcos Vinicius Winckler Caldeira. Engenheiro Florestal. Doutor em Ciências Florestais. Professor Associado III. Departamento de Ciências Florestais e da Madeira. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: mvwcaldeira@gmail.com. Bolsista de Produtividade em Pesquisa.

Maria Aparecida Marin Morales. Bióloga. Doutora em Ciências Biológicas; Professor Associado. Departamento de Biologia Geral e Aplicada. Instituto de Biociências de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP-SP. E-mail: marin.morales@unesp.br. Bolsista de Produtividade em Pesquisa 1B.

Maria Eliza Soares Queiroz. Graduanda em Ciências Biológicas e bolsista de iniciação científica no laboratório de citogenética e cultura de tecidos da Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: mariaelizasqueiroz@gmail.com

Mariana Cansian Sattler. Bióloga. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Departamento de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: mariana.sattler@ufv.br.

Mariana Neves Catrinck. Química. Doutora em Agroquímica com ênfase em Química Analítica. Pós-doutoranda do Programa de Genética e Melhoramento. Departamento de Agronomia. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: mncatrinck@gmail.com.

Milene Miranda Praça Fontes. Bióloga. Doutora em Genética e Melhoramento. Professora Associada II. Departamento de Biologia. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: milene.fontes@ufes.br.

Miquéias Fernandes. Analista de Sistemas. Mestre em Genética e Melhoramento. Doutorando em Bioinformática no Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Departamento de Biologia. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: miqueias@ufmg.br.

Paola de Avelar Carpinetti. Bioquímica. Doutora em Ciências com ênfase em Bioquímica. Pesquisadora Colaboradora. Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Federal do Espírito Santo – campus Alegre. E-mail: paolacarpinetti@alumni.usp.br

Pedro Henrique Dias dos Santos. Engenheiro Agrônomo. Doutor em Produção Vegetal. Pesquisador Pós-Doc no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. E-mail: pedroh_dias@hotmail.com

Silvia Tamie Matsumoto. Bióloga. Doutora em Genética. Professora Associado IV. Departamento de Ciências Biológicas. Centro de Ciências Humanas e Naturais. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: siltamie@gmail.com

Taís Cristina Bastos Soares. Farmacêutica Bioquímica. Doutora em Bioquímica Agrícola. Professora Associado IV. Departamento de Farmácia e Nutrição. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: tcbsoares@gmail.com. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Thaís Lazarino Maciel da Costa. Bióloga. Doutoranda em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: thais.l.maciel@edu.ufes.br.

Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Farmacêutico. Doutor em Bioinformática. Pós-doutor em Bioquímica e Imunologia. Professor Adjunto I. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: tiagoamendes@ufv.br. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq na área de Biotecnologia.

Vinicius Sartori Fioresi. Biólogo. Mestrando em Agronomia. Departamento de Agronomia. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: vinicius.fioresi@edu.ufes.br

Wellington Ronildo Clarindo. Biólogo. Doutor em Genética e Melhoramento. Departamento de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: well.clarindo@ufv.br.

Weslaine de Almeida Macedo. Bióloga. Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas. Doutoranda em Genética e Melhoramento. Universidade Estadual de Maringá. E-mail: weslaine.af@hotmail.com

Yumi Sheu. Bióloga. Bióloga. Doutora em Genética e Melhoramento. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo. E-mail: yumi.sheu@edu.ufes.br.

SUMÁRIO

- 1. A família de genes terpeno sintase em Myrtaceae: importância evolutiva e adaptativa 1**
Drielli Canal, Andreia Carina Turchetto-Zolet, Paola de Avelar Carpinetti, Pedro Henrique Dias dos Santos & Marcia Flores da Silva Ferreira
- 2. Análise metabolômica aplicada a genética e melhoramento de plantas 35**
Mariana Neves Catrinck, Isabel Samila Lima Castro, Vinicius Sartori Fiorese, Jônatas Gomes Santos & Tiago Antônio de Oliveira Mendes
- 3. A nutrição mineral como ferramenta para melhorar as características físico-químicas dos grãos do café bem como a qualidade de bebida 66**
Lucimara Cruz de Souza, Fabiano Costa Santiliano & Taís Cristina Bastos Soares
- 4. Estresse abiótico em plantas e seus marcadores 86**
Paola de Avelar Carpinetti, Bruno Paes de Melo, Vinicius Sartori Fiorese & Luiz Fernando de Camargos
- 5. Implicações evolutivas sobre a diversificação de bromélias residentes em *Inselbergs* na Floresta Atlântica 118**
Yumi Sheu, Liliana Aparecida Ribeiro Martins, Thaís Lazarino Maciel da Costa & Taís Cristina Bastos Soares
- 6. Terpenos em Myrtaceae: potenciais para a genética e melhoramento 151**
Marcia Flores da Silva Ferreira, Luiza Alves Mendes, Layra de Medeiros Cardozo, Luina Ribeiro Noia & Amélia Carlos Tuler

- 7. Aspectos epigenéticos da embriogênese somática em plantas..... 194**
Cristiana Torres Leite, Elias Terra Werner, João Paulo de Morais Oliveira,
Aline dos Santos Bergamin & Milene Miranda Praça Fontes

- 8. Embriogênese somática: aspectos gerais e regulação 229**
Adeilson Frias Dornela, Luana Walquíria dos Santos, Mariana Cansian
Sattler & Wellington Ronildo Clarindo

- 9. *Lactuca sativa* L.: bioindicador vegetal para prospecção de
toxicidade e atividade enzimática de fungicidas..... 257**
Francielen Barroso Aragão, Iasmini Nicoli Galter, Ian Drumond Duarte,
Maria Aparecida Marin Morales, Larissa Fonseca Andrade Vieira & Silvia
Tamie Matsumoto

- 10. Número cromossômico e conteúdo de dna nuclear do gênero
Peperomia (Piperaceae): o estado da arte..... 290**
Alda Francisca Rodrigues de Sousa Fernandes, Loren Cristina Vasconcelos,
Maria Eliza Soares Queiroz, Darley Aparecido Tavares Ferreira & Milene
Miranda Praça Fontes

- 11. O gênero *Costus* (Costaceae)..... 312**
Weslaine de Almeida Macedo, Lindisai Fernandes & Isane Vera Karsburg

- 12. Estudos filogeográficos utilizando dados de GBS..... 334**
Francine Alves Nogueira de Almeida & Pedro Henrique Dias dos Santos

- 13. Marcadores *Simple Sequence Repeats* aplicados a utilização
convencional e por fluorescência..... 355**
Adelson Lemes da Silva Júnior, Fábio Demolinari de Miranda & Marcos
Vinicius Winckler Caldeira

- 14. Montagem e anotação de genoma de plantas..... 369**
Miquéias Fernandes, Dener Cezati Canal, Tiago Antônio de Oliveira
Mendes & Adésio Ferreira

A FAMÍLIA DE GENES TERPENO SINTASE EM MYRTACEAE: IMPORTÂNCIA EVOLUTIVA E ADAPTATIVA

Drielli Canal

Andreia Carina Turchetto-Zolet

Paola de Avelar Carpinetti

Pedro Henrique Dias dos Santos

Marcia Flores da Silva Ferreira

1. INTRODUÇÃO

Os terpenos compreendem a classe de metabólitos secundários mais numerosa e estruturalmente diversa do reino vegetal. São caracterizados como compostos orgânicos de esqueleto carbônico e classificados quanto ao número de unidades de isopreno em sua estrutura (ZWENGER & BASU, 2008). Nas plantas desempenham papéis como metabólitos primários, atuando no crescimento vegetal na forma de derivados de intermediários isoprenóides tais como giberelina, brassinosteroide e ácido abscísico, constituintes das membranas celulares tais como esteróis, derivados de pigmentos fotossintéticos como carotenóides e clorofilas, entre outros (LANGE & GHASSEMIANET, 2003). Quando produzidos como metabólitos secundários podem estar envolvidos em resposta a estímulos bióticos, desempenhando importantes papéis ecológicos na interação planta e ambiente, como ataques diretos de herbívoros e patógenos ou indiretamente atraindo seus inimigos naturais e mediando interações com polinizadores (PICHERSKY & GERSHENZON, 2002).

Os terpenos também estão envolvidos na resposta das plantas a estresses abióticos, por exemplo, proteção contra raios ultravioleta-B (UV-B) e alta temperatura, que resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) (LORETO et al., 2010; TAKSHAK et al., 2019). Por fim, apresentam importância econômica devido à sua utilização com fins farmacêuticos,

terapêuticos, industriais, precursores de biocombustíveis, solventes, além de influenciarem a fragrância e o sabor de muitos produtos (TETALI, 2019; PERALTA-YAHYA et al., 2012; BOOTH & BOHLMANN, 2019).

A relevância dos terpenos no metabolismo secundário das plantas é observada através das variações inter e intraespecíficas e complexidade das moléculas encontradas (KESZEI et al., 2008; PADOVAN, et al., 2012), que podem ser atribuídas a um conjunto de enzimas denominadas terpeno sintases, as quais utilizam múltiplos substratos para a produção de uma ampla gama de produtos (ZHOU et al., 2020). A grande variação observada na composição de terpenos também pode ser explicada pelas vias de biossíntese desses compostos estarem condicionadas a variações do genoma do organismo, acumuladas ao longo de milhares de anos desde a especiação (CHEN et al., 2011). A família de genes codificadores das terpeno sintase, família de genes TPS, é amplamente diversificada nos organismos, variando em espécies onde o número de genes foi drasticamente reduzido, como apenas 3 TPS encontrados *Physcomitrella patens* (briófita) e nas monocotiledôneas aquáticas apenas 2 TPS em *Zostera marina* e 6 TPS em *Spirodela polyrhiza*, e os maiores números de genes TPS completos relatados nas monocotiledôneas e eudicotiledôneas, *Panicum virgatum* com 79 genes e *Eucalyptus grandis* com 70 genes, respectivamente (JIANG et al., 2019). Progressos substanciais na última década no isolamento e caracterização de genes responsáveis pela formação de compostos voláteis tem facilitado a investigação da regulação da biossíntese de terpenos em plantas.

Espécies da família Myrtaceae, destacam-se por possuírem os maiores números de genes terpeno sintase nas eudicotiledôneas (JIANG et al., 2019). As espécies desta família são famosas pelas altas concentrações de terpenos foliares, grande variação quimiotípica e interesse industrial nos compostos terpênicos presentes nos óleos essenciais dessas espécies, devido às propriedades inseticida, parasiticida, antifúngica, antibacteriana, antimicrobiana e antioxidante (DA SILVA et al., 2018, KESZEI et al., 2010; PADOVAN et al., 2014). Embora a grande quantidade de genes e variabilidade qualitativa relacionada aos tipos de terpenos presentes em óleos essenciais foliares de espécies de Myrtaceae, é notável a predominância quantitativa de monoterpenos majoritários em espécies de ocorrência em florestas dos trópicos secos e zonas temperadas, bem como a

presença de majoritários sesquiterpenos em espécies de ocorrência neotropical (PADOVAN et al., 2014). Adicionalmente, embora em Myrtaceae seja característico a presença de estruturas relacionadas à produção e ao armazenamento de óleos essenciais, é também notável a expressão diversificada de genes em múltiplos órgãos da planta, refletindo em alterações nas síntese dos compostos químicos, e consequentemente nas interações com os organismos (BUSTOS-SEGURA et al., 2017; PADOVAN et al., 2015).

Em virtude da complexidade e importância da atuação dos terpenos no desenvolvimento e nas relações planta-ambiente, este capítulo faz um levantamento sobre o conhecimento atual da família de genes TPS envolvidos na biossíntese de terpenos em plantas, com enfoque na família Myrtaceae, explorando mecanismos evolutivos e de expressão gênica que auxiliam na compreensão da variabilidade química dos compostos dos óleos essenciais encontrados nessas espécies, e que ajudam a explicar o padrão de ocorrência dos óleos essenciais nessas espécies.

2. BIOSÍNTESE DE TERPENOS

A maioria das enzimas terpeno sintases catalisa a conversão de alguns substratos comuns em diversas estruturas terpênicas encontradas nos óleos essenciais de plantas, principalmente devido a mecanismos de reação que envolvem a formação de carbocátions intermediários, com ciclizações, mudanças de hidreto, rearranjos de esqueleto e diferentes etapas de terminação (JIANG et al., 2019; CHRISTIANSON et al., 2006). Os produtos destas enzimas podem ainda ser modificados por oxigenação pela ação de monooxigenases do citocromo P450, ou metilação por metil-transferases, para formar compostos adicionais (FÄHNRIK et al., 2011).

A biossíntese de terpenos tem como precursores duas moléculas de cinco carbonos em seu esqueleto: isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Figura 1). Os precursores se combinam por meio de reações de condensação para formar o geranyl difosfato (GPP) precursor dos monoterpenos (C₁₀) e trans-geranylgeranyl difosfato (GGPP) precursor dos diterpenos (C₂₀). Nas plantas, esses precursores são formados na via do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) localizada nos plastídios. Enquanto a via do ácido mevalônico (MVA) é

responsável pela produção de transfarnesil difosfato (FPP) usado na síntese de sesquiterpenos (C₁₅) e triterpenos (C₃₀), no citosol, retículo endoplasmático e peroxissomos (VRANOVA et al., 2013). Estudos demonstraram que existe uma interligação (*cross-talk*) das vias e consequente troca de precursores prenil difosfato entre plastídeos e citosol, tornando ainda mais ampla a especificidade do substrato (PAZOUKI & NIINEMETZ, 2016; JIA et al., 2016).

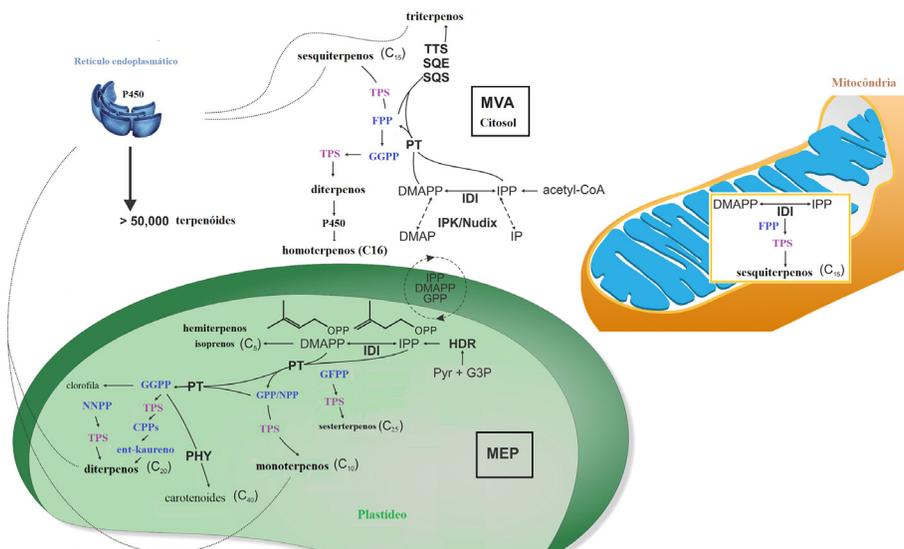


Figura 1. Esquema geral das vias de biossíntese de terpenos em plantas. Todos os terpenóides são derivados de dois precursores isoméricos contendo 5 carbonos, isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP). A condensação de IPP e DMAPP produz os precursores prenil difosfato que estão destacados entre em azul (FPP farnesil difosfato, GPP geranyl difosfato, NPP neril difosfato, GFPP geranylfarnesil difosfato, NNPP nerilneril difosfato, GGPP geranylgeranyl difosfato). Os genes TPS codificadores das enzimas estão destacados em roxo e os principais produtos formados em negrito. IDI isopentenil difosfato isomerase, PT prenil transferase, IP isopentenil monofosfato, CPPs ent-copalil difosfato (CPP) sintases. Modificado de KARUNANITHI & ZERBE, 2019.

Grande parte dos trabalhos atuais concentrou na identificação de genes que codificam para enzimas terpeno sintase (TPS), as quais podem não só controlar a

quimiodiversidade de terpenos presentes nas plantas, mas também são responsáveis pela composição única de cada táxon (BOHLMANN et al., 1998). Os avanços nas pesquisas incluem estudos envolvendo caracterização dos genes TPS nos genomas completos disponíveis em bancos de dados (JIANG et al., 2019). Paralelamente aos genomas completos, a análise baseada na identificação de genes TPS em transcriptomas também tem sido realizada, incluindo espécies não modelo (DREW et al., 2013). Além disso, o isolamento e a análise de genes TPS individuais incluindo análise funcional de suas enzimas foram relatados para várias espécies de plantas, incluindo morango (AHARONI et al., 2003), manjerição (IIJIMA et al., 2004), orégano (CROCOLL et al., 2010) e algodão (YANG et al., 2013). Uma melhor compreensão da biossíntese dessas enzimas pode permitir que a ampla variação genética seja explorada para ganho econômico e auxiliar na mediação de interações ecológicas.

3. GENES TERPENO SINTASES EM PLANTAS

Os genes terpeno sintase apresentam dois domínios funcionais: o N-terminal (contendo o domínio β e γ , com Pfam ID PF01397) e o C-terminal (ou domínio α , com Pfam ID PF03936). Em relação a estes domínios os genes podem ser funcionais completos (*full-length*), quando apresentam ambos os domínios na sequência gênica e proteica, ou parciais, quando apresentam apenas um dos dois domínios (FINN et al., 2010; ZHOU et al., 2020). O domínio N-terminal apresenta um motivo conservado RRX_8W (R, arginina, W, triptofano e X, aminoácido alternativo) e o domínio C-terminal contém dois motivos ricos em aspartato, um altamente conservado DDxxD e um menos conservado NSE/DTE. Esses dois motivos flanqueiam a entrada do sítio ativo e são responsáveis por auxiliar no posicionamento do substrato difosfato, coordenação de íons divalentes e moléculas de água, além de estabilizarem o sítio ativo (CHRISTIANSON et al., 2006). Em plantas, a perda de um dos domínios frequentemente ocorre em muitas espécies, o que foi provavelmente desencadeado por mecanismos de duplicação parcial. A funcionalidade desses TPSs contendo um único domínio ainda é desconhecida (JIANG et al., 2019).

A classificação dos genes TPS pode ser baseada em sua estrutura, onde a classe I contém de 12-15 éxons, a classe II com 10 éxons e a classe III com apenas sete éxons, ocorrendo um processo de perda de introns e perda de um domínio interno. Mas há algumas exceções, genes de terpeno sintase que variam em estrutura em relação à classificação geral (TRAPP & CROTEAU, 2001).

A localização subcelular e disponibilidade de substratos são essenciais para determinação da significância biológicas das atividades TPS in vivo. Todos os terpenos, com exceção de sesquiterpenos (C15), são produzidos no cloroplasto, portanto a maioria dos genes relacionados a síntese de monoterpenos deve conter um peptídeo de trânsito de cloroplasto (*chloroplast transit peptide sequences*; cTPs) geralmente localizado na região N-terminal (KÜLHEIM et al., 2015). Por este motivo quando codificados em proteínas, os monoterpenos apresentam tamanho entre 600 a 650 resíduos de aminoácidos. Como a biossíntese de sesquiterpenos ocorre no citosol, elas não apresentam peptídeo sinal e são cerca de 50-70 aminoácidos mais curtas que as monoterpenos sintases (BOHLMANN et al., 1998).

Ainda de acordo com suas relações filogenéticas, a família de genes TPS é dividida em seis subfamílias (Tabela 1) (CHEN et al., 2011). Dentro da classe I envolvida na síntese de metabólitos primários, encontramos a subfamília TPS-c, conservada em plantas terrestres e representando o grupo externo (outgroup) das relações filogenéticas, caracterizada pelo motivo “DXDD” e codifica enzimas do tipo copalil difosfato sintase (CPS), caureno sintase (KS) relacionadas a produção de ent-caureno, precursor das giberelinas e outras diterpeno sintases (diTPS), precursoras dos diterpenos. Ainda nesta classe encontram-se as subfamílias TPS-e/f agrupadas em um único clado e conservadas em plantas vasculares, que codifica ambos os motivos “DXDD” e “DDXXD”, responsáveis pela produção de ent-caureno, monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos. E por último, TPS-h encontrada apenas em *S. moellendorffii*, que sintetiza diterpenos. Dentro da Classe II temos apenas a subfamília TPS-d, específica de gimnospermas e *Selaginella* spp e produzem mono-, sesqui- e diterpenos (CHEN et al., 2011; KÜLHEIM, 2015).

Tabela 1. Função e distribuição taxonômica da subfamília de genes TPS.

Classe	Subfamília	Subgrupo	Função	Distribuição
III	TPS-a	TPS-a-1	Sesqui	Dicotiledôneas
		TPS-a-2	Sesqui	Monocotiledôneas
III	TPS-b		Mo ciclicos, Hemi, Isp	Angiospermas
I	TPS-c		Di, Cop, Ent	Embriófitas
II	TPS-d	TPS-d-1	Mono e Sesqui	Gimnospermas
		TPS-d-2	Sesqui	Gimnospermas
		TPS-d-3	Di, Sesqui	Gimnospermas
I	TPS-e/f		Di, Mono e Sesqui, Ent, Eli	Plantas vasculares
III	TPS-g		Mono acíclicos, Sesqui e Di	Angiospermas
I	TPS-h		Di	<i>Selaginella moellendorffii</i>

Legenda: Cop - Copalil difosfato sintase; Di - Diterpeno sintase; Ent - Ent-caureno sintase; Eli - Elinalol sintase; Hemi - Hemiterpeno; Isp - Isopreno sintase; Mono - Monoterpeno sintase; Sesqui - Sesquiterpeno sintase (Adaptado de CHEN et al., 2011).

Os genes de TPS de classe III compreendem TPS das angiospermas e as principais enzimas envolvidas no metabolismo secundário de plantas. Ela é composta pelas TPS-a que codifica apenas sesquiterpenos encontrados em eudicotiledôneas e monocotiledôneas. Nesta subfamília, o “R” secundário (arginina) do motivo RRX_8W arginina/triptofano não é conservado (MARTIN et al., 2010). Também é encontrada a subfamília TPS-b que produz monoterpenos e é subdividida em TPS-b1 que produz monoterpenos cíclicos e TPS-b2 que produz isoprenos (C5) e ocimenos (monoterpenos acíclicos). Essa subfamília contém o motivo $R(R)X_8W$ conservado, que atua na iniciação da reação de ciclização de isomerização (WILLIAMS et al., 1998) ou na estabilização da proteína por meio de interações eletrostáticas (HYATT et al., 2007). E por último, a subfamília TPS-g, que atua na biossíntese de monoterpeno cíclico/acíclico, sesqui- e diterpenos. A subfamília TPS-g está intimamente relacionada com TPS-b, mas não apresenta o motivo $R(R)X_8W$ conservado em suas proteínas codificadas (CHEN et al., 2011; KÜLHEIM, 2015).

À medida que genomas completos foram sequenciados, a identificação de genes TPSs e o estudo da família de genes TPS foram realizados por diferentes grupos de pesquisa e para várias espécies. O genoma de *Arabidopsis thaliana*

apresenta 33 genes TPSs completos (THOLL & LEE, 2011), enquanto em plantas economicamente importantes tais como uva (*Vitis vinifera*), tomate (*Solanum lycopersicum*), arroz (*Oryza sativa*), maçã (*Malus domestica*) e cenoura (*Daucus carota*) foram identificados 57, 33, 40, 44 e 65 genes TPS, respectivamente (MARTIN et al., 2010; CHEN et al., 2011; FALARA et al., 2011; KEILWAGEN et al., 2017). JIANG e colaboradores (2019), verificaram a distribuição dos genes TPS em bactérias e fungos, plantas terrestres não vasculares (hepáticas), briófitas, plantas vasculares, incluindo gimnospermas e angiospermas, no entanto, nenhum gene TPS foi detectado em algas e animais. Para a maioria das dicotiledôneas e monocotiledôneas, a subfamília TPS-a é o maior grupo da família TPS, com algumas exceções, como *Carica papaya* e *Citrus clementina* que perderam a subfamília TPS-a durante o longo período evolutivo.

4. A FAMÍLIA DE GENES TERPENO SINTASE EM MYRTACEAE

Dentre as eudicotiledôneas as espécies da família Myrtaceae do continente Australiano, pertencentes a tribo Eucalypteae, com frutos capsulares secos, destacam-se pelo maior número de genes TPS encontrados até o momento, incluindo *Eucalyptus grandis* com 70 genes completos, *Eucalyptus globulus* com 69 genes completos e *Corymbia citriodora* com 89 genes completos (Tabela 2). Nas três espécies de *Eucalyptus*, aproximadamente 46% dos genes são TPS-a, cerca de 34% dos genes TPS-b e ~ 10% correspondem a TPS-g, altamente expressos nas folhas (MYBURG et al. 2014), sendo os compostos majoritários nos óleos essenciais os monoterpenos 1,8-cineol e α -pineno (KULHEIM et al., 2015). *Eucalyptus grandis* parece ter uma taxa de duplicação gênica 3-5 vezes maior que outras espécies de eudicotiledôneas tais como *Arabidopsis thaliana* e *Populus trichocarpa* (MYBURG et al., 2014), fator que pode ter contribuído para a expansão dos genes TPS nos eucaliptos. Uma hipótese para explicar este fato é que muitos podem estar envolvidos em respostas de defesa (KULHEIM et al., 2015), uma vez que um grande número de genes fornece uma vantagem em respostas induzíveis, como resistência a patógenos, possibilitando uma rápida adaptação em resposta às mudanças ambientais, além da longevidade dessas plantas que também pode ser responsável pela expansão da famílias de genes envolvidos

nas respostas ao estresse (BUTLER et al., 2018). Outra espécie de Myrtaceae Australiana, Mãnuka (kahikātoa) (*Leptospermum scoparium*), encontrada naturalmente na Nova Zelândia, apresenta 49 genes TPS (23 TPS-a, 10 TPSb1, 6 TPSb2, 1 TPSc, 5 TPSe/f, 3 TPSg) (THRIMAWITHANA et al., 2019). Em *Melaleuca alternifolia*, que divergiu do gênero *Eucalyptus* há cerca de 68 milhões de anos atrás, apenas 37 genes TPS foram identificados, com a subfamília TPS-b1 proporcionalmente maior em relação às demais espécies da família. Os autores sugerem que a expansão linhagem-específico desses genes nesta subfamília foi uma adaptação importante na espécie, e pode ter sido estimulada por estresse biótico, dado o habitat subtropical quente em que se encontra (CALVERT et al., 2018; THORNHILL et al., 2015).

Até o momento faltam estudos com genomas das espécies da tribo Myrteae, linhagem que representa metade da diversidade de Myrtaceae, com cerca de 2500 espécies e 51 gêneros (WILSON et al., 2011). Essa tribo de frutos carnosos, inclui gêneros de importância econômica e cultivados por seus frutos, como pitanga (*Eugenia*), goiaba (*Psidium*) e jabuticaba (*Myrciaria*) (GRATTAPAGLIA et al., 2012) onde foram encontradas altas concentrações de α -pineno, β -pineno, limoneno e principalmente o sesquiterpeno β -cariofileno (QUEIROZ et al., 2015; PADOVAN et al., 2014). Dado que 1,8-cineol pode atuar na defesa contra herbivoria, e o perfil foliar de terpeno de algumas tribos é mais diverso que outros, sugere-se que a defesa pode não ser a função primária dos terpenos em espécies de Myrteae (PADOVAN et al., 2014). Papéis alternativos, como atrair animais benéficos ou mediar interações com microrganismos no solo são possíveis (STEFFEN et al., 2012). Estudos com transcriptomas envolvendo a caracterização dos genes terpeno sintase na tribo Myrteae foram realizados apenas em *Eugenia uniflora*, com a identificação de quatro unigenes (GUZMAN et al., 2014) e *Rhodomyrtus tomentosa* com 138 unigenes candidatos a biossíntese de terpenos. Estudos que incluam gêneros representativos desta tribo podem ajudar a entender os padrões de diversidade de terpenos foliares em Myrtaceae (HE et al., 2018).

Tabela 1. Números de cópias gênicas de TPS em espécies da família Myrtaeae.

Distribuição geográfica	Tribo	Espécie	Tamanho genoma (Mb)	Total genes TPS	Full length	a	b	c	d	e/f	g	h	Principal produto	Características	Referência
Endêmico para as zonas tropicais, áridas e semi-áridas do norte da Austrália, mas é cada vez mais cultivado para silvicultura e produção de óleo essencial na Austrália, Índia, Brasil, Fiji e África do Sul.	Eucalypteae	<i>Corymbia citriodora</i>	370	127	89	52	21	1	0	6	9	0	Monoterpenos: 1,8-cineole e α -pineno	Árvore de tronco alto, plantada em vários locais pela beleza do seu tronco branco ou cinzento-claro e pelo cheiro inconfundível a limão, conhecida como eucalipto-de-jardim.	Butler et al., 2018
Nativos da Austrália mas introduzidos em múltiplos países de clima subtropical e temperado quente para a produção de madeira. Atualmente várias espécies deste gênero, mas especialmente <i>Eucalyptus globulus</i> , são cultivadas em larga escala nas regiões tropicais (principalmente África e Brasil) e mediterrânicas (incluindo a Península Ibérica) para produção de madeira.	Eucalypteae	<i>Eucalyptus globulus</i>	530	106	69	32	30	2	0	2	3	0	Monoterpenos: 1,8-cineole e α -pineno	São, em sua maioria árvores, contêm um opérculo que recobre os botões florais antes da antese, perenes, com flores hermafroditas polinizadas por animais, apresentam barreiras pré e pós-zigóticas à autofecundação para reduzir a depressão por endogamia.	Butler et al., 2018 Myburg et al., 2014; Külheim et al., 2015
	Eucalypteae	<i>Eucalyptus grandis</i>	640	172	70	38	15	1	0	8	8	0	Monoterpenos: 1,8-cineole e α -pineno		
Ocorrem maioritariamente na Australásia (Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné e Sudeste Asiático, incluindo Birânia, Tailândia e Filipinas.	Leptospermoideae	<i>Leptospermum scoparium</i>	297	49	49	23	16	1	0	5	3	0	Monoterpenos em Northland e West Coast (α -pineno, β -pinene, mirceno, linalol), triketona em East Cape e Marlborough; sesquiterpenos (cariofileno, humuleno, γ ilangeno, α -copaeno, selineno, eudesmol) no resto do país.	Espécie lenhosa perene, variando de um pequeno arbusto a uma árvore de até 10 m, adaptadas a diversos ambientes, incluindo áreas costeiras, subalpinas e geotérmicas. Se caracteriza por apresentar frutos secos e deiscentes (cápsulas) e folhas arranjadas em espiral ou alternadas. Muitos gêneros da Austrália Ocidental (Western Australia) apresentam folhas muito reduzidas e flores típicas de habitats xéricos.	Thrimawithana et al., 2019; Douglas et al., 2004.
Melaleuca alternifolia é restrita às planícies de inundação costeiras do nordeste de New South Wales (NSW) com populações vizinhas no sudeste de Queensland, Austrália.	Melaleuceae	<i>Melaleuca alternifolia</i>	710	37	26	14	12	2	1	4	4	0	Monoterpenos: terpinen-4-ol em populações do centro da área natural de ocorrência, terpinoleno domina no noroeste e 1,8-cineol no sul.	Comumente conhecida na Austrália como "árvore de chá", florescendo principalmente em áreas de pântano, próximas de rios.	Keszei, et al., 2010

A família Myrtaceae é uma das famílias de plantas produtoras de óleos essenciais mais variáveis quimicamente e muito explorada comercialmente (KESZEI et al., 2010; STEFANELLO et al., 2010; PADOVAN et al., 2014). Existem 17 tribos de Myrtaceae compreendendo aproximadamente 140 gêneros e 5.500 espécies (BIFFIN et al., 2010). São predominantemente encontradas no hemisfério sul com centros de diversidade (*hotspots*) na Austrália e sudeste da Ásia, mas também ocorrem ao longo da África, Índia, Nova Caledônia e muitas ilhas do Pacífico, estendendo-se ao norte até o Havaí (THORNHILL et al., 2015). As espécies de frutos capsulares secos tais como as pertencentes as tribos Eucalypteae, Melaleuceae e Leptospermeae estão ausentes nas Américas (com exceção de *Metrosideros* que está presente no Chile e Argentina) e são comuns em florestas dos trópicos secos até zonas temperadas (Figura 2) (PILLON et al., 2015; PADOVAN et al., 2014). Enquanto as espécies de frutos carnosos, incluem as tribos economicamente importantes, Myrteae com principais centros de diversidade na Austrália e na América do Sul, e Syzygieae com riqueza de espécies nas florestas tropicais da Malásia ao nordeste da Austrália (Figura 2) (CRAVEN, 2001; WILSON, 2011).

Com a morfologia da folha intimamente relacionada ao habitat (WILSON, 2011), prevê-se que as plantas de frutos capsulares defendam suas folhas com muito mais força do que as plantas da floresta tropical (GRUBB et al., 1998). Portanto, espera-se que as folhas das espécies da floresta tropical tenham menos terpenos em comparação com as da floresta aberta, apesar dos muitos outros papéis nos quais os terpenos possam desempenhar nas plantas (BROPHY & SOUTHWELL, 2002).

Há uma grande diversidade de terpenos nas folhas de Myrtaceae, onde α -Pineno e 1,8-cineol são os compostos mais encontrados nas espécies. Uma vez que muitas amostras contêm altos níveis foliares de α -Pineno, este composto é o provável quimiotipo foliar ancestral de todas as Myrtaceae, já o 1,8-cineol foliar parece ser apenas uma característica definidora de algumas tribos. A cascata de reação que leva a esses dois compostos inclui o mesmo carbocátion intermediário (KAMPRANIS et al., 2007), o que sugere que apenas uma pequena mudança na sequência de aminoácidos de uma enzima poderia permitir a produção de quantidades significativas de ambos os compostos (PADOVAN et al., 2014).

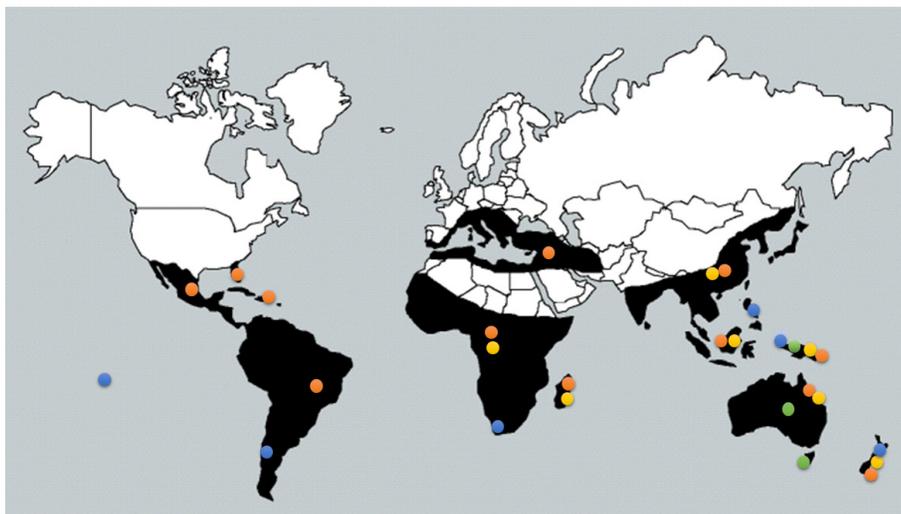


Figura 2. Distribuição mundial da família Myrtaceae. Em rosa Myrteae (74): *Eugenia* (1,050), *Myrcia* (250), *Calyptanthus* (216), *Psidium* (100), *Campomanesia* (32), *Myrcianthes* (67), *Myrceugenia* (33), *Plinia* (107) (BROOKER et al., 2000, COLE et al., 2008). Em amarelo Syzygieae (3): *Syzygium* (1,500) (BIFFIN & CRAVEN, 2010). Em verde Eucalypteae (7): *Eucalyptus* (700), *Corymbia* (95) (BROOKER et al., 2000; Australian Plant Census, 2020). Em azul Metrosidereae (2): *Metrosideros* (58). Entre parênteses se encontra o número de gêneros dentro das tribos e número de espécies dos principais gêneros. Adaptado de GRATTAPAGLIA et al., 2012.

Duas trajetórias evolutivas são propostas para os compostos terpênicos em Myrtaceae, mapeando os padrões nos terpenos foliares na filogenia. A primeira trajetória evolutiva, é que o ancestral comum a todas as Myrtaceae contém altos níveis foliares de α -pineno e baixos níveis foliares de 1,8-cineol. Posteriormente, altas concentrações de 1,8-cineol evoluíram nas folhas do ancestral comum de Melaleuceae, Syncarpieae, Lindsayomyrteae, Eucalypteae, Leptospermeae e Chamelaucieae, entretanto foi posteriormente perdida em outras linhagens (Syncarpieae e Lindsayomyrteae). A segunda trajetória evolutiva proposta é que o ancestral comum de todas as Myrtaceae contém altos níveis foliares de 1,8-cineol e α -pineno, sendo que o maquinário que conduzia ao alto 1,8-cineol foliar foi perdido nas linhagens Xanthostemoneae, Syncarpieae e Lindsayomyrteae, bem como o clado contendo Myrteae, Tristanieae e Syzygieae (PADOVAN et al., 2014).

A identificação dos genes relacionados ao metabolismo secundário, conjuntamente com padrões de distribuição taxonômica específicos das linhagens, tornam-se essenciais para estudar a dinâmica evolutiva em tão pouco tempo de divergência entre as Myrtaceae, dando indícios do sucesso da distribuição e adaptação dessas espécies (DE OLIVEIRA BUNGER et al., 2016).

5. EVOLUÇÃO DOS GENES TPS

A evolução contínua de novas estruturas terpenóides especializadas em linhagens de plantas foi facilitada pela evolução de genes que codificam enzimas capazes de fazer esses metabólitos. O acelerado processo de divergência evolutiva do metabolismo dos terpenóides é auxiliado pela extensa plasticidade funcional de TPSs, com enzimas intimamente relacionadas diferindo em seus perfis de produto, localização subcelular ou nos substratos que utilizam (CHEN et al., 2011; KARUNANITHI & ZERBE, 2019). A plasticidade da defesa terpenóide baseada em múltiplos genes é uma importante característica adaptativa de plantas que interagem em vários níveis tróficos com predadores como os insetos. A alocação de terpenóides com padrões espaciais e temporais apropriados para defesa é importante para a flexibilidade do arsenal defensivo das plantas.

Estudos sobre padrões evolutivos da família das terpeno sintases têm demonstrado que a expansão em grande escala dos genes dessa família ocorreu principalmente após a diferenciação entre monocotiledôneas e eudicotiledôneas, tendo assim, uma característica fortemente espécie-específica. Isso indica que plantas de diferentes espécies exigiram distintos perfis de terpeno, muitas vezes relacionados às diferentes subfamílias de TPS, para suas necessidades ao longo do processo de especiação. Assim, sugerindo ainda que a expansão dos TPS pode estar relacionada à diversificação de espécies ou adaptações ambientais. Dessa forma, dentro de um mesmo grupo vegetal, como as eudicotiledôneas, enquanto o eucalipto, *E. grandis*, apresenta pelo menos 38 genes na subfamília TPSa, 15 na TPSb, 1 na TPSc, 8 na TPS e/f e 8 na TPSg; o mamão, *Carica papaya*, não apresenta genes TPSa, apresenta 4 genes na subfamília TPSb, 1 na TPSc, 2 na TPS e/f e 4 na TPSg. A perda de subfamílias também foi observada em outras espécies como *Amaranthus hypochondriacus* que não apresenta genes TPSb, TPSc, TPSd.

Portanto, mudanças dinâmicas ocorreram nos genes TPS duplicados, envolvendo expansões e/ou perdas de um clado da família de genes TPS em uma linhagem, e estas podem ser acompanhadas por mudanças nas localizações subcelulares e especificidades do substrato, e conseqüentemente produtos encontrados (JIANG et al., 2019; ZHOU et al., 2020).

Inúmeros mecanismos foram propostos como protagonistas ou coadjuvantes na evolução de novos genes de terpeno sintase. No entanto, seus mecanismos de expansão podem variar de espécie para espécie e para diferentes subfamílias de genes (JIANG et al., 2019). Em plantas, a duplicação de genes ancestrais seguida de divergência estrutural e funcional é considerada um mecanismo importante na geração de novidades e adaptação evolutiva, principalmente para a diversificação de metabólitos bioquímicos. Essa expansão pode se dar por duplicação em tandem ou segmentar (JIANG et al., 2019). Essas considerações sugerem que as árvores genealógicas de genes funcionalmente relacionados co-evoluíram, porque duplicações de genes funcionalmente complementares e eventos de divergência tendem a ser retidos pela seleção natural (FRYXELL, 1996).

Notou-se que os perfil dos produtos de muitos TPSs foram interconvertidos pela mutação de resíduos de aminoácidos únicos principalmente dentro ou ao redor da cavidade do sítio ativo, e até mesmo substituições remotas, alterando drasticamente a cinética e a especificidade do produto das enzimas (GREENHAGEN et al., 2014; KEELING et al., 2008; KÖLLNER et al., 2009; XU et al., 2007; KÖLLNER et al., 2004; PHILLIPS et al., 2003).

Nos sistemas naturais, uma mudança genotípica pode aumentar a aptidão da planta, e como resultado de um desafio imposto pelo ambiente, essa mudança pode ser adaptativa e selecionada positivamente, fixando esta característica na população por meio dos seus descendentes. No entanto, uma vez que isto ocorre, a direção da seleção mudará para manter o benefício de aptidão da característica alterada, e outras mudanças serão selecionadas contra, a menos que sejam evolutivamente neutras ou benéficas. Assim, a seleção positiva geralmente se transforma em seleção purificadora (negativa). No entanto, a fixação de um novo gene ou alelo pode permanecer incompleta quando diferentes regimes seletivos favorecem fenótipos contrastantes, e as trocas entre os componentes da aptidão podem manter a variação genética, se os ganhos em um aspecto da aptidão forem

equilibrados por perdas em outros. Esses diferentes tipos de seleção deixam suas pegadas no genoma e sua assinatura pode ser detectada com ferramentas estatísticas de genética de populações moleculares (KROYMANN, 2011).

Além disso, a seleção pode atuar em um conjunto muito específico de aminoácidos que podem ser difíceis de detectar em estudos envolvendo todo o genoma. Mesmo que os ensaios funcionais forneçam evidências de um benefício de aptidão de um determinado metabólito secundário da planta em uma interação entre seu inimigo natural, permanece difícil (e muitas vezes impossível) determinar contra quem, dos múltiplos inimigos naturais este composto foi originalmente dirigido (KROYMANN, 2011).

Testes *in vitro* usando plantas cuja expressão de metabólitos secundários foi alterada por métodos moleculares podem confirmar seus papéis defensivos (MANSFIELD, 2000). Embora a situação ainda não esteja clara, acredita-se que a maioria dos 100.000 metabólitos secundários conhecidos estejam envolvidos nos sistemas de defesa química das plantas, que são formados ao longo de milhões de anos de evolução durante os quais as plantas coexistiram com os causadores de estresses bióticos e abióticos (WINK, 1988). Embora concentrações mais altas de metabólitos secundários possam resultar em uma planta mais resistente, esta produção é considerada custosa para a planta e reduz o seu crescimento e reprodução. Este mesmo pensamento pode ser aplicado em situações em que as plantas desenvolvem defesa induzida, onde as concentrações geralmente aumentam apenas em situações de estresse (ZAYNAB et al., 2018).

Tais exemplos onde a seleção positiva é uma das forças evolutivas que impulsionam a diversificação do metabolismo secundário da planta, temos o sesquiterpeno *OryzaTPS1* do arroz, que pela alteração de alguns resíduos de aminoácidos na cavidade do sítio ativo e seus prováveis impactos para adequação, produz alterações nos perfis de emissão de terpeno, exibindo um tipo de promiscuidade do produto atribuída aos seus mecanismos de reação de carbocations intermediários. Portanto, as mudanças nos perfis de emissão de sesquiterpeno do arroz causadas pela divergência funcional de *OryzaTPS1* podem refletir no contexto dos desafios impostos pelo meio ambiente, a mudança dos espectros de insetos herbívoros e seus inimigos naturais presentes nos ambientes de diferentes espécies (CHEN et al. 2014). E também o caso dos genes da crisantemil

difosfato sintase (CDS), uma enzima que envolve a produção de piretrinas e monoterpenos irregulares, e que resultaram da duplicação dos genes da farnesil difosfato sintase (FDS). O FDS e seus produtos são encontrados em organismos procariotos e eucariotos, variando de uma cópia gênica encontrada na uva a cinco no arroz, enquanto os produtos de CDS estão presentes apenas em Anthemideae. A CDS catalisa a formação de crisantemila difosfato (CDP), e desempenha papel importante na defesa contra insetos e herbívoros, sendo o pesticida derivado de plantas mais amplamente utilizado.

Outro exemplo de como a seleção positiva está contribuindo para a aquisição de mutações benéficas durante o processo evolutivo envolvendo TPS, é com os genes triterpenóides, onde alguns sítios representativos selecionados positivamente foram localizados na região catalítica. Esses padrões mutacionais de assinatura contribuem para as mudanças funcionais de proteínas e a diversificação dos genes da farnesil pirofosfato sintase (FPS) entre as plantas terrestres, o que provavelmente melhora a atividade das enzimas na via de biossíntese dos triterpenóides quando as plantas se adaptam aos ambientes terrestres. Os eventos de seleção nas sequências de codificação podem ser indicativos de como a diversidade de genes FPS entre as plantas pode ser atribuída à divergência funcional devido à adaptação das plantas aos seus ambientes de nicho (QIAN et al., 2017).

Elementos transponíveis também podem desempenhar um importante papel na expansão de genes (HOEN et al., 2006). Evidências sugerem que MITEs (miniatura de elementos transponíveis com repetições invertidas) podem desempenhar um papel na formação e/ou regulação de agrupamentos (*clusters*) de TPS em eudicotiledôneas, podendo influenciar a arquitetura do genoma, a regulação da expressão gênica e consequente diversificação metabólica (BOUTANAIEV, 2018; JIANG et al., 2019). Outros mecanismos também foram propostos, como a perda do domínio N-terminal, como por exemplo em trigo (*Triticum aestivum*) que fornece um exemplo de perda de uma parte do domínio helicoidal conservada na sequência, o domínio γ , visto que está intimamente relacionado aos genes da diterpeno sintase do arroz que retêm a estrutura ancestral contendo três domínios ($\gamma\beta\alpha$), onde os domínios $\gamma\beta$ estão na porção N-terminal e o domínio α na porção C terminal (HILLWIG et al., 2011) ou a fusão de dois domínios funcionais, como é o caso de linalool sintase que parece ser um gene que evoluiu a partir de um

evento de recombinação entre dois tipos diferentes de terpeno-sintases (CSEKE et al., 1998).

Estudos futuros que visem estimar o quanto a das mudanças adaptativas se reflete no genoma, precisarão incorporar comparações de sequências parálogas, devido à importância das duplicações gênicas para a diversificação do metabolismo secundário das plantas (KROYMANN, 2011). Além disso, a maioria dos trabalhos concentram-se principalmente em locais “chave” que determinam a variabilidade em uma única etapa biossintética. Mas uma questão desafiadora para o futuro é como novas vias bioquímicas inteiras surgem no metabolismo secundário da planta. Responder a esta questão exigirá uma análise rigorosa do metabolismo secundário da planta e seus genes subjacentes em uma estrutura filogenômica (KROYMANN, 2011).

6. EXPRESSÃO DIFERENCIAL E MODULAÇÃO DE TERPENOS

Os terpenos são amplamente distribuídos no reino vegetal, desde briófitas até plantas superiores, mas a variação quantitativa e qualitativa desses compostos é bastante diversa. Essa diversificação no perfil de terpenos tanto inter e intraespecíficas, como entre diferentes tecidos e fases de desenvolvimento, estão associadas a funções fisiológicas, interações ecológicas e condições de estresse. Como apresentado, as terpeno sintases utilizam um conjunto restrito de compostos como substrato, no entanto, são responsáveis por um repertório vasto de produtos. Porém, essa característica por si só é insuficiente para explicar tamanha complexidade no perfil desses compostos, que envolve também sofisticados sistemas genéticos e epigenéticos de variação e regulação (LORETO et al., 2009).

Frequentemente, plantas que emitem ou armazenam poucos terpenos são associadas a um pequeno número de genes TPS, como *Eutrema salsugineum* que possui 15 genes TPS identificados. Outras plantas que produzem uma mistura mais complexa desses metabólitos, tendem a conter um maior número de genes TPS, como é do eucalipto (*E. grandis*) com 70 genes funcionais putativos de TPS. Todavia, com os avanços obtidos a partir de estudos de sequenciamento de DNA e RNA em plantas, uma melhor caracterização da família TPS vem sendo desenvolvida e evidenciando que trata de uma família ainda mais complexa que o

previsto, e que essa relação entre o número de genes TPS e o perfil dos terpenos produzidos não parece evidente para muitas espécies (JIANG et al., 2019).

A variação nas características químicas de terpenos entre diferentes espécies, genótipos e tecidos sempre atraiu grande interesse e é historicamente estudada, objeto de muitos artigos. Já os estudos de sequenciamento em larga escala focados na compreensão dos mecanismos responsáveis por essa variabilidade, são incipientes, mas estão evoluindo rapidamente.

Nos últimos anos, dezenas de trabalhos utilizando abordagem transcriptômica foram desenvolvidos, avaliando não só a expressão diferencial dos genes TPS, como de vias relacionadas, incluindo as responsáveis pela produção dos seus precursores, e de transporte. Esses estudos auxiliam na compreensão entre as diferenças características dos quimiotipos (ou polimorfismo químico) (BUSTOS-SEGURA et al., 2017; PADOVAN et al., 2015; QIU et al., 2019), como também em análises interespecíficas (KEELING et al., 2011). Muitos esforços também estão sendo direcionado para avaliação do perfil diferencial de genes associados à biossíntese de terpenos em diferentes tecidos (ALLEN et al., 2019; JIANG et al., 2019; KÜLHEIM et al., 2015), fases do desenvolvimento (GUO et al., 2020; WIMBERLEY et al., 2020) e sob condições de estresse (OATES et al., 2015; ZHOU, H.-C. et al., 2020).

Para membros da família Myrtaceae, estudos de sequenciamento em larga escala são disponíveis para um conjunto restrito de espécies, e dentre elas, o eucalipto recebe grande destaque. Em 2015, Külheim e colaboradores realizaram um estudo no qual descreveram a família de genes TPS de *Eucalyptus grandis* e compararam com uma segunda espécie, *Eucalyptus globulus*, um estudo pioneiro para a compreensão da variabilidade de terpenos desta família.

Em relação a expressão gênica, os autores confirmaram uma ideia já bastante documentada em estudos de composição de óleos essenciais, que genes TPS de *E. grandis* são altamente expressos em tecidos verdes (botões florais, brotos, folha jovem e madura) e são majoritariamente pertencentes às subfamílias TPS-a, TPS-b1 e TPS-b2, produzindo mono-, sesqui- e hemiterpenos. No entanto, notaram também que mais da metade dos TPS identificados eram expressos nas raízes, xilema e floema, e para muitos desses genes TPS a expressão foi tecido-específica. Um exemplo é que genes da subfamília TPS-f foram encontrados expressos somente

em raiz, evidenciando a importância de estudos para compreender a função das terpeno sintases nesses tecidos (KÜLHEIM et al., 2015).

Nesse trabalho, os autores também avaliaram como ocorria a distribuição de genes TPS no genoma de *E. grandis* e *E. globulus*. Com isso, verificaram que os genes TPS são organizados em *clusters* de tamanhos moderados a grandes e que cada cluster envolve apenas genes da mesma subfamília TPS. Além disso, verificaram que em regiões próximas a esses *clusters*, são encontrados genes envolvidos em diferentes etapas na via biossintética de terpenos. E uma grande evidência encontrada foi que um cluster de TPS-b também é coincidente com oito *loci* de característica quantitativa (QTL) para monoterpenos foliares de *Eucalyptus nitens*. Em conjunto, esses resultados apontam para o papel desses *clusters* metabólicos na modulação de TPS e conseqüentemente de seus produtos (KÜLHEIM et al., 2015).

Os *clusters* genômicos de genes não homólogos já foram bem descritos para leveduras e fungos filamentosos. Em plantas, os genes organizados nesses *clusters*, codificam proteínas para várias etapas de vias biossintéticas para metabólitos secundários, e agora começam a ser um tema emergente e particularmente interessante para o estudo de TPS em Myrtaceae (TAKOS & ROOK, 2012). A importância desse tipo de organização genômica para a família TPS foi corroborada em outro estudo recentemente publicado, no qual os autores encontraram ampla conservação desses clusters envolvendo TPS, quando compararam a espécie *Corymbia citriodora* subsp. *Variegata* (um tipo de eucalipto), com as duas espécies do gênero *Eucalyptus* (*E. grandis* e *E. globulus*) com genoma sequenciado. Além de terem encontrado grande semelhança em números de genes TPS, representação de subfamília e posição física dos genes nos cromossomos (BUTLER et al., 2018).

Outro trabalho que teve como objetivo a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese de terpenos em Myrtaceae foi publicado por He e colaboradores. Para esse estudo, os autores utilizaram o transcriptoma de folhas de *Rhodomyrtus tomentosa*, uma planta medicinal de origem perene muito utilizada na China e caracterizada pelo alto teor de terpenos, para identificar 138 genes possivelmente envolvidos na biossíntese de terpenos na espécie, incluindo sete genes TPS potencialmente envolvidos na última etapa na biossíntese de pineno e cariofileno. Nesse trabalho os autores caracterizaram as sete terpeno sintases

em ensaios *in vitro*, e descobriram pela análise de alinhamento de sequência que três delas (RtTPS1, RtTPS3 e RtTPS4) não possuem peptídeos sinais N-terminais típicos (62-64aa), provavelmente produzindo vários isômeros e enantiômeros por isomerização de terpenóides, o que pode impactar de forma significativa na diversidade desses compostos (HE et al., 2018).

Uma outra abordagem que auxilia na elucidação de componentes e mecanismos envolvidos na biossíntese e modulação dos terpenos são estudos acerca dos quimiotipos para membros da mesma espécie. Plantas de diferentes quimiotipos são comuns em várias famílias, incluindo *Myrtaceae*, *Rutaceae* e *Lamiaceae*. Exemplos bem caracterizados ocorrem para as espécies *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Melaleuca alternifolia* (tea tree), que exibem vários quimiotipos com base em sua composição de monoterpene (KESZEI & HASSAN; FOLEY, 2010; TRINDADE et al., 2018). Os principais fatores relacionados a essa modulação diferencial são a variabilidade genética individual e a expressão diferencial, sendo esse último mais complexo e difícil de ser estudado, pois envolve mecanismos genéticos e epigenéticos, que variam não só entre indivíduos, como entre fases do desenvolvimento, tipo celular e ainda são fortemente influenciados pelo ambiente (BUSTOS-SEGURA et al., 2017).

Um importante trabalho desenvolvido nesse sentido para uma espécie de *Myrtaceae*, comparou transcriptomas de três quimiotipos de terpeno cardinal de *Melaleuca alternifolia* em diferentes tecidos (folhas jovens, folhas maduras e caule) e avaliou a abundância de transcritos em relação ao perfil constitutivo de terpenos. Os autores encontraram expressão diferencial significativa entre os quimiotipos, envolvendo várias classes de genes, com destaque para os fatores de transcrição que representam 4% desses genes. Em folhas jovens, houve uma maior expressão diferencial de genes TPS, reforçando a ideia de maior atividade dessa classe de metabólitos em tecidos novos (BUSTOS-SEGURA et al., 2017).

No entanto, esse estudo surpreendeu quando demonstrou que um pequeno número de genes parece estar envolvido na diferença de perfil de terpeno entre os quimiotipos, principalmente entre o quimiotipo 1 (dominado por terpinen-4-ol) e o quimiotipo 5 (dominado por 1,8-cineol). Isso porque, quando os tecidos de folha jovem desses representantes foram comparados, apenas 11 genes estavam diferencialmente expressos, e oito deles também estavam diferencialmente

expressos entre os quimiotipos 5 e 2 (dominado por terpinoleno). Porém, desses 11 genes, oito foram anotados como genes TPS com maior expressão nas amostras do quimiotipo 5, demonstrando que esse quimiotipo é responsável pela maior parte dos genes diferencialmente expressos nos três quimiotipos. Além disso, não foi encontrado nenhum gene diferencialmente expresso em folhas maduras e caules entre os quimiotipos 1 e 5. Sugerindo assim, que outros aspectos além da expressão gênica estão envolvidos na variação dos quimiotipos, incluindo a estabilidade de proteínas e metabólitos, cinética enzimática e regulação pós-traducional (BUSTOS-SEGURA et al., 2017).

Avanços em estudos envolvendo reguladores transcricionais também têm auxiliado na elucidação da modulação da biossíntese de metabólitos secundários, incluindo terpenos. Estudos recentes demonstraram o papel de alguns fatores de transcrição (FTs) na biossíntese de terpenos, entre eles estão membros das classes AP2/ERF (PAUL et al., 2020; ZHANG et al., 2019), bZIP (HAO et al., 2019; ZHOU et al., 2015), MYC (ALFIERI et al., 2018; XU et al., 2018), e WRKY (ALFIERI et al., 2018; XU et al., 2004). Interessantemente, vários FTs que regulam o metabolismo secundário são responsivos a hormônios vegetais e evidenciam relevantes mecanismos de integração. Um exemplo é o MYC2, um importante regulador transcricional em *Arabidopsis* envolvido nas vias de sinalização por ácido jasmônico e ácido abscísico, e que está associado a ativação de genes da via MEP, associado a biossíntese de diterpenos do tipo abietano (ALFIERI et al., 2018; KAZAN; MANNERS, 2013). Outra família é a WRKY, uma classe específica de plantas e caracterizada pelo envolvimento na sinalização por ácido salicílico e importante papel na resposta ao estresse biótico e abiótico (SCHLUTTENHOFER & YUAN, 2015).

Nesse sentido, alguns trabalhos envolvendo membros da família Myrtaceae, em estudos globais de expressão diferencial também indicaram o papel de fatores de transcrição no perfil diferencial de terpenos (BUSTOS-SEGURA et al., 2017; KÜLHEIM et al., 2015; PADOVAN et al., 2015). Um exemplo importante foi o estudo publicado por Padovan e colaboradores (2015), no qual investigaram, por análise de transcriptoma, mosaicos de eucalipto de duas espécies bastante relacionadas, *Eucalyptus melliodora* e um *E. sideroxylon*. Esses mosaicos apresentam diferenças fenotípicas notórias e bastante conhecidas na resistência

a herbívoros, associada principalmente ao perfil diferencial de terpenos. Esse trabalho mostrou que apesar da estreita relação entre as duas espécies, existem grandes diferenças nos padrões globais de genes e na regulação da via de biossíntese de terpenos (PADOVAN et al., 2015). Dentre as possíveis explicações para essas diferenças, o grupo identificou fatores de transcrição pertencentes a 12 famílias diferencialmente expressas entre as folhas resistentes e suscetíveis nas duas espécies, sendo a maioria pertencente à família do fator de transcrição SRF (*serum response factor*) entre as folhas dos dois ramos em *E. melliodora* e a família do fator de transcrição WRKY em *E. sideroxylon*. Além disso, também foram encontrados FTs diferencialmente expressos contendo os domínios de ligação MYB e WRKY, já relatados previamente por interagir diretamente com terpeno sintases e com outros genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários em plantas. Portanto, existe um forte indício que esses FTs podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e manutenção do mosaicismo fenotípico (PADOVAN et al., 2015).

Outros aspectos, além da expressão gênica, podem estar associados a versatilidade no perfil dos terpenos, incluindo a regulação epigenética (FORESTAN et al., 2016). Desde o advento do sequenciamento de nova geração, e abordagens computacionais de processamento de dados em grande escala, um grande número de sequências de micro RNAs foram descobertas. Esses pequenos RNA não codificadores desempenham importante função em processos biológicos cruciais de plantas, incluindo crescimento e desenvolvimento, respostas ao ambiente, como também biossíntese e acúmulo de flavonóides, alcalóides e terpenos (CHEN et al., 2020; GUPTA et al., 2017; SAMAD et al., 2019).

Fatores adicionais ainda podem envolver a estabilidade das proteínas envolvidas na via, cinética enzimática diferencial, regulação pós-traducional e, finalmente, o sistema de transporte dessas moléculas, uma vez que os terpenos são ativamente transportados entre as células, principalmente nas espécies com estruturas especializadas de armazenamento e secreção (PADOVAN et al., 2017).

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Para organismos imóveis como plantas, a maioria dos genes que participam da produção de metabólitos secundários especializados envolvidos nas interações ecológicas, oferecem uma enorme vantagem para adaptação, melhorando seu repertório de defesa química para proteção contra uma gama mais ampla de predadores (VATTEKKATTE et al., 2018). Nos últimos anos, muito progresso foi feito no que diz respeito à elucidação das vias metabólicas, enzimas e genes envolvidos na produção de terpenos, principalmente em espécies economicamente e industrialmente importantes (CHEN et al., 2007; JIANG et al., 2019).

Dados genômicos revelaram diferentes números de TPSs, associados a grande variabilidade desses genes entre as espécies, com diferentes mecanismos de expansão que contribuem para uma evolução dinâmica da família de TPS, podem explicar em parte como surge a enorme diversidade encontradas nos compostos dos óleos essenciais, entre diferentes espécies e visualizada até mesmo dentro de uma única espécie com diferentes quimiotipos (TRINDADE et al., 2018; JIANG et al., 2019).

Conjuntamente com essas características, estudos de expressão gênica demonstraram que muitos outros mecanismos de controle, sejam pré-transcricionais (como a modificação de cromatina), transcricionais (como os fatores de transcrição), pós-transcricionais e epigenéticos (como os miRNAs), e pós-traducionais (como as modificações nas proteínas) podem também influenciar o conteúdo dos compostos do óleo essencial. Evidenciando que existe um campo vasto e pouco explorado que precisa ser conquistado para que um conhecimento sólido sobre esses sistemas biossintéticos, seja alcançado.

Estudos de sequenciamento em larga escala para membros da família Myrtaceae têm contribuído para um avanço significativo do conhecimento referente às terpeno sintases. Embora ainda sejam incipientes, estão em rápida expansão, visto que nos últimos cinco anos, foram publicados mais de seis trabalhos envolvendo a família TPS, seja por análise *de novo* genômica (KULHEIM et al., 2015; CALVERT et al., 2018; BUTLER et al., 2018; THRIMAWITHANA et al., 2019) ou por análise de transcriptoma (HE et al., 2018; GUZMAN et al., 2014). Essas informações mostram que existe uma importante abundância e diversidade de

genes TPS em Myrtaceae e isso possivelmente é refletido na produção de terpenos. Entretanto, estudos de caracterização enzimática, de estrutura proteica, além de estudos genéticos populacionais da variação dos terpenos precisam ser realizados nesta família, principalmente em espécies pouco estudadas dos neotrópicos.

Avanços nesses conhecimentos são importantes para a indústria de óleo essencial, que pode fazer uso de bases genéticas, para obter espécimes com características mais vantajosas, além de auxiliar na triagem de indivíduos com rendimento e qualidade ideais de óleo em populações naturais. Essa triagem pode ser realizada antes do plantio e da maturação do quimiotipo foliar, e que as gerações subsequentes podem ser rastreadas para manter as características ideais, apesar da polinização aberta, principalmente se tratando de melhoramento de espécies arbóreas que tem um processo inerentemente lento, com longos tempos de geração (PADOVAN et al., 2017).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONI, A.; GIRI, A. P.; DEUERLEIN, S.; GRIEPINK, F.; DE KOGEL, W. J.; VERSTAPPEN, F. W.; BOUWMEESTER, H. J. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell*, v. 15, n. 12, p. 2866-2884, 2003.

ALFIERI, M.; VACCARO, M. C.; CAPPETTA, E.; AMBROSONE, A.; DE TOMMASI, N.; LEONE, A. Coactivation of MEP-biosynthetic genes and accumulation of abietane diterpenes in *Salvia sclarea* by heterologous expression of WRKY and MYC2 transcription factors. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 11009, 2018.

ALLEN, K. D.; MCKERNAN, K.; PAULI, C.; ROE, J.; TORRES, A.; GAUDINO, R. Genomic characterization of the complete terpene synthase gene family from *Cannabis sativa*. *PLOS ONE*, v. 14, n. 9, p. e0222363, 2019.

BIFFIN, E.; LUCAS, E. J.; CRAVEN, L. A.; RIBEIRO DA COSTA, I.; HARRINGTON, M. G.; CRISP, M. D. Evolution of exceptional species richness among lineages of fleshy-fruited Myrtaceae. *Annals of Botany*, v. 106, n. 1, p. 79-93, 2010.

BOOTH, J. K.; BOHLMANN, J. Terpenes in *Cannabis sativa*—From plant genome to humans. *Plant Science*, v. 284, p. 67-72, 2019.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 95, n. 8, p. 4126-4133, 1998.

BOUTANAIEV, A. M.; OSBOURN, A. E. Multigenome analysis implicates miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in metabolic diversification in eudicots. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 115, n. 28, p. E6650-E6658, 2018.

BROOKER, M.; IAN H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). Australian Systematic Botany, v. 13, n. 1, p. 79-148, 2000.

BROPHY, J. J.; GOLDSACK, R. J.; FORSTER, P. I. A preliminary examination of the leaf oils of the genus *Xanthostemon* (Myrtaceae) in Australia. Journal of Essential Oil Research, v. 18, n. 2, p. 222-230, 2006.

BUSTOS-SEGURA, C.; PADOVAN, A.; KAINER, D.; FOLEY, W. J.; KÜLHEIM, C. Transcriptome analysis of terpene chemotypes of *Melaleuca alternifolia* across different tissues. Plant, Cell & Environment, v. 40, n. 10, p. 2406–2425, 2017.

BUTLER, J. B.; FREEMAN, J. S.; POTTS, B. M.; VAILLANCOURT, R. E., GRATTAPAGLIA, D., SILVA-JUNIOR, O. B.; LEE, D. J. Annotation of the Corymbia terpene synthase gene family shows broad conservation but dynamic evolution of physical clusters relative to *Eucalyptus*. Heredity, v. 121, n. 1, p. 87–104, 2018.

CALVERT, J.; BATEN, A.; BUTLER, J.; BARKLA, B.; SHEPHERD, M. Terpene synthase genes in *Melaleuca alternifolia*: comparative analysis of lineage-specific subfamily variation within Myrtaceae. Plant Systematics and Evolution, v. 304, n. 1, p. 111-121, 2018.

CHEN, H.; LI, G.; KÖLLNER, T. G.; JIA, Q.; GERSHENZON, J.; CHEN, F. Positive Darwinian selection is a driving force for the diversification of terpenoid biosynthesis in the genus *Oryza*. BMC plant biology, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2014.

CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. The Plant Journal, v. 66, n. 1, p. 212-229, 2011.

CHEN, C.; ZHONG, Y.; YU, F.; XU, M. Deep sequencing identifies miRNAs and their target genes involved in the biosynthesis of terpenoids in *Cinnamomum camphora*. Industrial Crops and Products, v. 145, p. 111853, 2020.

CHENG, A. X.; LOU, Y. G.; MAO, Y. B.; LU, S.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 49, n. 2, p. 179-186, 2007.

CHRISTIANSON, D. W. Structural Biology and Chemistry of the Terpenoid Cyclases. *Chem. Rev.* 2006, 106, 3412–3442, 2006.

CORYMBIA. Australian Plant Census. Retrieved 28 January 2020. Kew World Checklist of Selected Plant Families

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. The leaf oil composition of *Myrcia splendens* from Monteverde, Costa Rica. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 11, n. 1, p. 41-44, 2008.

CRAVEN, L. A. Unravelling knots or plaiting rope: What are the major taxonomic strands in *Syzygium sens. lat.* (Myrtaceae) and what should be done with them? 2001.

CROCOLL, C.; ASBACH, J.; NOVAK, J.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant molecular biology*, v. 73, n. 6, p. 587-603, 2010.

CSEKE, L.; DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Structure and evolution of linalool synthase. *Molecular Biology and Evolution*, v. 15, n. 11, p. 1491-1498, 1998.

DE OLIVEIRA B. M.; FERNANDA, M. F.; FOREST, F.; LEANDRO B. M.; RENATO S. J.; LUCAS, E. J. The evolutionary history of *Eugenia* sect. *Phyllocalyx* (Myrtaceae) corroborates historically stable areas in the southern Atlantic forests. *Annals of botany*, v. 118, n. 7, p. 1209-1223, 2016.

DA SILVA, V. P.; ALVES, C. C. F.; MIRANDA, M. L. D.; BRETANHA, L. C.; BALLESTE, M. P.; MICKÉ, G. A.; TAVARES, D. C. Chemical composition and in vitro leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. *Industrial Crops and Products*, v. 123, p. 638-645, 2018.

DREW, D. P.; DUEHOLM, B.; WEITZEL, C.; ZHANG, Y.; SENSEN, C. W.; SIMONSEN, H. T. Transcriptome analysis of *Thapsia laciniata* Rouy provides insights into terpenoid biosynthesis and diversity in Apiaceae. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 5, p. 9080-9098, 2013.

FÄHNRIK, A.; KRAUSE, K.; PIECHULLA, B. Product variability of the 'cineole cassette' monoterpene synthases of related *Nicotiana* species. *Molecular plant*, v. 4, n. 6, p. 965-984, 2011.

FALARA, V.; AKHTAR, T. A.; NGUYEN, T. T.; SPYROPOULOU, E. A.; BLEEKER, P. M., SCHAUVINHOLD, I. SCHUURINK, R. C. The tomato terpene synthase gene family. *Plant physiology*, v. 157, n. 2, p. 770-789, 2011.

FINN, R. D.; MISTRY, J.; TATE, J.; COGGILL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J. E.; HOLM, L. The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, v. 38, n. suppl_1, p. D211-D222, 2010.

FORESTAN, C.; AIESE C. R.; FARINATI, S.; LUNARDON, A.; SANSEVERINO, W.; VAROTTO, S. Stress-induced and epigenetic-mediated maize transcriptome regulation study by means of transcriptome reannotation and differential expression analysis. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 30446, 2016.

FRYXELL, K. J. The coevolution of gene family trees. *Trends in Genetics*, v. 12, n. 9, p. 364-369, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R. E.; SHEPHERD, M.; THUMMA, B. R.; FOLEY, W., KÜLHEIM, C.; MYBURG, A. A. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. *Tree Genetics & Genomes*, v. 8, n. 3, p. 463-508, 2012.

GREENHAGEN, B. T.; O'MAILLE, P. E.; NOEL, J. P.; CHAPPELL, J. Positive Darwinian selection is a driving force for the diversification of terpenoid biosynthesis in the genus *Oryza*. *BMC plant biology*, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2014.

GRUBB, P. J.; METCALFE, D. J.; GRUBB, E. A.; JONES, G. D. Nitrogen-richness and protection of seeds in Australian tropical rainforest: a test of plant defence theory. *Oikos*, p. 467-482, 1998.

GUZMAN, F.; KULCHESKI, F. R.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; MARGIS, R. De novo assembly of *Eugenia uniflora* L. transcriptome and identification of genes from the terpenoid biosynthesis pathway. *Plant Science*, v. 229, p. 238-246, 2014.

GUO, D.; KANG, K.; WANG, P.; LI, M.; HUANG, X. Transcriptome profiling of spike provides expression features of genes related to terpene biosynthesis in lavender. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 6933, 2020.

GUPTA, O.P.; KARKUTE, S. G.; BANERJEE, S.; MEENA, N. L.; DAHUJA, A. Contemporary Understanding of miRNA-Based Regulation of Secondary Metabolites Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, 2017.

HAO, X.; ZHONG, Y.; NÜTZMANN, H.; FU, X.; YAN T.; SHEN, Q.; CHEN, M.; MA, Y.; ZHAO, J.; OSBOURN, A.; LI, L.; TANG, K. Light-Induced Artemisinin Biosynthesis Is Regulated by the bZIP Transcription Factor AaHY5 in *Artemisia annua*. *Plant and Cell Physiology*, v. 60, n. 8, p. 1747–1760, 2019.

HE, S.; WANG, X.; YANG, S.; DONG, Y.; ZHAO, Q; YANG, J.; CONG, K.; ZHANG, J.; ZHANG, G.; WANG, Y.; FAN, W. De novo Transcriptome Characterization of *Rhodomyrtus tomentosa* Leaves and Identification of Genes Involved in α/β -Pinene and β -Caryophyllene Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, 2018.

HILLWIG, M. L.; XU, M.; TOYOMASU, T.; TIERNAN, M. S.; WEI, G.; CUI, G.; PETERS, R. J. Domain loss has independently occurred multiple times in plant terpene synthase evolution. *The Plant Journal*, v. 68, n. 6, p. 1051-1060, 2011.

HYATT, D. C.; YOUN, B.; ZHAO, Y.; SANTHAMMA, B.; COATES, R. M.; CROTEAU, R. B.; KANG, C. Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 13, p. 5360-5365, 2007.

HOEN, D. R.; PARK, K. C.; ELROUBY, N.; YU, Z.; MOHABIR, N.; COWAN, R. K.; BUREAU, T. E. Transposon-mediated expansion and diversification of a family of ULP-like genes. *Molecular biology and evolution*, v. 23, n. 6, p. 1254-1268, 2006.

IJIMA, Y.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; FRIDMAN, E.; GANG, D. R.; BAR, E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. *Plant physiology*, v. 136, n. 3, p. 3724-3736, 2004.

JIA, Q.; LI, G.; KÖLLNER, T. G.; FU, J.; CHEN, X.; XIONG, W.; CHEN, L. Microbial-type terpene synthase genes occur widely in nonseed land plants, but not in seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 43, p. 12328-12333, 2016.

JIANG, S.; JIN, J.; SAROJAM, R.; RAMACHANDRAN, S. A Comprehensive Survey on the Terpene Synthase Gene Family Provides New Insight into Its

Evolutionary Patterns. *Genome Biology and Evolution*, v. 11, n. 8, p. 2078–2098, 2019.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. MYC2: The Master in Action. *Molecular Plant*, v. 6, n. 3, p. 686–703, 2013.

KAMPRANIS, S. C.; IOANNIDIS, D.; PURVIS, A.; MAHREZ, W.; NINGA, E.; KATERELOS, N. A.; GOODENOUGH, P. W. Rational conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: structural insights into the evolution of terpene synthase function. *The Plant Cell*, v. 19, n. 6, p. 1994–2005, 2007.

KARUNANITHI, P. S.; ZERBE, P. Terpene synthases as metabolic gatekeepers in the evolution of plant terpenoid chemical diversity. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 1166, 2019.

KEELING, C. I.; WEISSHAAR, S.; LIN, R. P.; BOHLMANN, J. Functional plasticity of paralogous diterpene synthases involved in conifer defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 3, p. 1085–1090, 2008.

KEELING, C. I.; WEISSHAAR, S.; RALPH, S. G.; JANCSEK, S.; HAMBERGER, B.; DULLAT, H. K.; BOHLMANN, J. Transcriptome mining, functional characterization, and phylogeny of a large terpene synthase gene family in spruce (*Picea spp.*). *BMC Plant Biology*, v. 11, n. 1, p. 43, 2011.

KEILWAGEN, J., LEHNERT, H., BERNER, T., BUDAHN, H., NOTHNAGEL, T., ULRICH, D., & DUNEMANN, F. The terpene synthase gene family of carrot (*Daucus carota* L.): identification of QTLs and candidate genes associated with terpenoid volatile compounds. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 1930, 2017.

KESZEI, A.; HASSAN, Y.; FOLEY, W. J. A Biochemical interpretation of terpene chemotypes in *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 36, n. 6, p. 652–661, 2010.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; CARTER, R.; KÖLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. *Phytochemistry*, v. 71, n. 8, p. 844–852, 2010.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current opinion in plant biology*, v. 14, n. 3, p. 246–251, 2011.

KÜLHEIM, C.; PADOVAN, A.; HEFER, C.; KRAUSE, S. T.; KÖLLNER, T.G.; MYBURG, A. A.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. The *Eucalyptus* terpene synthase gene family. *BMC Genomics*, v. 16, n. 1, p. 450, 2015.

KÖLLNER, T. G., SCHNEE, C., GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *The Plant Cell*, v. 16, n. 5, p. 1115-1131, 2004.

KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. Molecular and biochemical evolution of maize terpene synthase 10, an enzyme of indirect defense. *Phytochemistry*, v. 70, n. 9, p. 1139-1145, 2009.

LANGE, B. M.; GHASSEMIAN, M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant molecular biology*, v. 51, n. 6, p. 925-948, 2003.

LORETO, F.; BAGNOLI, F.; FINESCHI, S. One species, many terpenes: matching chemical and biological diversity. *Trends in Plant Science*, v. 14, n. 8, p. 416–420, 2009.

MANSFIELD, J. W. Antimicrobial compounds and resistance. The role of phytoalexins and phytoanticipins. In: Slusarenko A, Fraser R, Van Loon L, eds. *Mechanisms of resistance to plant diseases*, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp: 325–370, 2000.

MARTIN, D. M.; AUBOURG, S.; SCHOUWEY, M. B.; DAVIET, L.; SCHALK, M., TOUB, O.; BOHLMANN, J. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *BMC plant biology*, v. 10, n. 1, p. 226, 2010.

MYBURG, A. A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G. A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R. D.; GRIMWOOD, J.; GOODSTEIN, D. M. The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature*, v. 510, n. 7505, p. 356-362, 2014.

OATES, C. N.; KÜLHEIM, C.; MYBURG, A. A.; SLIPPERS, B.; NAIDOO, S. The Transcriptome and Terpene Profile of *Eucalyptus grandis* Reveals Mechanisms of Defense Against the Insect Pest, *Leptocybe invasa*. *Plant and Cell Physiology*, v. 56, n. 7, p. 1418–1428, 2015.

PADOVAN, A.; PATEL, H. R.; CHUAH, A.; HUTTLEY, G.A.; KRAUSE, S. T.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J.; KÜLHEIM, C. Transcriptome Sequencing of Two Phenotypic Mosaic *Eucalyptus* Trees Reveals Large Scale Transcriptome Re-Modelling. PLOS ONE, v. 10, n. 5, p. e0123226, 2015.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. The molecular basis of host plant selection in *Melaleuca quinquenervia* by a successful biological control agent. Phytochemistry, v. 71, n. 11-12, p. 1237–1244, 2010.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; WALLIS, I. R.; FOLEY, W. J. Mosaic eucalypt trees suggest genetic control at a point that influences several metabolic pathways. Journal of chemical ecology, v. 38, n. 7, p. 914-923, 2012.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W. J. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. Phytochemistry reviews, v. 13, n.3, p. 695-716, 2014.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; HASSAN, Y.; KRAUSE, S. T.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W. J. Four terpene synthases contribute to the generation of chemotypes in tea tree (*Melaleuca alternifolia*). BMC Plant Biology, v. 17, n. 1, p. 160, 2017.

PAUL, P.; SINGH, S. K.; PATRA, B.; LIU, X.; PATTANAIK, S.; YUAN, L. Mutually Regulated AP2/ERF Gene Clusters Modulate Biosynthesis of Specialized Metabolites in Plants. Plant Physiology, v. 182, n. 2, p. 840–856, 2020.

PAZOUKI, L.; NIINEMETS, Ü. Multi-substrate terpene synthases: their occurrence and physiological significance. Frontiers in Plant Science, v. 7, p. 1019, 2016.

PERALTA-YAHYA, P. P.; ZHANG, F., DEL CARDAYRE, S. B.; KEASLING, J. D. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. Nature, v. 488, n. 7411, p. 320-328, 2012.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. Current opinion in plant biology, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.

PILLON, Y.; LUCAS, E.; JOHANSEN, J. B.; SAKISHIMA, T.; HALL, B.; GEIB, S. M.; STACY, E. A. An expanded *Metrosideros* (Myrtaceae) to include *Carpolepis* and *Tepualia* based on nuclear genes. Systematic Botany, v. 40, n. 3, p. 782-790, 2015.

PHILLIPS, M. A.; WILDUNG, M. R.; WILLIAMS, D. C.; HYATT, D. C.; CROTEAU, R. cDNA isolation, functional expression, and characterization of (+)- α -pinene synthase and (-)- α -pinene synthase from loblolly pine (*Pinus taeda*): Stereocontrol in pinene biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 411, n. 2, p. 267-276, 2003.

QIAN, J.; LIU, Y.; CHAO, N.; MA, C.; CHEN, Q.; SUN, J.; WU, Y. Positive selection and functional divergence of farnesyl pyrophosphate synthase genes in plants. *BMC Molecular Biology*, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2017.

QIU, F.; WANG, X.; ZHENG, Y.; WANG, H.; LIU, X.; SU, X. Full-Length Transcriptome Sequencing and Different Chemotype Expression Profile Analysis of Genes Related to Monoterpenoid Biosynthesis in *Cinnamomum porrectum*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 24, p. 6230, 2019.

QUEIROZ, J. M. G. D.; SUZUKI, M. C. M.; MOTTA, A. P. R.; NOGUEIRA, J. M. R.; CARVALHO, E. M. D. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. 2015.

SAMAD, A. F. A.; RAHNAMAIE-TAJADOD, R.; SAJAD, M.; JANI, J.; MURAD, A. M. A.; NOOR, N. M.; ISMAIL, I. Regulation of terpenoid biosynthesis by miRNA in *Persicaria minor* induced by *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics*, v. 20, n. 1, p. 586, 2019.

SCHLUTTENHOFER, C.; YUAN, L. Regulation of Specialized Metabolism by WRKY Transcription Factors. *Plant Physiology*, v. 167, n. 2, p. 295–306, 2015.

STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chemistry & biodiversity*, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

TAKOS, A. M.; ROOK, F. Why biosynthetic genes for chemical defense compounds cluster. *Trends in Plant Science*, v. 17, n. 7, p. 383–388, 2012.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 193, p. 51-88, 2019.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta*, v. 249, n. 1, p. 1-8, 2019.

THOLL, D.; LEE, S. Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists, v. 9, 2011.

THORNHILL, A. H.; HO, S. Y.; KÜLHEIM, C.; CRISP, M. D. Interpreting the modern distribution of Myrtaceae using a dated molecular phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 93, p. 29-43, 2015.

THRIMAWITHANA, A. H.; JONES, D.; HILARIO, E.; GRIERSON, E.; NGO, H. M.; LIACHKO, I.; DAVID, C. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, v. 47, n. 4, p. 233-260, 2019.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, v. 158, n. 2, p. 811-832, 2001.

TRINDADE, H.; PEDRO, L. G.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G. Chemotypes and terpene synthase genes in *Thymus* genus: State of the art. *Industrial Crops and Products*, v. 124, p. 530-547, 2018.

VAN BAKEL, H.; STOUT, J. M.; COTE, A. G.; TALLON, C. M.; SHARPE, A. G.; HUGHES, T. R.; PAGE, J. E. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biology*, v. 12, n. 10, p. R102, 2011.

VRANOVÁ, E., COMAN, D.; GRUISSEM, W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual review of plant biology*, v. 64, p. 665-700, 2013.

VATTEKKATTE, A.; GARMS, S.; BRANDT, W.; BOLAND, W. Enhanced structural diversity in terpenoid biosynthesis: enzymes, substrates and cofactors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 16, n. 3, p. 348-362, 2018.

XU, J.; VAN HERWIJNEN, Z. O.; DRÄGER, D. B.; SUI, C.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. SIMYC1 Regulates Type VI Glandular Trichome Formation and Terpene Biosynthesis in Tomato Glandular Cells. *The Plant Cell*, v. 30, n. 12, p. 2988-3005, 2018.

XU, M.; WILDERMAN, P. R.; PETERS, R. J. Following evolution's lead to a single residue switch for diterpene synthase product outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 18, p. 7397-7401, 2007.

XU, Y.; WANG, J.; WANG, S.; WANG, J.; CHEN, X. Characterization of GaWRKY1, a Cotton Transcription Factor That Regulates the Sesquiterpene Synthase Gene (+)- δ -Cadinene Synthase-A. *Plant Physiology*, v. 135, n. 1, p. 507-515, 2004.

WILSON, P. G. Myrtaceae. In 'The families and genera of vascular plants. Vol. X. Flowering plants Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae'. (Ed. K Kubitzki) pp. 212–271, 2011.

WILLIAMS, D. C.; MCGARVEY, D. J.; KATAHIRA, E. J.; CROTEAU, R. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry*, v. 37, n. 35, p. 12213-12220, 1998.

WIMBERLEY, J.; CAHILL, J.; ATAMIAN, H. S. De novo Sequencing and Analysis of *Salvia hispanica* Tissue-Specific Transcriptome and Identification of Genes Involved in Terpenoid Biosynthesis. *Plants*, v. 9, n. 3, p. 405, 2020.

WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics* v.75, n. 2, p. 225–233, 1988.

YANG, C. Q.; WU, X. M.; RUAN, J. X.; HU, W. L.; MAO, Y. B.; CHEN, X. Y.; WANG, L. J. Isolation and characterization of terpene synthases in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Phytochemistry*, v. 96, p. 46-56, 2013.

ZAYNAB, M.; FATIMA, M.; ABBAS, S.; SHARIF, Y.; UMAIR, M.; ZAFAR, M.H.; BAHADAR, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis* v. 124, p. 198–202, 2018.

ZHANG, Y.; JI, A.; XU, Z.; LUO, H.; SONG, J. The AP2/ERF transcription factor SmERF128 positively regulates diterpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Molecular Biology*, v. 100, n. 1–2, p. 83–93, 2019.

ZHOU, F.; SUN, T.; ZHAO, L.; PAN, X.; LU, S. The bZIP transcription factor HY5 interacts with the promoter of the monoterpene synthase gene QH6 in modulating its rhythmic expression. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 2015.

ZHOU, H.; SHAMALA, L. F.; YI, X.; YAN, Z.; WEI, S. Analysis of Terpene Synthase Family Genes in *Camellia sinensis* with an Emphasis on Abiotic Stress Conditions. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 933, 2020.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, v. 3, n. 1, p. 1, 2008.

Apoio: UFES, FAPES, CAPES, CNPq.

ANÁLISE METABOLÔMICA APLICADA A GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS

Mariana Neves Catrinck

Isabel Samila Lima Castro

Vinicius Sartori Fioresi

Jônatas Gomes Santos

Tiago Antônio de Oliveira Mendes

1. INTRODUÇÃO

A metabolômica é uma área de estudos que integra o campo de pesquisas das ciências chamadas “ômicas”, que incluem essencialmente a genômica, transcriptômica e proteômica. Todas as abordagens ômicas visam compreender o papel das moléculas biológicas de um organismo e sua resposta a alterações genéticas e estímulos ambientais (ROESSNER; BOWNE, 2009).

Por definição, metabolômica é o estudo abrangente que visa a identificação e quantificação de todas as moléculas de baixa massa molecular (<1500 Da), conhecidas como metabólitos, em um sistema biológico (FIEHN, 2001). Neste sentido, o estudo de metabolômica se destaca das demais abordagens ômicas, pois a identificação e quantificação dos metabólitos refletem diretamente o estado funcional da fisiologia de um organismo (FIEHN, 2001; NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999).

A metabolômica ainda se destaca como uma área de estudos interdisciplinar com diversas aplicações em diferentes áreas do conhecimento como análises clínicas, alimentos e nutrição, esportes, ambiental, toxicologia forense, ou análise de organismos patológicos (parasitas, bactérias, fungos), entre outras (CANUTO et al., 2018). Neste capítulo será abordado o uso da metabolômica para o estudo de plantas e sua interação com o ambiente.

As plantas são constantemente submetidas a condições ambientais que afetam seu desenvolvimento e produtividade. Tais condições incluem fatores bióticos,

como a infecção por patógenos e o ataque de herbívoros, e fatores abióticos, como a seca, salinidade, temperatura, deficiência de nutrientes ou metais tóxicos no solo (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003; ZHU, 2016). Como resposta ao estresse, as plantas comumente ativam mecanismos de defesa induzindo o acúmulo e/ou redução de compostos do metabolismo primário e secundário que podem ser identificados através da análise do perfil metabolômico (do inglês *metabolite profile*) (HARRIGAN; MARTINO-CATT; GLENN, 2007; LISEC et al., 2006).

Portanto, a análise metabolômica aplicada ao estudo da biologia vegetal é uma abordagem que se mostra muito útil, pois além de auxiliar no entendimento do metabolismo desses seres vivos, também pode trazer melhorias em termos de otimização dos cultivares (SIMÓ et al., 2014).

2. ABORDAGENS EM METABOLÔMICA DE PLANTAS

Apesar do estudo de metabólitos não ser algo novo na ciência, o termo metabolômica foi definido pela primeira vez em 2001 por Oliver Fiehn e colaboradores do *Max-Planck Institute of Plant Physiology* como sendo a análise abrangente e quantitativa de todos os metabólitos de um sistema biológico (FIEHN, 2001). Do ponto de vista prático, devido às limitações instrumentais, complexidade e variedade química dos metabólitos, ainda não é possível quantificar todos os metabólitos existentes em uma amostra em uma única análise. Estima-se que, apenas no reino vegetal existam, aproximadamente 200,000 metabólitos com propriedades e estruturas químicas diferentes (FIEHN, 2001) e algo em torno de 15,000 dentro de uma espécie de planta individual (FERNIE, 2007), o que torna desafiadora a tarefa de caracterizá-los. Assim, surgem na literatura diferentes abordagens orientadas para o estudo de metabólitos (Figura 1), tais como perfil metabólico ou metabonômica, impressão digital metabólica (do inglês, *metabolic fingerprint*), endometabolômica (metabólitos intracelulares) e exometabolômica (do inglês, *footprint* que são os metabólitos extracelulares). Contudo, independente do tipo de abordagem, os estudos em metabolômica se fundamentam na análise comparativa de um ou mais estados de um sistema biológico para identificar possíveis biomarcadores relacionados à alterações genéticas e/ou ambientais (CANUTO et al., 2018; LISEC et al., 2006). A escolha da abordagem é definida

pelo objetivo do estudo e, conseqüentemente, determinará a escolha do método de preparo de amostras, na técnica analítica e no tratamento dos dados (CANUTO et al., 2018; KRASTANOV, 2010).

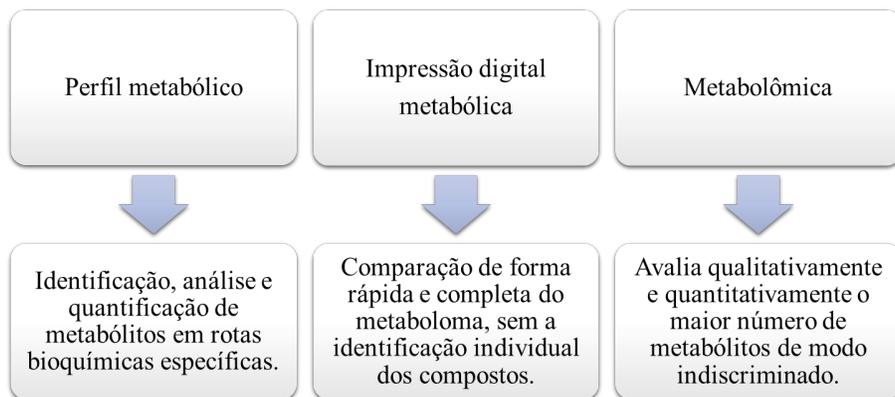


Figura 1: Abordagens utilizadas para identificação e quantificação de metabólitos.

2.1. Perfil Metabólico

O termo “perfil metabólico” é originário do inglês *profile metabolic*. Essa denominação foi inicialmente proposta por Horning & Horning (1971), a partir da utilização de métodos de cromatografia em fase gasosa (GC) no estudo de metabólitos humanos. Atualmente, perfil metabólico tem sido definido como a identificação, análise e quantificação de metabólitos em rotas bioquímicas específicas ou metabólitos predefinidos pertencentes a uma determinada classe (carboidratos, lipídios, aminoácidos etc.) (CANUTO et al., 2018; FIEHN, 2002; KAISER et al., 2008).

Os estudos cujo objetivos estão voltados para a identificação de perfis metabólicos se baseiam na comparação entre grupos experimentais para determinar as variações de metabólitos. Estas comparações se dão por meio da utilização de um grupo teste (amostras susceptíveis à alterações), que seria o objeto de estudo e um grupo controle (amostras não alteradas) (CANUTO et al., 2018). Liu et al., (2019) avaliaram os metabólitos produzidos em regiões responsáveis pela adesão das raízes ao solo em condições de estresse hídrico. Para isso, comparam o perfil metabólico de dois ecotipos de gramas (*Panicum virgatum* L) por meio

de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os resultados evidenciaram alterações nos níveis de açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos em resposta ao estresse hídrico.

Um estudo realizado por Nardozza et al., (2013) identificou variações nos níveis metabólicos durante o desenvolvimento de kiwis (*Actinidia Lindl. Spp.*). Os resultados mostraram um aumento na concentração da glicose durante o ciclo celular. Quando houve a diminuição dos níveis de glicose houve um aumento no acúmulo de amido. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que a utilização do estudo de perfis metabólicos é relevante para o melhoramento genético de características de qualidade da fruta.

2.2. Impressão Digital Metabólica

Os termos “impressão digital metabólica” ou “*fingerprinting metabolic*” são utilizados quando é feita uma comparação de forma rápida e completa dos sinais de detecção dos metabólitos, sem a identificação dos compostos que originaram estes sinais (CANUTO et al., 2018; FIEHN, 2002; KRASTANOV, 2010). O desenvolvimento dessa abordagem requer a utilização de instrumentos analíticos com alta resolução. Para isso, faz-se o uso de técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa (EM) ou espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (*FT-IR*) (FIEHN, 2001; ZHANG et al., 2012).

No estudo de metabolômica de plantas, a utilização da abordagem de impressão digital metabólica tem sido feita em diferentes áreas. Safer et al., (2011) fez o uso da associação de técnicas CG-EM e RMN para revelar informações a respeito dos padrões metabólicos em 11 espécies de *Leontopodium alpinum*. Esta planta é comumente utilizada na medicina popular. Os resultados revelaram dois grupos de espécies. No grupo A foram identificados ácidos graxos e sacarose e no grupo B foram identificados ácido caurenóico e seus derivados, indicando que o método oferece informações valiosas sobre os padrões metabólicos das diferentes espécies.

2.3. Metabolômica

A metabolômica não alvo específica (do inglês, *untargeted metabolomics*) avalia qualitativamente e quantitativamente o maior número de metabólitos de modo indiscriminado, sendo que, estes metabólitos podem fazer parte de classes químicas diferentes (CANUTO et al., 2018; PILON et al., 2020). Por outro lado, a metabolômica alvo específica (do inglês, *targeted metabolic*) é definida como a quantificação precisa de um, ou um pequeno conjunto de metabólitos previamente selecionados de uma classe ou rota metabólica específica (CANUTO et al., 2018; KRASTANOV, 2010). Geralmente estes metabólitos estão associados a resposta a um estímulo (PILON et al., 2020).

Os estudos metabólicos têm grande importância em diferentes áreas do conhecimento. French, Harvey e McCullagh (2018), trabalhando com plantas, utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM) para estudar o perfil metabólico de 17 espécies utilizadas no combate a doenças em gados. Os resultados revelaram uma variedade de metabólitos secundários cujos compostos apresentam propriedades antimicrobiana e anti-helmíntica. Baseado nisso, os autores concluíram que estes compostos podem ser incluídos na alimentação utilizada pelos animais por meio da engenharia metabólica.

3. INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA

Várias técnicas analíticas podem ser empregadas na análise metabolômica, contudo as técnicas mais difundidas são a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM). Esta última é mais comumente utilizada hifenada à alguma técnica de separação, mais comumente à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês *HPLC*) ou à cromatografia em fase gasosa (CG). Existem vantagens e limitações associadas à cada técnica e, mais importante, ainda não há um método único capaz de analisar todas as classes de metabólitos presentes no metaboloma (CANUTO et al., 2018; LISEC et al., 2006). O tipo de amostra e, por consequência, o preparo de amostras influenciam diretamente na escolha da técnica analítica.

3.1. Espectrometria de massas

A EM é uma técnica analítica em que moléculas de uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são subsequentemente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z . O resultado é apresentado na forma de um gráfico, denominado espectro de massas, que mostra a abundância (intensidade) relativa de cada íon que aparecem como picos (eixo y) em função da razão m/z definidos (eixo x) (Figura 2). Esses espectros são usados para determinar a assinatura elementar ou isotópica de uma amostra, as massas das partículas e das moléculas e para elucidar a identidade química ou estrutura das moléculas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). O espectro de massas poder ser obtido para razões m/z tanto no modo positivo quanto no negativo, sendo o positivo mais comumente empregado em metabolômica.

Um EM consiste, basicamente, de três componentes, sendo eles uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector, todos submetidos à alto vácuo. A fonte de ionização converte uma parte da amostra em íons em fase gasosa. Existe uma grande variedade de técnicas de ionização, dependendo da natureza física da amostra (sólida, líquida, gasosa) e da eficiência de vários mecanismos de ionização para as espécies desconhecidas. Após a formação dos íons, estes, são então direcionados através do analisador de massas para o detector. As diferenças nas massas dos fragmentos permitem que o analisador de massas separe os íons de acordo com sua razão m/z (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; ZHOU et al., 2012). Diversos analisadores de massas estão disponíveis comercialmente (PILON et al., 2020), contudo os mais utilizados em estudos de metabolômica de plantas são os analisadores por tempo de voo (do inglês, *time of flight* -ToF) e o tipo quadrupolo (LISEC et al., 2006). A EM, ao contrário da RMN, é uma técnica destrutiva, ou seja, não é possível recuperar as amostras após a análise. A EM pode ser usada isoladamente, por meio da inserção direta da amostra no instrumento, contudo, quanto associada à uma técnica de separação há uma melhora na identificação e quantificação dos metabólitos.

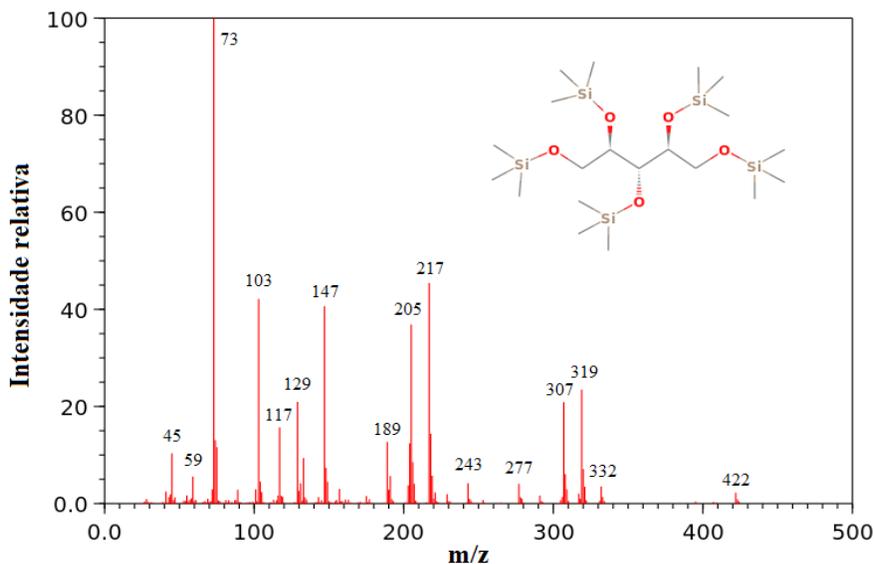


Figura 2: Espectro de massas do derivado ribitol-5TMS. Obtido após reação de derivatização para análise por CG-EM. Fonte: (NIST CHEMISTRY WEBBOOK, [s.d.]

Em todas as técnicas cromatográficas, os componentes de uma mistura são separados por uma dinâmica diferencial do processo migratório em um sistema contendo uma fase móvel (FM), que pode ser um gás, líquido ou fluido supercrítico, e uma fase estacionária (FE) imiscível fixa, colocada em uma coluna ou sobre uma superfície sólida. A amostra se dilui na FM que é, então, forçada a passar através da FE. Os componentes da amostra possuem mobilidades distintas devido às diferentes interações existentes com a FE e / ou a FM. Os componentes que interagem mais fortemente com a FE movem-se mais lentamente no fluxo da FM e àqueles que interagem mais fracamente com a FE se movem mais rapidamente (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Na CG, a FM é um gás inerte, geralmente He, N₂ ou H₂, já na CLAE a FM é composta por um solvente orgânico ou uma solução aquosa ou uma mistura entre eles.

3.1.1. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A compatibilidade dos requisitos instrumentais e de funcionamento, permitiu um acoplamento relativamente simples entre o CG e o EM. Em um instrumento CG-EM a saída da coluna capilar é diretamente conectada à fonte de ionização do espectrômetro (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Para fins de padronização de resultados, existem protocolos específicos que orientam os trabalhos em metabolômica. A fonte de ionização mais utilizada é a de ionização por elétrons (IE) com energia padronizada em 70eV, os analisadores de massas mais utilizados são o quadrupolo simples e o ToF. As colunas capilares mais utilizadas são as de sílica fundida composta por 5% de grupos fenil ou 35% de polidimetilsiloxano junto com uma pequena coluna de guarda para aumentar a sensibilidade (FIEHN, 2016; LISEC et al., 2006; PILON et al., 2020). A Figura 3 mostra um típico instrumento de CG-EM do tipo quadrupolo.

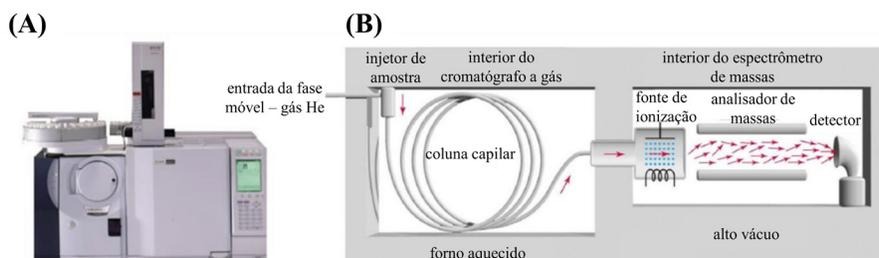


Figura 3: (A) Cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas. (B) Esquema do interior do forno do CG e do detector por EM.

A CG-EM tem sido amplamente empregada para a investigação do metaboloma de plantas (LISEC et al., 2006), sendo considerado um método robusto por meio do qual é possível a identificação e quantificação de algumas centenas de metabólitos (compostos com massa até aproximadamente 650 Da) em um único extrato vegetal. Tal fato, resulta em uma cobertura abrangente das vias centrais do metabolismo primário (LISEC et al., 2006), tais como os compostos polares mono-, di- e tri-sacarídeos, fosfatos de açúcares, polióis, aminoácidos,

ácidos orgânicos e poliaminas (FIEHN, 2001; MOCO et al., 2007), no entanto, é necessário uma etapa de derivatização da amostra (descrito no tópico de preparo de amostras) a fim de tornar os compostos voláteis para serem analisados.

Das diversas bibliotecas de compostos, a NIST14 (do inglês, *Mass Spectral Library collection of the U.S. National Institute of Standards and Technology*) é a mais ampla, porém, no que se refere ao estudo de metabolômica de plantas, destaca-se a biblioteca GMD (do inglês, *Golm Metabolome Database*), mantida pelo *Max-Planck Institute of Plant Physiology* que é uma base de dados dedicada à experimentos de perfil metabólico de plantas (HUMMEL et al., 2010; PILON et al., 2020).

3.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)

O acoplamento entre a CLAE e a EM só foi possível após o desenvolvimento de interfaces compatíveis entre os dois instrumentos e de fontes de ionização em pressão atmosférica, sendo a ionização por eletrospray (do inglês, *electrospray ionization* - ESI) a mais comumente aplicada em estudos de perfil metabolômico (PILON et al., 2020; ZHOU et al., 2012). A configuração instrumental é parecida com a do CG-EM, com a diferença que a FM é um líquido e, portanto, o eluente que sai da coluna cromatográfica passa primeiro por uma interface, que reduz o volume da vazão de solventes, para, em seguida, direcionar a amostra para a fonte de ionização (Figura 4)

Para o estudo de metabolômica global, a coluna mais utilizada é a C18 (fase reversa) devido ao melhor poder de resolução para os compostos de média polaridade em matrizes biológicas. A CLAE-EM é adequada para análise de compostos semi-polares (50 à 1500 Da), tais como ácidos fenólicos, flavonoides, esteroides glicosilados, alcaloides e outras espécies glicosiladas sem a necessidade de qualquer tipo de derivatização (PILON et al., 2020; ZHOU et al., 2012). Também é possível analisar amostras apolares, contudo, é necessário a utilização de uma coluna de fase normal e a fonte de ionização mais adequada é a de ionização química à pressão atmosférica (do inglês, *atmospheric-pressure chemical ionization* – APCI) (ZHOU et al., 2012).

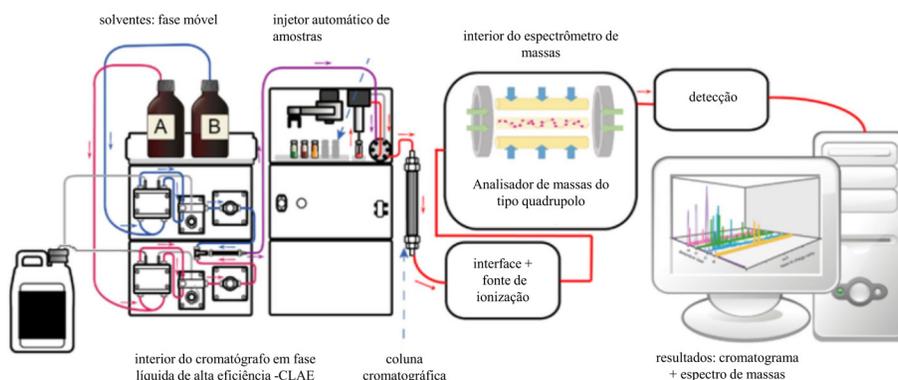


Figura 4: Esquema de um instrumento CLAE-EM. Adaptado de: (BUSTILLOS, [s.d.]).

Os analisadores de massas empregados em CLAE-EM possuem, no geral, alta resolução sendo possível encontrar algumas configurações instrumentais no modo tandem, ou sequencial, que combinam dois ou mais analisadores de massas. Os analisadores modernos do tipo ToF, Orbitrap, Transformada de Fourier de ressonância ciclotron de íons (do inglês, *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry* - FT-ICR) e triplo quadrupolo geram espectros de alta resolução, o que auxilia ainda mais a identificação dos metabólitos (ZHOU et al., 2012).

Embora os métodos baseados em CLAE-EM apresentem faixa mais ampla de metabólitos detectáveis, as bibliotecas espectrais são significativamente menores em tamanho quando comparadas com as de CG-EM. Além disso, possuem menor reprodutibilidade dos tempos de retenção e são mais suscetíveis aos efeitos de supressão de íons devido ao uso predominante de ionização por spray de elétrons, o que torna a quantificação precisa mais difícil (LISEC et al., 2006; ZHANG et al., 2012; ZHOU et al., 2012).

3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica qualitativa e quantitativa altamente reprodutível, não destrutiva e não seletiva, ou seja, é possível recuperar a amostra após a análise e não depende das características químicas dos compostos observados, como polaridade e acidez (pKa) (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; PILON et al., 2020). Amplamente aplicada para elucidação de estruturas químicas, a técnica baseia-se na medida física da ressonância de núcleos magnéticos, tais como ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F ou ^{31}P , quando submetidos a um campo magnético externo/forte (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Tomemos como exemplo o RMN ^1H (Figura 5). A quantidade de sinais mostra quantos tipos diferentes de hidrogênios estão presentes na molécula/amostra. A localização dos sinais nos revela o ambiente químico do hidrogênio, se o núcleo do hidrogênio é protegido ou desprotegido. A intensidade do sinal mostra a quantidade de hidrogênios do mesmo tipo que estão contribuindo para o sinal. O desdobramento do sinal mostra o número de hidrogênios dos átomos adjacentes.

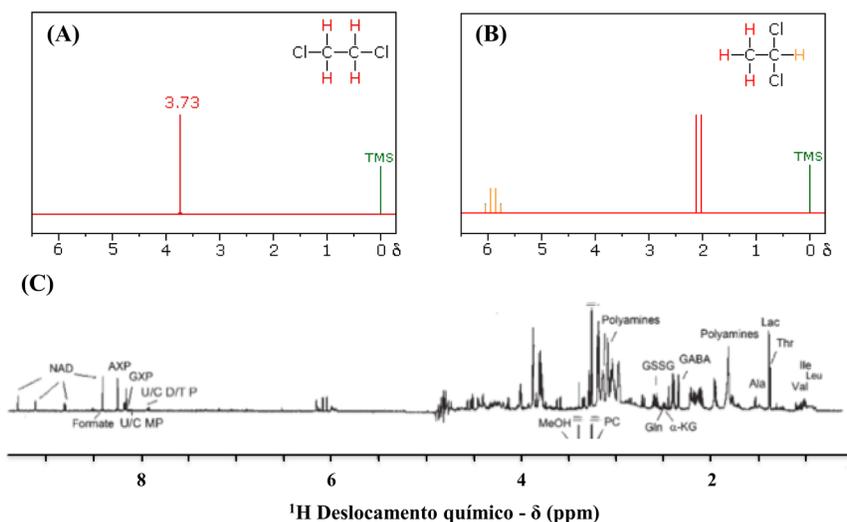


Figura 5:Exemplos de espectro de RMN dos compostos puros 1,2 dicloroetano (A), 1,1 dicloroetano (B) e da mistura de metabólitos observados durante análise metabolômica (C).

Os sinais obtidos no espectro de RMN são diretamente proporcionais à concentração molar independente da característica de um composto. A concentração absoluta de metabólitos pode ser calculada por comparação da intensidade do pico de um padrão. O sinal do padrão pode ser obtido de diversas maneiras, sendo elas: (a) adição de padrão interno, onde o ácido trimetilsililpropanóico (TPS) além de ser usado como referência para calibrar o deslocamento químico no RMN também pode ser utilizado como padrão interno; (b) adição artificial de sinal após aquisição por método ERETIC (*Electronic Reference To access In vivo Concentrations*); (c) adição artificial de sinal após aquisição por QUANTAS (*QUANTification by Artificial Signal*); ou adição de sinal residual de solvente protonado (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010; PILON et al., 2020).

A RMN se firmou como umas das principais técnicas no estudo de metabolômica na área médica e farmacêutica pois, por ser uma técnica de análise não destrutiva, é possível ser aplicada em análises *in vivo* (MARKLEY et al., 2017). Em metabolômica de plantas, a RMN tem muitas aplicações sendo usada na genômica funcional e para discriminar plantas de diferentes origens ou após diferentes tratamentos (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010). No entanto, a quantidade de trabalhos publicados utilizando a RMN são menores em comparação as técnicas de EM (ZHANG et al., 2012). Isto ocorre, em partes, devido à baixa sensibilidade da técnica, o que a torna inadequada para a análise de metabólitos de baixa abundância (LISEC et al., 2006).

4. DA AMOSTRAGEM À INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

4.1. Planejamento experimental

Para que a análise metabolômica seja realizada com sucesso, independente do organismo a ser analisado, um bom planejamento experimental (PE) é essencial. O PE é a primeira etapa para a experimentação científica. Em metabolômica, o PE deve ser elaborado levando em consideração todas as etapas do estudo, uma vez que cada escolha interfere nos resultados e na interpretação dos dados obtidos. Essa etapa envolve a escolha do tipo de amostra a ser utilizada (tipo de fluido biológico, célula, tecidos, folhas, raízes etc.), a definição do número de amostras que serão

avaliadas e como essas amostras serão coletadas e armazenadas antes da etapa de extração (CANUTO et al., 2018). Uma vez que os experimentos metabolômicos são caros, é crucial determinar o tamanho ideal da amostra para atingir o potencial desejado para identificar metabólitos discriminantes sem desperdiçar recursos. Atualmente existem softwares capazes de determinar o tamanho amostral com base nos objetivos e técnicas analíticas utilizadas no estudo, descartando a necessidade de experimento piloto (NYAMUNDANDA et al., 2013).

4.2. Coleta da amostra e *quenching* metabólico

O procedimento de coleta da amostra é uma etapa importante que pode levar a resultados tendenciosos, sendo um dos principais fatores de erro em metabolômica de plantas. Alguns fatores devem ser levados em consideração no ato da coleta, como as condições físicas, química, biológicas e geográficas do conjunto amostral (PILON et al., 2020). Por exemplo, se o material a ser coletado estiver em casa de vegetação ou em qualquer outro ambiente com variáveis supostamente controladas, deve-se levar em conta que ainda assim pode ocorrer alterações nos perfis metabólicos de plantas geneticamente idênticas devido ao fenômeno chamado “efeito de borda”. Para evitar esses resultados, as plantas devem ser periodicamente redistribuídas randomicamente entre o centro e as bordas da casa de vegetação. No campo, onde as variáveis são dificilmente controladas, devem ser selecionados locais para a experimentação em que são oferecidas informações adicionais, como características do solo, altimetria, irradiação ultravioleta, temperatura etc. (PILON et al., 2020).

Um passo importante, geralmente realizado durante a coleta das amostras, é chamado de *quenching* metabólico, que se refere à interrupção imediata da atividade enzimática, por meio da adição de solventes orgânicos resfriados ou do congelamento imediato das amostras com uso de gelo seco ou nitrogênio líquido. As amostras coletadas devem ser devidamente armazenadas em baixas temperaturas (-80 °C é muito utilizado), para evitar degradação ou ativação de enzimas (CANUTO et al., 2018). Protocolos de amostragem e armazenamento inadequados podem levar a resultados tendenciosos devido a conversão ou degradação de metabólitos. Sendo assim, a manipulação precisa ser rápida o suficiente para garantir que o perfil metabólico reflita as condições *in vivo*.

4.3. Secagem e homogeneização

Um das principais desvantagens na preparação de amostras para análises metabolômicas é a falta de referências ou abordagens convencionais a serem aplicadas, isso ocorre devido à grande heterogeneidade amostral existente em experimentos de metabolômica. Com relação à metabolômica de plantas, a grande variedade de amostras disponíveis, por exemplo, folhas, raízes, seiva, frutas, caules, tubérculos, flores e materiais derivados (por exemplo, óleo, vinho, resinas), além da variedade de espécies, refletem no grande número de pesquisas neste campo (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al. 2010).

Ciclos de congelamento/descongelamento de amostras devem ser evitados em protocolos de metabolômica. Para amostras com altos níveis de umidade, como é o caso das plantas, a liofilização é recomendada para melhorar sua estabilidade. Amostras liofilizadas guardadas por determinado tempo devem ser liofilizadas novamente antes da análise, devido a sua capacidade de absorção de umidade durante o armazenamento (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2010).

As amostras devem ser padronizadas com relação ao tamanho do tecido, tal fato garante a homogeneidade amostral na extração. Essa padronização pode ser obtida triturando ou moendo a amostra de tecido com a ajuda de almofariz e pistilo, que são muito utilizados em metabolômica. Esse controle granulométrico garante a proporcionalidade da área de contato entre a matriz e o solvente extrator. De forma ideal, o processo de coleta e preparação da amostra deveria ser seguido imediatamente pelo processo de extração, mas como muitas vezes isso não é possível, as amostras podem ser armazenadas em freezer -80 °C.

4.4. Processo de extração

O método de extração mais popular é a extração por solvente. Existem vários aspectos a serem considerados antes da extração, como as características do solvente selecionado, relação solvente e amostra, duração da extração, temperatura, dentre outros. O grande desafio da metabolômica é o fato de que o metaboloma consiste em uma ampla variedade de compostos com níveis e polaridades muito diferentes. Sendo assim, será necessária a utilização de diferentes solventes, que poderão ser

selecionados de acordo com a classe de compostos a que se deseja estudar (Figura 6). Outro aspecto a ser considerado é a taxa de dissolução do solvente escolhido. A taxa de dissolução pode ser lenta, o que significa que é necessário aumentar a duração da extração, ou adicionar energia ao sistema aumentando a temperatura (aquecimento convencional ou micro-ondas) ou tratamento ultrassônico (KIM and VERPOORTE, 2010). Os solventes também são selecionados baseado em suas propriedades físico-químicas, como polaridade, seletividade e toxicidade. Essa escolha irá influenciar diretamente as plataformas analíticas que serão utilizadas, além da análise dos dados.

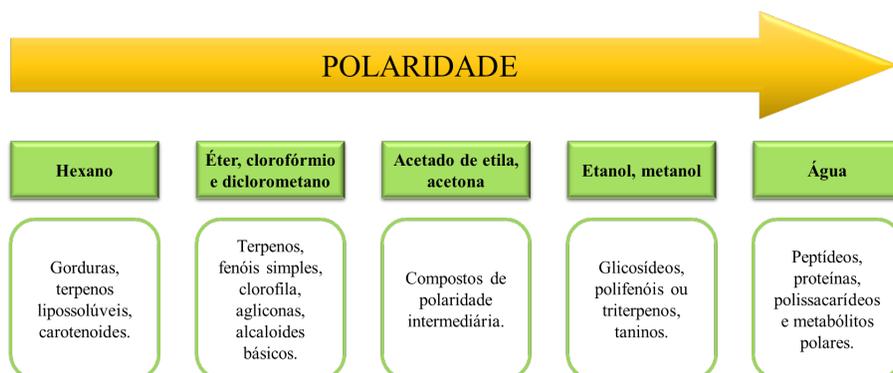


Figura 6: Perfil de metabólitos extraídos por diferentes solventes.

Para a extração de ácido-base, por exemplo, a utilização do ácido perclórico é eficiente em plantas para a identificação de metabólitos primários. A extração com ácido perclórico desnatura as proteínas, resultando, assim, em um extrato livre de proteínas. Naturalmente, esse tipo de extração é apropriado apenas para metabólitos que são estáveis em condições ácidas. Este tipo de técnica de extração permitirá apenas que os compostos polares, hidrofílicos ou básicos sejam analisados (MUSHTAQ et al., 2014). No caso de solventes aquosos, o pH é um importante fator, pois condições ácidas ou básicas podem levar ao surgimento de vários tipos de artefatos. Por exemplo, o metabólito comum ácido clorogênico (ácido 5-cinamoil-quinico) é facilmente convertido nos isômeros 3- e 4- (VERPOORTE et al., 2008).

Para a extração de metabólitos moderadamente polares, apolares ou hidrofóbicos, solventes orgânicos devem ser utilizados. Utilizando um sistema de solvente de duas fases com água-metanol-clorofórmio, além dos metabólitos polares hidrofílicos, os compostos apolares também podem ser extraídos simultaneamente. Outras vantagens incluem a compatibilidade da maioria dos solventes orgânicos com todas as plataformas analíticas, incluindo CG-EM, CLAE-EM, CLAE, RMN e eletroforese capilar (EC), facilidade de evaporação do solvente, ausência de precipitados de sais e estabilidade aumentada dos metabólitos extraídos (MUSHTAQ et al., 2014). O uso de álcoois, especialmente metanol, etanol e em menor grau isopropanol, sozinhos ou mais comumente em misturas com proporções variáveis de água, confere um alto poder de solubilização que lhes permite extrair uma ampla gama de metabólitos, tais como açúcares, ácidos orgânicos, alcaloides, compostos fenólicos, dentre outros (SZOPA et al., 2001; VORST et al., 2005). No caso de análises de metabólitos polares em CG-EM, em que a escolha do solvente é limitada às características dos compostos voláteis, etapas de derivatização são necessárias. De forma resumida, as derivatizações ocorrem em duas etapas: i) a metoximação, em que a metoxiamina reduz a ciclização de açúcares e protege os grupos carbonila e ii) a sililação, na qual os derivados de trimetilsilano substituem hidrogênios ácidos por grupos silanóis, reduzindo o ponto de ebulição dos analitos (PILON et al., 2020).

Outras técnicas, utilizando meios mecânicos, podem ser empregadas para aumentar a eficiência da extração. Ultrassom e micro-ondas são comumente usados em métodos de extração para fornecer energia auxiliar em amostras sólidas e acelerar o processo de solubilização. A extração assistida por ultrassom é mais rápida do que métodos clássicos, como a extração Soxhlet. A tecnologia de micro-ondas também é eficiente como método de extração alternativo podendo ajudar a reduzir o tempo de extração, melhorando as taxas de transporte de moléculas, agitação molecular e aquecimento de solventes acima de seus pontos de ebulição (HAE CHOI and VERPOORTE, 2014).

4.5. Pré-processamento dos dados

O pré-processamento dos dados é uma etapa intermediária entre a aquisição dos dados obtidos e a análises estatísticas finais, com objetivo de melhorar a

qualidade dos sinais identificados nas diversas metodologias analíticas, além de reduzir a interferência de ruídos gerados durante a leitura, tornando assim os dados comparáveis entre si. O pré-processamento garante a detecção e a quantificação de picos de alta qualidade, eliminando alterações causadas por variações encontradas nas amostra e no equipamento utilizado (CRAIG et al., 2006; DE MEYER et al., 2010; EBBELS; LINDON; COEN, 2011; WANG et al., 2012).

Durante o pré-processamento existem funções específicas para cada técnica analítica, entretanto a grande maioria são gerais para as matrizes de dados, o que permite aplicar diferentes funções e algoritmos de otimização. Quando se trata de dados obtidos por RMN, o referenciamento e faseamento são de grande importância. Os dados obtidos passam pelo cálculo de transformada de Fourier (FT), onde os dados são convertidos do domínio tempo para o domínio de frequência. Após a FT, é realizado o referenciamento (ou calibração), que visa a corrigir variações globais dos deslocamentos químicos o que permite a correta comparação entre os dados analíticos de diferentes amostras. A calibração é comumente realizada por adição de um padrão interno de deslocamento conhecido, como o tetrametilsilano e hexametilsiloxano ou pelo deslocamento químico do sinal residual do solvente deuterado (PILON et al., 2020).

Por outro lado, nos dados obtidos por cromatografia cada sinal consiste em valores de massa carga e intensidade. O pré-processamento na cromatografia está relacionada na detecção de picos e, portanto, requer funções robustas e reprodutivas para as três dimensões dos dados, ou seja, tempo, relação massa / carga e intensidade dos picos (SMITH et al., 2006).

4.6. Correção de linha de base

Em RMN, distorções da linha de base são comumente originados pela alteração dos primeiros pontos do decaimento indutivo livre, que adicionam modulações de baixa frequência ao espectro. A falta de correção dessas variações pode resultar em dados quimiométricos e quantitativos equivocados, dificultando a análise biológica e a identificação de biomarcadores (XI; ROCKE, 2008). A correção da linha de base é feita diretamente no espectro, podendo ser realizada por diferentes algoritmos. Os algoritmos são responsáveis por construir uma linha

de base teórica que é subtraída dos espectros reais como forma de minimizar as distorções (GAN; RUAN; MO, 2006).

Diversos outros fatores podem influenciar diretamente na obtenção de resultados de boa qualidade das leituras geradas por cromatografia, devido à complexidade do perfil químico e a baixa reprodutibilidade dos instrumentos. Várias funções de pré-processamento são necessárias para garantir o bom alinhamento e resolução dos picos. Uma primeira etapa é a filtração ou subtração do ruído de fundo, que tem por finalidade diminuir o ruído proveniente de interferências instrumentais (TSAI; WANG; RESSOM, 2016). As funções mais comumente utilizadas para a diminuição do ruído são a filtração combinada (*matched filtration*) (SMITH et al., 2006), que se baseia na aplicação de um filtro cujo coeficientes são iguais à extensão da forma do sinal, ou a filtração pela mediana em uma janela de tamanho determinado. Independente da função, recomenda-se que a filtração seja baseada em um espectro de massa em que não haja sinais de interesse (PILON et al., 2020).

4.7. Normalização

A normalização tem como objetivo remover variações encontradas nas análises que não são desejadas entre amostras o que permite a realização de comparações entre as amostras. Em plantas, essa etapa é crucial, pois as variações de concentração podem interferir na interpretação química e biológica das análises multivariadas (NICHOLSON; WILSON, 1989). A normalização em análises feitas por RMN consiste na multiplicação dos espectros de RMN por uma constante, que pode ser realizada por diferentes algoritmos (CRAIG et al., 2006). Como método padrão a normalização por área total é a mais utilizada (SPRAUL et al., 1994) porém, outros métodos também são aplicados de acordo com a complexidade das amostras, como a normalização por padrão interno, por quociente probabilístico (PQ), por histograma ou por agrupamento de *clusters* (DIETERLE et al., 2006). A normalização dos dados de cromatografia pode ser feita por fatores de escala, como valores de média ou mediana, ajustando as intensidades de acordo com os dados que foram obtidos. Outros modelos mais rigorosos também podem ser aplicados, como é o caso dos métodos de regressão (CALLISTER et al., 2006), a

utilização de padrões internos (SYSI-AHO et al., 2007) ou o uso de uma amostra de referência que se baseia em uma mistura que contém os metabólitos de todas as amostras analisadas (DUNN et al., 2011).

Outra forma de normalização é realizada por área total, podendo ser aplicada tanto para dados de cromatografia (CLAE-EM e CG-EM) como para dados de RMN, neste processo o fator de normalização aplicado a cada sinal da amostra é calculado pela soma de todas as informações que podem ser encontradas na amostra em específica. Também podem ser realizadas normalização por quociente probabilístico. Para esse método leva-se em consideração a relação probabilística dos sinais de uma amostra frente a uma referência, dessa forma os sinais observados nas amostras em estudo são confrontados com os da amostra de referência, ou seja, cada sinal de uma amostra é dividido pelo correspondente sinal de amostra referência gerando um quociente. Os valores resultantes são organizados em um histograma, revelando qual é o quociente com maior frequência nas amostras, esse valor então é escolhido como fator de normalização. É importante ressaltar que a escolha dos métodos de normalização depende da origem dos dados amostrados, dessa forma o pré-processamento dos dados devem ser analisados em diferentes fontes de normalização para definir a melhor opção a ser utilizada no conjunto de dados gerados (PILON et al., 2020).

4.8. Transformação de dados

Os dados que são obtidos pelos diferentes métodos amostrais estão sujeitos a diversas variações que afetam as análises quimiométricas subsequentes (CRAIG et al., 2006). Por esse motivo é preciso que os dados sejam transformados para que a estrutura do ruído seja uniformemente distribuída antes das análises estatísticas. A transformação dos dados usualmente pode ser realizada de duas formas. Primeira a transformação log, no qual o logaritmo de cada sinal é calculado e substituído aos dados originais. Esse tipo de transformação visa converter os ruídos multiplicativos em ruídos aditivos. Segunda, por transformação potência, onde valores são transformados com base em potenciações. Embora ele não converta os ruídos multiplicativo pelos aditivos, o feito é similar as transformações log.

4.9. Identificação dos compostos

Nos estudos de metabolômica, após todo o processo de organização dos dados para as diferentes análises a serem propostas, passamos para o processo de identificação dos compostos presentes nas amostras. Essa identificação é feita por meio de comparação dos sinais de detecção com bibliotecas de compostos já existentes em diferentes bancos de dados de metabólitos.

Dentre as bibliotecas disponíveis podemos citar a NIST14, que é extremamente abrangente quanto a diversidade de moléculas. Contudo, para estudos de metabolômica de plantas, destaca-se a biblioteca GMD, que possui depositado o perfil de metabólitos (HUMMEL et al., 2010; PILON et al., 2020). Outras ferramentas de anotação desses compostos podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1: Bancos de dados e ferramentas para identificação de compostos em dados de metabolômica

Fermentas	Técnica Analítica	Website
GNPS	CLAE-EM	https://gnps.ucsd.edu/
Metlin	EM	https://metlin.scripps.edu/
MetFrag	EM	https://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/
MetaboAnalyst2	EM – RMN	http://www.metaboanalyst.ca/
MetDAT	EM	http://smb1.nus.edu.sg/METDAT2/
Metabolome express	CG-EM	https://www.metabolome-express.org/
Metabolite detector	CG-EM	http://md.tu-bs.de/
FOCUS	RMN	http://www.urr.cat/FOCUS/
TagFinder	CG-EM	http://www.TagFinder/index.html
TargetSearch	CG-EM	http://bioconductor.org/packages/2.5/bioc/html/TargetSearch.html

4.10. Análises quimiométricas

Diferentes métodos de modelagem e análises multivariadas podem ser aplicados aos estudos de metabolômica. Podemos destacar os métodos não-supervisionados, onde nenhuma atribuição prévia é feita sobre os dados e estes são agrupados baseados apenas no seu perfil de metabólitos. Por outro lado, para

as abordagens supervisionadas, as amostras são definidas em classes ou associadas a um valor de atributo com uma atividade biológica específica. Métodos lineares baseados em projeções são comumente utilizados em estudos de metabolômica pela simplicidade da interpretação o que auxilia no entendimento de eventos biológicos (PILON et al., 2020).

Nas análises não-supervisionadas busca-se o entendimento de toda a natureza dos dados gerados podendo avaliar padrões ou agrupamentos desses dados. Para a metabolômica de plantas, há uma visão geral da flutuação metabólica o qual permite a identificação e discriminar os grupos estudados através de métodos exploratório (PILON et al., 2020). Existem diversos métodos não-supervisionados, sendo a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) os mais utilizados.

Por outro lado, as análises supervisionadas, atualmente, têm desenvolvido papel fundamental principalmente na descoberta de biomarcadores e metabólitos bioativos (DONG et al., 2011; WANG et al., 2012). Para esse tipo de análise, os dados necessitam ser comparados com um modelo, que deve ser robusto e estatístico, sendo este criado através de dados biológicos, taxonômicos ou químicos. Nesse tipo de análise é forçada a separação dos dados de acordo como o modelo que está sendo utilizado, o que permite identificar compostos tendenciosamente nas amostras. De acordo com o objetivo central do trabalho a ser realizado, diferentes ferramentas podem ser usadas para discriminação, classificação ou regressão dos dados obtidos, podemos citar o *Partial Least Squares* (PLS), *Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis* (OPLS-DA), *k-nearest neighbors* (K-NN) e o *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) para esses tipos de análises.

5. APLICAÇÕES

As análises de metabolômicas vem sendo utilizadas em diferentes áreas do conhecimento, como esportes, ambiental, toxicologia, alimentos e nutrição (CANUTO et al., 2018), além dos estudos envolvendo genética e melhoramento de plantas. Em plantas, essas análises encontram uma série de obstáculos devido, dentre outros fatores, a diversidade estrutural das substâncias provenientes do

metabolismo secundário desses organismos (PILON et al., 2020). Alguns dos desafios encontrados em estudos metabolômicos de plantas são: i) Dificuldade de padronização experimental devido a dinâmica metabólica que se encontra em intensa transformação. ii) Diversidade química dos metabólitos primários e, principalmente, dos metabólitos secundários. iii) Variação do gradiente de concentração dos metabólitos que dificulta o planejamento experimental e a análise dos dados. iv) Efeitos cíclicos, ambientais e ontogênicos que são responsáveis pela flutuação metabólica a traz um desafio maior no reconhecimento de padrões (PILON et al., 2020).

As pesquisas aplicadas a plantas são geralmente focadas em cultivares de interesse agrícola, predominantemente ligadas a indústria alimentícia, mas cultivares também possuem papel importante em outras áreas da indústria, por exemplo à produção de fibras para a indústria têxtil, produção de biomassa para uso na geração de energia ou síntese de biocombustíveis, madeira para a construção civil, etc. Além disso, as plantas constituem fonte de pesquisa de longa data para químicos industriais em busca de novos compostos bioativos que podem formar a base para a produção em massa de novas drogas sintéticas para a indústria farmacêutica, ou biocidas, como fungicidas e inseticidas para uso em agricultura (HALL, 2018). Em todas essas áreas a metabolômica vem sendo utilizada para a identificação de biomarcadores e compostos capazes de auxiliar a indústria. Aqui também podem ser incluídos aspectos como rastreamento, em que a metabolômica está sendo aplicada para ajudar a identificar biomarcadores para provar a origem/autenticidade, bem como recursos relacionados à pureza e contaminação do produto (HALL, 2006; STEWART et al., 2011).

A maioria das principais culturas do mundo, como a soja (FENG et al., 2020), tomate (ABREU; FERNÁNDEZ, 2020), trigo (RUBERT et al., 2017), milho (SIVARAM et al., 2019), feijão (CHEN et al., 2019) dentre outras, foram submetidas a análises metabolômicas com focos em diferentes questões biológicas. Essas análises são frequentemente direcionadas aos aspectos da qualidade do produto em estudo, porém abordagens metabolômicas também são aplicadas regularmente para resolver problemas relacionados à aptidão da cultura envolvendo resistência a doenças e sua base molecular, interações planta-patógeno, interações micorrízicas, efeitos de estresse etc. (DRAPER et al., 2018; CIANCIO et al., 2018; KHIZAR et al., 2020).

Um estudo utilizando CG-EM caracterizou a composição de ceras cuticulares de trigo (*Triticum aestivum* L.). As ceras da superfície da folha e do caule do trigo estão associadas a características importantes, incluindo resistência a estresses bióticos e abióticos. Foram analisadas quatro cultivares com o objetivo de avaliar se a composição da cera estaria relacionada com diferenças entre os tecidos e entre os genótipos das cultivares. Um total de 263 compostos putativos foram detectados e incluiu 58 compostos de cera que puderam ser classificados (por exemplo, alcanos e ácidos graxos). Muitos dos metabólitos de cera detectados possuem associações conhecidas com importantes funções biológicas. Os dados mostraram que existe variação entre os tecidos e cultivares. As superfícies das folhas foram caracterizadas por altos níveis de álcoois e as superfícies do caule apresentaram maior teor de β -dicetonas. Enquanto a maioria dos compostos detectados foram distribuídos igualmente entre as cultivares, dois álcoois de cera na cultivar Conan foram mais elevados em conteúdo do que nas outras cultivares (LAVERGNE et al., 2018).

Em um trabalho de identificação de perfil metabólico, PONTES et al., (2016) utilizaram uma abordagem combinada de espectroscopia de RMN e quimiometria na busca por biomarcadores metabólicos de folhas de *Citrus sinensis* em diferentes estágios da doença Huanglongbing (HLB), considerada uma das ameaças mais crítica que afeta as plantas cítricas. Utilizando PCA (Análises de Componentes Principais) e PLS-DA (Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais) os autores chegaram a um grupo de metabólitos com potencial para serem utilizados como biomarcadores no diagnóstico precoce da doença.

Em outro estudo, pesquisadores utilizaram técnicas metabolômicas para a identificação de cultivares da espécie *Coffea arabica*. Foi possível identificar 20 metabólitos, utilizando espectrometria de massa com injeção direta seguida de análises multivariadas PCA e PLS-DA, capazes de diferenciar as cultivares Sachimor e Catuaí (GARRETT et al., 2013). Além disso, as análises multivariadas revelaram correlações entre os metabólitos do café com as cultivares de arábica e sua região de cultivo. Devido ao mercado cafeeiro cada vez mais exigente, a associação desses dados com o perfil de expressão gênica pode ser muito útil para entender melhor o metabolismo do café, selecionar cultivares com características de bebida desejáveis e otimizar a rastreabilidade dos grãos de café.

A condição ideal para maximizar o rendimento de uma cultura é o ajuste de todos os eventos metabólicos das células vegetais com as condições ambientais. No entanto, conhecer e compreender o metabolismo das plantas não é apenas crítico para maximizar o seu rendimento, mas também para atender aos aspectos da nutrição humana que têm sido considerado nos programas de melhoramento genético (ALSEEKH et al., 2018). Por exemplo, ZHU et al. (2018) combinando análises de metabolômica e outras ferramentas “ômicas”, identificaram alelos de genes associados à redução de esteroides glicoalcalóides anti-nutricionais durante o processo de domesticação e melhoramento do tomate.

A diversidade de espécies de plantas investigadas e as questões biológicas abordadas demonstram claramente a aplicabilidade da tecnologia e o seu valor agregado quando utilizadas de forma complementar a outras abordagens já melhores estabelecidas dentro das plataformas “ômicas”. No entanto, uma das limitações nas pesquisas envolvendo metabolômica é que, por ser uma área multidisciplinar, é essencial que os pesquisadores possuam amplo conhecimento de uma variedade de disciplinas científicas. Isso envolve uma boa compreensão das tecnologias de laboratório, da biologia, da bioquímica, da química, das estatísticas por trás de todo o procedimento de análise de dados, além de um desenho experimental adequado, dentre outras áreas. Estabelecer tal equipe multidisciplinar por si já é um grande desafio (HALL, 2018).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso da metabolômica na área de biologia vegetal tem permitido uma melhor caracterização do metabolismo de plantas e aplicação direta na otimização de produtividade e melhoramento genético, melhoria de qualidade dos produtos vegetais e soluções para problemas causados por estresses bióticos e abióticos. A integração das diferentes abordagens de “ômicas” permitirá uma caracterização mais ampla do sistema biológico. Porém, esta integração é um desafio devido a variabilidade do formato dos dados, falta de padronização das características experimentais e relação entre concentração de molécula e atividade biológica não definida. O desenvolvimento de ferramentas de bioinformática e biologia de sistemas, especificamente associadas a modelos metabólitos baseados em genomas,

tem apresentado soluções estes problemas de integração de dados, resultando em modelagens metabólicas mais realistas e otimizadas que estão se popularizando entre os grupos de pesquisa.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, Ana Cristina; FERNÁNDEZ, Ignacio. NMR Metabolomics Applied on the Discrimination of Variables Influencing Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Molecules*, [s. l.], v. 25, n. 16, p. 3738–3761, 2020.

ALSEEKH, Saleh; BERMUDEZ, Luisa; DE HARO, Luis Alejandro; FERNIE, Alisdair R.; CARRARI, Fernando. Crop metabolomics: from diagnostics to assisted breeding. *Metabolomics*, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 148–161, 2018.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, Beatriz; PRIEGO-CAPOTE, Feliciano; DE CASTRO, Maria Dolores Luque. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 111–119, 2010.

BUSTILLOS, Oscar Vega. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem HPLC-MS/MS. [s.d.]. Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-liquida-acoplada-a-espectrometria-de-massas-em-tandem-hplc-ms-ms/>. Acesso em: 4 out. 2020.

CALLISTER, Stephen J.; BARRY, Richard C.; ADKINS, Joshua N.; JOHNSON, Ethan T.; QIAN, Wei-jun; WEBB-ROBERTSON, Bobbie-Jo M.; SMITH, Richard D.; LIPTON, Mary S. Normalization Approaches for Removing Systematic Biases Associated with Mass Spectrometry and Label-Free Proteomics. *Journal of Proteome Research*, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 277–286, 2006.

CANUTO, Gisele A. B.; COSTA, José Luiz Da; CRUS, Pedro L. .. Da; SOUZA, Ana Rosa L. De; FACCIO, Andréa T.; KLASSEN, Aline; RODRIGUES, Karina T.; TAVARES, Marina F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Química Nova*, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CHEN, Lin; EN WU, Ji '.; LI, Zhanming; LIU, Qin; ZHAO, Xue; YANG, Hongshun. Metabolomic analysis of energy regulated germination and sprouting of organic mung bean (*Vigna radiata*) using NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 286, p. 87–97, 2019.

CHOI, Young Hae; VERPOORTE, Robert. Metabolomics: What You See is What You Extract. *Phytochemical Analysis*, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 289–290, 2014.

CRAIG, Andrew; CLOAREC, Olivier; HOLMES, Elaine; NICHOLSON, Jeremy K.; LINDON, John C. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Analytical Chemistry*, [s. l.], v. 78, n. 7, p. 2262–2267, 2006.

DE MEYER, Tim; SINNAEVE, Davy; VAN GASSE, Bjorn; RIETZSCHEL, Ernst R.; DE BUYZERE, Marc L.; LANGLOIS, Michel R.; BEKAERT, Sofie; MARTINS, José C.; VAN CRIEKINGE, Wim. Evaluation of standard and advanced preprocessing methods for the univariate analysis of blood serum ¹H-NMR spectra. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, [s. l.], v. 398, n. 4, p. 1781–1790, 2010.

DIETERLE, Frank; ROSS, Alfred; SCHLOTTERBECK, Götz; SENN, Hans. Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in ¹H NMR Metabonomics. *Analytical Chemistry*, [s. l.], v. 78, n. 13, p. 4281–4290, 2006.

DONG, Jiyang; CHENG, Kian Kai; XU, Jingjing; CHEN, Zhong; GRIFFIN, Julian L. Group aggregating normalization method for the preprocessing of NMR-based metabolomic data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, [s. l.], v. 108, n. 2, p. 123–132, 2011.

DRAPER, John; RASMUSSEN, Susanne; ZUBAIR, Hassan. Metabolite Analysis and Metabolomics in the Study of Biotrophic Interactions between Plants and Microbes. In: ROBERTS, J. A. (Eds.). *Annual Plant Reviews online*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018. p. 25–59.

DUNN, Warwick B. et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 1060–1083, 2011.

EBBELS, Timothy M.; LINDON, John C.; COEN, Muireann. Processing and Modeling of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Metabolic Profile. In: METZ, T. (Eds.). *Metabolic Profiling. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. [s.l.] : Humana Press, 2011. v. 708p. 365–388.

FENG, Zhe; DING, Chengqiao; LI, Weihao; WANG, Dachen; CUI, Di. Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 310, p. 125914–125923, 2020.

FERNIE, Alisdair R. The future of metabolic phytochemistry: Larger numbers of metabolites, higher resolution, greater understanding. *Phytochemistry*, [s. l.], v. 68, n. 22–24, p. 2861–2880, 2007.

FIEHN, Oliver. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 155–168, 2001.

FIEHN, Oliver. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, [s. l.], v. 48, n. 1–2, p. 155–171, 2002.

FIEHN, Oliver. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 30.4.1-30.4-32, 2016.

FRENCH, Katherine E.; HARVEY, Joe; MCCULLAGH, James S. O. Targeted and Untargeted Metabolic Profiling of Wild Grassland Plants identifies Antibiotic and Anthelmintic Compounds Targeting Pathogen Physiology, Metabolism and Reproduction. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

GAN, Feng; RUAN, Guihua; MO, Jinyuan. Baseline correction by improved iterative polynomial fitting with automatic threshold. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, [s. l.], v. 82, n. 1–2, p. 59–65, 2006.

GARRETT, Rafael; SCHMIDT, Eduardo M.; PEREIRA, Luiz Filipe P.; KITZBERGER, Cintia S. G.; SCHOLZ, Maria Brígida S.; EBERLIN, Marcos N.; REZENDE, Claudia M. Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. *LWT - Food Science and Technology*, [s.l.], v. 50, n. 2, p. 496–502, 2013.

HALL, Robert D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, [s.l.] , v. 169, n. 3, p. 453–468, 2006.

HALL, Robert D. Plant metabolomics in a nutshell: potential and future challenges. In: ROBERTS, J. A. (Eds.). *Annual Plant Reviews online*. [s.l.] : John Wiley & Sons, Ltd, 2018. p. 1–24.

HARRIGAN, George G.; MARTINO-CATT, Susan; GLENN, Kevin C. Metabolomics , metabolic diversity and genetic variation in crops. *Metabolomics*, [s.l.], v. 3, p. 259–272, 2007.

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. Princípios de análise instrumental. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HUMMEL, Jan; STREHMEL, Nadine; SELBIG, Joachim; WALTHER, Dirk; KOPKA, Joachim. Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. *Metabolomics*, [s.l.] , v. 6, n. 2, p. 322–333, 2010.

KAISER, K. A.; MERRYWELL, C. E.; FANG, F.; LARIVE, C. K. Metabolic Profiling. In: HOLZGRABE, Ulrike; WAWER, Iwona; DIEHL, Bernd (Eds.). *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. 1. ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2008. p. 233–267.

KHIZAR, Maria et al. Resistance associated metabolite profiling of *Aspergillus* leaf spot in cotton through non-targeted metabolomics. *PLoS ONE*, [s.l.] , v. 15, n. 2, p. e0228675, 2020.

KIM, Hye Kyong; CHOI, Young Hae; VERPOORTE, Robert. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, [s.l.] , v. 5, n. 3, p. 536–549, 2010.

KIM, Hye Kyong; VERPOORTE, Robert. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, [s.l.] , v. 21, n. 1, p. 4–13, 2010.

KRASTANOV, A. Metabolomics - The state of art. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, [s.l.] , v. 24, n. 1, p. 1537–1543, 2010.

LAVERGNE, Florent D.; BROECKLING, Corey D.; COCKRELL, Darren M.; HALEY, Scott D.; PEAIRS, Frank B.; JAHN, Courtney E.; HEUBERGER, Adam L. GC-MS metabolomics to evaluate the composition of plant cuticular waxes for four *Triticum aestivum* cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.] , v. 19, n. 2, p. 249, 2018.

LISEC, Jan; SCHAUER, Nicolas; KOPKA, Joachim; WILLMITZER, Lothar; FERNIE, Alisdair R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, [s.l.] , v. 1, n. 1, p. 387–396, 2006.

MARKLEY, John L.; BRÜSCHWEILER, Rafael; EDISON, Arthur S.; EGHBALNIA, Hamid R.; POWERS, Robert; RAFTERY, Daniel; WISHART, David S. The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, [s.l.] , v. 43, p. 34–40, 2017.

MHLONGO, Msizi I.; PIATER, Lizelle A.; MADALA, Ntakadzeni E.; LABUSCHAGNE, Nico; DUBERY, Ian A. The Chemistry of Plant-Microbe Interactions in the Rhizosphere and the Potential for Metabolomics to Reveal Signaling Related to Defense Priming and Induced Systemic Resistance. *Frontiers in Plant Science*, [s.l.] , v. 9, p. 112, 2018.

MOCO, Sofia; BINO, Raoul J.; VOS, Ric C. H. De; VERVOORT, Jacques. Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trends in Analytical Chemistry*, [s.l.] , v. 26, n. 9, p. 855–866, 2007.

MUSHTAQ, Mian Yahya; CHOI, Young Hae; VERPOORTE, Robert; WILSON, Erica G. Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome. *Phytochemical Analysis*, [s.l.] , v. 25, n. 4, p. 291–306, 2014.

NARDOZZA, Simona et al. Metabolic analysis of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) berries from extreme genotypes reveals hallmarks for fruit starch metabolism. *Journal of Experimental Botany*, [s.l.] , v. 64, n. 16, p. 5049–5063, 2013.

NICHOLSON, Jeremy K.; LINDON, John C.; HOLMES, Elaine. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, [s.l.] , v. 29, n. 11, p. 1181–1189, 1999.

NICHOLSON, Jeremy K.; WILSON, Ian D. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, [s.l.] , v. 21, n. 4–5, p. 449–501, 1989.

NIST Chemistry WebBook. [s.d.]. Disponível em: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C32381536&Mask=3FB7#Mass-Spec>. Acesso em: 2 out. 2020.

NYAMUNDANDA, Gift; GORMLEY, Isobel Claire; FAN, Yue; GALLAGHER, William M.; BRENNAN, Lorraine. MetSizeR: selecting the optimal sample size for metabolomic studies using an analysis based approach. *BMC Bioinformatics*, [s.l.] , v. 14, n. 1, p. 1–8, 2013.

PILON, Alan C. et al. Metabolômica de plantas: Métodos e desafios. *Química Nova*, [s.l.] , v. 43, n. 3, p. 329–354, 2020.

PONTES, João Guilherme M.; OHASHI, William Y.; BRASIL, Antonio J. M.; FILGUEIRAS, Paulo R.; ESPÍNDOLA, Ana Paula D. M.; SILVA, Jaqueline S.; POPPI, Ronei J.; COLETTA-FILHO, Helvécio D.; TASIC, Ljubica. Metabolomics by NMR Spectroscopy in Plant Disease diagnostic: Huanglongbing as a Case Study. *ChemistrySelect*, [s.l.] , v. 1, n. 6, p. 1176–1178, 2016.

ROESSNER, Ute; BOWNE, Jairus. What is metabolomics all about? *BioTechniques*, [s.l.] , v. 46, n. 5, p. 363–365, 2009.

RUBERT, Josep; RIGHETTI, Laura; STRANSKA-ZACHARIASOVA, Milena; DZUMAN, Zbynek; CHRPOVA, Jana; DALL'ASTA, Chiara; HAJLSLOVA, Jana. Untargeted metabolomics based on ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry merged with chemometrics: A new predictable tool for an early detection of mycotoxins. *Food Chemistry*, [s.l.] , v. 224, p. 423–431, 2017.

SAFER, Stefan; CICEK, Serhat S.; PIERI, Valerio; SCHWAIGER, Stefan; SCHNEIDER, Peter; WISSEMANN, Volker; STUPPNER, Hermann. Metabolic fingerprinting of *Leontopodium* species (Asteraceae) by means of ¹H NMR and HPLC-ESI-MS. *Phytochemistry*, [s.l.] , v. 72, n. 11–12, p. 1379–1389, 2011.

SIMÓ, Carolina; IBÁÑEZ, Clara; VALDÉS, Alberto; CIFUENTES, Alejandro; GARCÍA-CAÑAS, Virginia. Metabolomics of Genetically Modified Crops. *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.] , v. 15, p. 18941–18966, 2014.

SIVARAM, Anithadevi Keday; SUBASHCHANDRABOSE, Suresh Ramraj; LOGESHWARAN, Panneerselvan; LOCKINGTON, Robin; NAIDU, Ravi; MEGHARAJ, Mallavarapu. Metabolomics reveals defensive mechanisms adapted by maize on exposure to high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, [s.l.] , v. 214, p. 771–780, 2019.

SMITH, Colin A.; WANT, Elizabeth J.; O'MAILLE, Grace; ABAGYAN, Ruben; SIUZDAK, Gary. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry*, [s.l.] , v. 78, n. 3, p. 779–787, 2006.

SPRAUL, M. et al. Automatic reduction of NMR spectroscopic data for statistical and pattern recognition classification of samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, [s.l.] , v. 12, n. 10, p. 1215–1225, 1994.

STEWART, Derek; SHEPHERD, Louise V. T.; HALL, Robert D.; FRASER, Paul D. Crops and tasty, nutritious food-how can metabolomics help? In: ROBERTS, J. A. (Eds.). *Annual Plant Reviews online*. [s.l.] : Wiley Online Library, 2018. p. 181–217.

SYSI-AHO, Marko; KATAJAMAA, Mikko; YETUKURI, Laxman; OREŠIČ, Matej. Normalization method for metabolomics data using optimal selection of multiple internal standards. *BMC Bioinformatics*, [s.l.] , v. 8, n. 1, p. 93–110, 2007.

SZOPA, Jan; WILCZYŃSKI, Grzegorz; FIEHN, Oliver; WENCZEL, Andreas; WILLMITZER, Lothar. Identification and quantification of catecholamines in potato plants (*Solanum tuberosum*) by GC-MS. *Phytochemistry*, [s.l.] , v. 58, n. 2, p. 315–320, 2001.

TSAI, Tsung-Heng; WANG, Minkun; RESSOM, Habtom W. Preprocessing and Analysis of LC-MS-Based Proteomic Data. In: JUNG, Klaus (Eds.). *Methods in Molecular Biology*. Methods in Molecular Biology New York, EUA: Springer New York, 2016. v. 1362p. 63–76.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; MUSTAFA, N. R.; KIM, H. K. Metabolomics: back to basics. *Phytochemistry Reviews*, [s.l.] , v. 7, n. 3, p. 525–537, 2008.

VORST, Oscar; DE VOS, C. H. R.; LOMMEN, A.; STAPS, R. V.; VISSER, R. G. F.; BINO, R. J.; HALL, R. D. A non-directed approach to the differential analysis of multiple LC-MS-derived metabolic profiles. *Metabolomics*, [s.l.] , v. 1, n. 2, p. 169–180, 2005.

WANG, Wangxia; VINOCUR, Basia; ALTMAN, Arie. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, [s.l.] , v. 218, n. 1, p. 1–14, 2003.

WANG, Xijun et al. Urine metabolomics analysis for biomarker discovery and detection of Jaundice syndrome in patients with liver disease. *Molecular & Cellular Proteomics Cellular Proteomics*, [s.l.] , v. 11, n. 8, p. 370–380, 2012.

XI, Yuanxin; ROCKE, David M. Baseline correction for NMR spectroscopic metabolomics data analysis. *BMC Bioinformatics*, [s.l.] , v. 9, p. 1–10, 2008.

ZHANG, Aihua; SUN, Hui; WANG, Ping; HAN, Ying; WANG, Xijun. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, [s.l.] , v. 137, n. 2, p. 293–300, 2012.

ZHOU, Bin; XIAO, Jun Feng; TULI, Leepika; RESSOM, Habtom W. LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*, [s.l.] , v. 8, n. 2, p. 470–481, 2012.

ZHU, Guangtao et al. Rewiring of the Fruit Metabolome in Tomato Breeding. *Cell*, [s.l.] , v. 172, p. 249–261, 2018.

ZHU, Jian Kang. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, [s.l.] , v. 167, n. 2, p. 313–324, 2016.

Capítulo 03

A NUTRIÇÃO MINERAL COMO FERRAMENTA PARA MELHORAR AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS GRÃOS DO CAFÉ BEM COMO A QUALIDADE DE BEBIDA

Lucimara Cruz de Souza

Fabiano Costa Santiliano

Taís Cristina Bastos Soares

1. INTRODUÇÃO

O café é uma das principais commodities mundiais tendo participação expressiva na receita cambial brasileira desde o período imperial, sendo, atualmente, um dos mais importantes produtos agrícolas de exportação. O Brasil ocupa posição de destaque no cenário do agronegócio cafeeiro, sendo o maior produtor e exportador mundial, além de possuir o segundo maior mercado consumidor. Tal mercado apresenta consideráveis oscilações provocadas por interferências climáticas, produtividade, demanda internacional, preços e qualidade final do produto.

As atividades relacionadas à produção e à comercialização do café envolvem direta ou indiretamente mais de 100 milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento (CIC, 2010). Estimativas indicam a produção de cerca de 61 milhões de sacas beneficiadas para o ano de 2020 no Brasil (47 milhões de sacas de café arábica e 14 milhões de sacas de conilon), numa área total de aproximadamente 2.162 mil hectares (CONAB, 2020). O Estado do Espírito Santo se destaca como o maior produtor de conilon nacional, produzindo cerca de 64 % dos grãos, com mais de 40 mil propriedades rurais envolvidas no cultivo, prioritariamente em regime familiar.

A espécie *Coffea arabica* L. compreende em torno de 60% do café produzido no mundo e gera os grãos mais apreciados para o consumo na forma tradicional de bebida. A espécie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner tem sido utilizada

preferencialmente na constituição de blends com café arábica e na produção de cafés solúveis e cafés expressos, agregando corpo e densidade à bebida. Nota-se também uma maior utilização de café em distintas formas, além da bebida tradicional, como na formulação de cervejas, produtos culinários, alta gastronomia, sendo inclusive reconhecidas suas propriedades nutricionais, cosméticas e farmacêuticas (LAPOINTE, 2006; LOOPSTRA et al., 2011).

O parâmetro qualidade associado ao café pode ser definido como um conjunto de características físicas, químicas, sensoriais e de segurança que atendam aos mais diversificados gostos do mercado consumidor, sendo decorrente da combinação de diversos fatores como a combinação de variedades botânicas, das condições topográficas, do clima e dos cuidados com o cultivo, colheita, secagem, armazenamento, preparo para exportação e transporte dos grãos (SIMÕES et al., 2008).

A qualidade do café influencia fortemente na determinação do preço e comercialização do produto. O sabor, aroma e adstringência observada na bebida final das espécies cultivadas de *Coffea* (*C. arabica* e *C. canephora*) são resultados dos diferentes constituintes físico-químicos presentes nos grãos e da influência que esses recebem dos diferentes fatores ambientais e genéticos (ALESSANDRINI et al., 2008; FONSECA et al., 2019). Em relação aos fatores ambientais, as condições de manejo, as técnicas de adubação e o estado nutricional do cafeeiro podem influenciar na produção e na composição do grão e, em consequência, na qualidade da bebida (AMORIM, 1968).

Nas regiões produtoras de café no Brasil, a maior parte dos solos apresenta características químicas indesejadas para ganhos de produtividade, como elevada acidez, altos teores de alumínio trocável, deficiência de cálcio e magnésio. A utilização de técnicas de manejo para correção e fertilização do solo são importantes para ganhos na produtividade. Porém, em termos de eficiência, a recuperação de nutrientes aplicados como fertilizantes é baixa (BALIGAR & FAGERIA, 1998).

A eficiência nutricional pode ser influenciada por relações inter e intraespecíficas e está relacionada com a capacidade de um genótipo absorver, translocar e utilizar o nutriente disponível para seu desenvolvimento e produção (BALIGAR & FAGERIA, 1998). A capacidade de absorver e translocar os nutrientes é controlada geneticamente (GABELMAN & GERLOFF, 1983), o que

possibilita o melhoramento genético, e a seleção de materiais com maior eficiência no uso de nutrientes e capacidade de adaptação em solos de baixa fertilidade natural (CALDEIRA et al., 2002).

Dessa forma, esse capítulo busca abordar aspectos relacionados à nutrição do cafeeiro e a qualidade final do produto, visto que uma melhor compreensão da dinâmica nutricional na espécie se faz necessária frente ao cenário da alta exigência nutricional por genótipos cada vez mais produtivos e expansão das lavouras para solos de baixa fertilidade (GUIMARÃES et al., 2011).

2. NUTRIENTES MINERAIS E CRITÉRIOS DE ESSENCIALIDADE

A sobrevivência das espécies vegetais depende da retirada de CO₂ presente na atmosfera, que é a fonte de carbono necessária à fotossíntese, além de água e nutrientes minerais presentes no solo (MARENCO & LOPES, 2011). Embora alguns nutrientes possam ser retirados diretamente da atmosfera, o solo atua como reservatório de minerais necessários às plantas (FAQUIN, 2005).

Nutrientes minerais são essenciais ao crescimento e ao desenvolvimento de todos os vegetais. As plantas podem absorver do solo, elementos que são essenciais, benéficos e até mesmo aqueles que lhes são tóxicos, sem grandes restrições (ARNON & STOUT, 1939).

Dessa forma, é necessário entender quando um mineral deve ser considerado essencial. Arnon e Stout (1939) descreveram três princípios básicos que um mineral deve atender para ser tido como essencial:

1. Uma dada planta deve ser incapaz de completar seu ciclo de vida na ausência do elemento;
2. A função do elemento não pode ser substituída por nenhum outro mineral e;
3. O elemento deve estar diretamente envolvido no metabolismo da planta.

Além do Carbono (C), Oxigênio (O) e Hidrogênio (H) (orgânicos), treze minerais são considerados essenciais para o desenvolvimento das plantas (Tabela 1), sendo que, de acordo com a proporção com que aparecem na matéria seca, estão divididos em dois grupos, os macronutrientes (Nitrogênio, Potássio, Cálcio, Magnésio, Fósforo e Enxofre), que são exigidos em maiores

quantidades, e os micronutrientes (Cloro, Ferro, Manganês, Boro, Zinco, Cobre, Molibdênio), absorvidos em menores quantidades (FAQUIN, 1994).

Tabela 1- Elementos químicos considerados essenciais e sua simbologia química

Elementos	Símbolo	Elementos	Símbolo
Macronutrientes		Micronutrientes	
Nitrogênio	N	Cloro	Cl
Potássio	K	Ferro	Fe
Cálcio	Ca	Manganês	Mn
Magnésio	Mg	Boro	B
Fósforo	P	Zinco	Zn
Enxofre	S	Cobre	Cu
		Molibdênio	Mo

O solo é o principal meio para o fornecimento de nutrientes à planta, porém, sua análise revela apenas os elementos nele disponíveis, sendo necessária a análise do próprio vegetal para entender seu estado nutricional (MARTINEZ et al., 2003).

3. ACÚMULO E EXPORTAÇÃO DE NUTRIENTES NA CULTURA DO CAFEIEIRO

O acúmulo e exportação de nutrientes pelo cafeeiro não é uniforme durante o ciclo vegetativo e reprodutivo, variando de acordo com a espécie, condições edafoclimáticas, idade, fases fenológicas, órgãos e tecidos avaliados (BRAGANÇA et al., 2017).

As fases fenológicas do cafeeiro são bem definidas, sendo que a cultura completa o ciclo fenológico em dois anos. Contudo, em função do clima e da região, tais fases podem ser adiantadas ou atrasadas (CAMARGO, 1998). No primeiro ano, ocorre a formação da parte vegetativa da planta com a formação das gemas axilares, que podem ser vegetativas ou reprodutivas, dependendo do estímulo que recebem (RENA & MAESTRI, 1985).

Posteriormente, inicia-se o segundo ano fenológico com a floração. Após a fecundação das flores ocorre o desenvolvimento dos frutos, formação dos

chumbinhos, expansão rápida dos grãos, granação e maturação (CAMARGO & CAMARGO, 2001). Durante esses diferentes estádios de desenvolvimento ocorrem variações no acúmulo e exportação de nutrientes. Durante as fases de floração e frutificação, as flores e frutos constituem os principais drenos por fotoassimilados, respectivamente (RENA & MAESTRI, 1985; PARTELLI et al., 2010).

Estima-se que a partir do quarto mês após a floração ocorra uma intensificação do consumo de nutrientes e acúmulo de matéria seca. Durante a florada e a fase de chumbinho, a quantidade de nutrientes exigida é menor, aumentando quando os frutos passam para os estágios de expansão rápida, granação e maturação (MORAES & CATANI, 1964; MATIELLO et al., 2005). Durante a fase reprodutiva, os frutos serão os drenos preferenciais na partição de nutrientes para a sua expansão e granação. Quanto maior for a produção de frutos, maior será a exigência nutricional (RENA et al., 1986). Entretanto, quando a frutificação é baixa, o crescimento dos ramos plagiotrópicos e a formação de folhas e ramos novos passam a ser fortes drenos de nutrientes (MALAVOLTA & LIMA FILHO, 2002).

Em trabalhos realizados com o cafeeiro Conilon e Arábica, observa-se que o acúmulo de nutrientes tende a apresentar um comportamento sigmoidal, as taxas de acúmulo são menos expressivas nos estágios iniciais, seguido por uma rápida expansão e taxas mais altas e, posteriormente, taxas menos expressivas são observadas (LAVIOLA et al., 2008; PARTELLI et al., 2014; DUBBERSTEIN et al., 2019).

No início da formação de frutos, a concentração de macronutrientes é alta e tende a diminuir em estágios posteriores, sendo que, o maior acúmulo é observado nos estágios de expansão, formação e maturação do fruto (DUBBERSTEIN et al., 2016). Em trabalhos realizados por Bragança et al. (2007, 2010) a ordem de acúmulo de macronutrientes em café conilon foi: $N > Ca > K > Mg > S > P$. As taxas de acúmulo foram máximas até 36° e 48° mês, exceto o Ca e Mg que foi crescente até o 72° mês. As folhas apresentaram maior acúmulo de N, K, Ca, Mg, S, e o tronco e ramos ortotrópicos apresentam o maior conteúdo de P. Raízes e frutos tiveram maior conteúdo de Ca. O cafeeiro apresenta uma grande exigência de N para o desenvolvimento das gemas floríferas e de K para o enchimento dos frutos e metabolismo de carboidratos.

Em relação à partição dos micronutrientes, o Fe é o mais acumulado pelo cafeeiro que, por sua vez, atua na síntese de clorofila e transporte de elétrons. O Cu, Mn, Zn e B são importantes para o crescimento reprodutivo, determinando a produtividade e qualidade da planta (TAIZ & ZEIGER, 2010). Estudos indicaram que em frutos de café conilon a ordem de acúmulo de micronutrientes foi Fe > B > Cu > Mn > Zn e em arábica Fe > Mn > B > Cu > Zn (LAVIOLA et al., 2007; COVRE et al., 2016).

As tabelas 2 e 3 apresentam um resumo das principais funções de macro e micronutrientes no cafeeiro, respectivamente.

Tabela 2- Descrição das principais funções de macronutrientes em cafeeiro.

Nutriente	Principais Funções	Referências
Nitrogênio	Nutriente mais exigido para o crescimento vegetativo, segundo mais exportado pelos grãos. Ocorre em compostos como aminoácidos, purinas e alcaloides, enzimas, ácidos nucleicos e clorofila	Catani & Moraes, 1958 Buchanan et al., 2000 Guimarães et al., 2011
Potássio	Encontrado em maior proporção em grãos. Importante na síntese de proteínas e controle osmótico, ativador enzimático na respiração e fotossíntese, síntese e transporte de carboidratos e formação de amido	Moraes & Catani, 1964 Buchanan et al., 2000 Rena & Carvalho, 2003
Cálcio	Acumula-se em maior proporção nas folhas. Essencial para a resistência das paredes celulares e dos tecidos, para a divisão celular e regulação da permeabilidade de membranas	Catani & Moraes, 1958 Bragança et al., 2008 Marschner, 2012
Magnésio	Ocupa o centro do núcleo tetrapirrólico da clorofila, fundamental para a fotossíntese, integridade dos ribossomos e modulador da Rubisco	Guimarães et al., 2011 Buchanan et al., 2000 Marschner, 2012
Fósforo	Componente dos ácidos nucleicos, fosfolipídios, coenzimas. Importante para transferência de energia sendo constituinte da molécula de ATP, metabolismo de açúcares e formação dos frutos	Buchanan et al., 2000 Guimarães et al., 2011 Marschner, 2012
Enxofre	Constituinte dos aminoácidos essenciais para a biossíntese de proteínas. Componente de coenzimas importantes para o ciclo de Krebs e transferência de elétrons.	Buchanan et al., 2000 Guimarães et al., 2011 Marschner, 2012

Tabela 3- Descrição das principais funções de micronutrientes em cafeeiro.

Nutriente	Principais Funções	Referências
Cloro	Participa do desdobramento da molécula de água na fotossíntese e atua no transporte de cátions dentro da planta.	Marschner, 1986 Faquin, 1994
Ferro	Ocorre em maior proporção nos cloroplastos, desempenhando funções na fotossíntese e biossíntese de proteínas e clorofila	Buchanan et al., 2000 Marschner, 2012
Manganês	Essencial na síntese de clorofila, evolução do O ₂ durante a fotossíntese e estrutura lamelar dos tilacóides dos cloroplastos. Cofator de várias enzimas, como peroxidases e enzimas do metabolismo do C e do N.	Buchanan et al., 2000 Marschner, 2012
Boro	Importante para o crescimento celular, metabolismo de fenóis, ácidos nucleicos, carboidratos e confere estabilidade para a parede celular	Romheld & Marschner, 1991 Buchanan et al., 2000
Zinco	Cofator estrutural e funcional, regulador de várias enzimas, entre elas a RNA polimerase, atua na síntese de aminoácidos, carboidratos e de proteínas.	Buchanan et al., 2000 Marschner, 2012
Cobre	Efeito como micronutriente, fungistático e tonificante. Importante no metabolismo de carboidratos, lignificação da parede celular e participa em reações redox.	Pasin et al., 2002 Marschner, 2012
Molibdênio	Ocorre em menor concentração. Importante para o transporte de elétrons além de atuar como cofator nas enzimas nitrogenase, redutase do nitrato e oxidase do sulfeto	Catani et al., 1967 Sfredo & Oliveira, 2010

4. NUTRIÇÃO MINERAL DO CAFEIEIRO E QUALIDADE DA BEBIDA

O café tem suas características diretamente influenciadas por aspectos ambientais e genéticos. Em termos de qualidade da bebida, os constituintes físico-químicos, como compostos voláteis, proteínas, lipídeos, enzimas, açúcares, trigonelina, cafeína e ácidos clorogênicos, são os responsáveis pelo sabor, aroma e adstringência da bebida (PEREIRA & MALTA, 2004; FONSECA et al., 2019).

As espécies *Coffea canephora* e *Coffea arabica*, assim como outras espécies de *Coffea* apresentam composições físico-químicas diversificadas (MARTINEZ et al., 2014). *Coffea arabica* apresenta maiores teores de trigonelina, açúcares, lipídeos e menores teores de cafeína e ácidos clorogênicos, resultando em uma bebida mais suave, delicada e mais adocicada, com aroma e sabor mais pronunciados. Por outro lado, o café conilon (*C. canephora*) possui bebida mais neutra, amargor mais pronunciado, com maiores teores da cafeína e ácidos clorogênicos (SOUZA et al., 2013; MARTINEZ et al., 2014; FERRÃO et al., 2019).

Os constituintes físico-químicos podem ser influenciados pelo manejo, colheita, pós-colheita, condições de clima, temperatura, bem como os nutrientes minerais presentes no solo. Os nutrientes minerais podem aumentar ou suprimir os teores dos constituintes físico-químicos fundamentais para uma qualidade de bebida diferenciada. De forma geral, os macro e micronutrientes podem interferir na qualidade final do café, por seu papel no metabolismo e acúmulo de compostos físico-químicos desejáveis e, por produzir compostos de defesa contra a microbiota indesejada nos grãos (MARTINEZ et al., 2014; CLEMENTE et al., 2015).

Em relação aos macronutrientes, N e o K estão entre os mais exigidos pelo cafeeiro. O N é mais exigido para o crescimento vegetativo e ocorre em compostos como aminoácidos e alcaloides. O K é encontrado em maior proporção nos grãos, tendo como uma das principais funções a síntese de carboidratos nas folhas e transporte para os frutos e outros órgãos (BUCHANAN et al., 2000).

A cafeína, alcaloide pertencente ao grupo das xantinas, é responsável pelo sabor amargo e é importante para o *flavor* do café. Sua molécula contém quatro átomos de N, de modo que uma redução do teor de cafeína nos grãos é esperada para plantas deficientes desse nutriente (ASHIHARA, 2006). Clemente et al., (2013) constataram maiores teores de cafeína em plantas de café arábica cultivadas em maiores doses de N. Os autores também observaram que o crescimento reprodutivo e o metabolismo de açúcares foram influenciados por K. Cafés superiores apresentam maiores teores de açúcares totais, já que esses contribuem para o sabor e aroma da bebida (CHAGAS et al., 1996).

A influência da fertilização controlada de NPK nos compostos físico-químicos em três colheitas de café arábica foi avaliada por Vinecky et al., (2017). Os autores observaram que o tratamento com K afetou positivamente os teores de ácidos

clorogênicos e, maiores quantidades de N afetaram os teores de cafeína. Não foram observados efeitos significativos para o tratamento com P. É importante salientar, que os ácidos clorogênicos apresentam capacidade antioxidante e contribuem para o sabor e o aroma que caracterizam a bebida do café (GUIMARÃES et al., 2011).

Os efeitos de doses de N e K em café arábica também foram analisados por Clemente et al. (2015) sendo observadas relações positivas entre doses ideais de N e K (6 mmol L⁻¹ de N e 3,23 mmol L⁻¹ de K) com maiores teores de cafeína, açúcares e menor acidez titulável total, condutividade elétrica e lixiviação de potássio. Porém, doses de K acima do ideal podem inibir a absorção de cálcio e magnésio.

Entre as funções do Ca na planta está a manutenção da integridade da parede celular. Caso ocorra uma competição catiônica entre Ca e K levando a uma menor absorção desse nutriente, os frutos do cafeeiro apresentarão reduzido Ca para formação da parede celular, o que o torna suscetível a ataques de microrganismos que podem reduzir a qualidade da bebida (FAQUIN, 1994). A absorção de Mg também pode ser afetada por altas doses de K, o baixo suprimento desse nutriente para o cafeeiro reduz a fotossíntese e, em consequência, ocorre uma menor síntese de fotoassimilados. Além disso, baixas concentrações de Mg inibem a ativação de enzimas importantes para a síntese de carboidratos afetando a produtividade, granação e qualidade dos grãos (MARSCHNER, 2012).

Em relação aos micronutrientes, B, Zn e Cu estão entre os mais estudados, uma vez que o cafeeiro não tem grande exigência de Mo, e os solos brasileiros onde estão estabelecidos grande parte dos cafezais, possuem teores elevados de Fe e Mn (FURLANI JUNIOR et al., 2004).

O efeito do Cu na composição química e qualidade da bebida em café arábica foi avaliado por Martinez et al. (2018), sendo constatado que o tratamento com Cu tem efeito positivo nos teores de sacarose, ácidos clorogênicos e na atividade da enzima polifenoloxidase (PPO). Porém, efeito negativo foi observado para as concentrações de glicose e acidez titulável total. Para os teores de cafeína, trigonelina, condutividade elétrica e lixiviação de potássio não foram observados efeitos significativos.

A polifenoloxidase (PPO) consiste numa enzima cúprica ligada às membranas celulares e tem sido diretamente relacionada à qualidade de bebida do café.

Grãos danificados ou com deficiência de Cu podem ter baixa atividade de PPO e, conseqüentemente, baixa qualidade. Os cafés com melhores classificações de bebida apresentam níveis maiores de atividade da PPO (CARVALHO et al., 2003).

Além de micronutriente, o cobre também atua como fungistático desnaturando proteínas do patógeno, além de participar da síntese de lignina, importante como barreira à penetração de microrganismos indesejáveis para a qualidade de bebida (PASIN et al. 2002).

Em relação ao zinco, baixos teores desse micronutriente afetam diretamente o desenvolvimento reprodutivo do cafeeiro. Poltronieri et al. (2011) e Martinez et al. (2013) observaram que o fornecimento de Zn influenciou positivamente a produtividade e o tamanho dos grãos em cafeeiros. As taxas de condutividade elétrica e lixiviação de potássio foram menores e maiores teores de ácidos clorogênicos e atividade antioxidante foram observados. A condutividade elétrica e a lixiviação de potássio são utilizadas como indicadores da integridade de membranas celulares. Cafés que apresentam bebidas de qualidade superior apresentaram menores valores de condutividade elétrica e lixiviação de potássio (NOBRE et al., 2011).

O aumento da disponibilidade de Zn em café arábica maximizou os atributos relacionados à qualidade da bebida em estudos realizados em café arábica. Foi observado maior conteúdo de cafeína, trigonelina, sacarose e maior atividade da PPO. Foram avaliadas doses de 0,2; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn e a qualidade máxima foi obtida com doses de Zn de 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Doses superiores ou inferiores a essa levaram à perda de qualidade com o aumento do conteúdo de fenóis totais e, maior condutividade elétrica e lixiviação de potássio (LACERDA et al., 2018).

Quanto ao boro, a deficiência desse micronutriente em cafeeiro reduz o crescimento do sistema radicular, afetando a absorção de água e sais minerais, com isso, as plantas tornam-se suscetíveis à seca e menos responsivas às fertilizações (CARVALHO et al., 1994). O efeito do boro na qualidade da bebida e produção de compostos bioativos foi avaliado por Clemente et al. (2018), sendo também avaliados tratamentos com Zn e Cu. Efeitos positivos foram observados para os teores de cafeína, trigonelina, sacarose e glicose, porém, uma diminuição dos teores de ácidos clorogênicos foi observada com a disponibilização de B.

Para *C. canephora* os estudos dos efeitos diretos dos nutrientes na composição físico-química são mais escassos, sendo essas relações mais descritas para *C. arabica*. Em *C. canephora*, os estudos se concentram em avaliar o acúmulo de macro e micronutrientes e correlacionando com as maiores produtividades e melhor qualidade de bebida, já que os efeitos de alguns nutrientes nos teores dos constituintes físico-químicos são conhecidos (PARTELLI et al., 2014; COVRE, 2016; DUBBERSTEIN et al., 2016; DUBBERSTEIN et al., 2019).

Ngugi et al. (2016) analisaram o efeito dos nutrientes minerais em atributos sensoriais (aroma, flavor, sabor residual, doçura, sabor e acidez) e compostos bioquímicos (cafeína e trigonelina) em *C. canephora* (Tabela 4). Os autores avaliaram amostras de solo, folhas e grãos de 67 plantas em 23 locais que não tinham histórico de aplicação de fertilizantes. O objetivo foi fornecer informações aos cafeicultores para tomadas de decisões sobre quais fertilizantes seriam necessários para ganhos na qualidade do café.

Tabela 4 - Efeitos significativos de nutrientes minerais presentes no solo, folhas e grãos nos atributos sensoriais e compostos bioquímicos em *C. canephora*.

Atributos sensoriais	Nutrientes *	R ² %
Aroma	MnS	22,1
Flavor	PbB e FeB	19,7
Sabor residual	FeB	16,5
Doçura	KL	6,7
Sabor	PbB	17,7
Acidez	ZnS	6,3
Compostos bioquímicos	Nutrientes*	
Cafeína	BB e ZnB	8,4
Trigonelina	PbS e BB	31,2

* S, L, B = solo, folha e grão; Mn = Manganês, Pb = Chumbo, Ca = Cálcio; Fe = Ferro, Zn = zinco; K = Potássio, B = Boro, Cu = Cobre. Fonte: NGUGI et al. (2016). Adaptado pelos autores.

Os resultados indicaram que os micronutrientes Mn, Cu, Fe e Zn foram fatores cruciais para os atributos sensoriais, e que Zn e Mn foram os mais

importantes para o desenvolvimento do fruto. Altas concentrações de Mn presentes no solo aumentaram a fragrância e o aroma da bebida. O sabor foi influenciado pelas quantidades de Pb e Fe nos grãos. O K presente nas folhas foi responsável pela doçura. A variabilidade no conteúdo de trigonelina foi explicada pelas altas concentrações de chumbo no solo e altas concentrações de B nos grãos e, a cafeína foi influenciada pelas concentrações de B e Zn nos grãos.

As informações supracitadas revelam a importância dos estudos referentes ao estado nutricional do cafeeiro para ganhos na qualidade final do produto. É importante entender quais nutrientes devem ser fornecidos e quais são excedentes, a fim de se estabelecer estratégias eficientes de correção e fertilização do solo, principalmente para os nutrientes que são imóveis no floema como o boro e o cálcio (FARNEZI et al., 2009).

O sucesso do manejo nutricional do cafeeiro consiste em usar corretamente as tecnologias já disponíveis para a diagnose nutricional, analisando amostras, sejam de solo ou tecido vegetal, e comparando com um padrão que apresente todos os nutrientes em concentrações e relações adequadas (BRAGANÇA et al., 2017).

Como o solo é o principal meio de fornecimento de nutrientes à planta, para se determinar a quantidade de nutrientes a ser suprida pelo solo, obrigatoriamente deve-se realizar coleta e análise do mesmo. Todavia, essa análise revelará apenas os elementos ali disponíveis, sendo fundamental a avaliação da própria planta, como um critério de avaliação complementar, para melhor entendimento do seu estado nutricional (GUARÇONI, 2013).

A análise da matéria seca de tecidos vegetais (comumente a folha) por meio de procedimentos químicos é conhecida como análise foliar. A interpretação dessa análise pode ser realizada por diferentes métodos como o Sistema Integrado de Diagnose e Recomendação (DRIS), nível crítico e/ou faixa de suficiência (FONTES, 2006). De forma geral, esses métodos de interpretação permitem analisar se os teores de macro e micronutrientes estão adequados, deficientes, tóxicos ou em excesso, possibilitando estabelecer estratégias para o uso eficiente de fertilizantes, o que se reflete em maiores ganhos de produtividade e melhoria da qualidade (MESQUITA, 2016).

Embora o fornecimento de nutrientes por fertilização tenha favorecido a obtenção de altos rendimentos, a recuperação de nutrientes aplicados com

fertilizantes é baixa (BALIGAR & FAGERIA, 1998). Dessa forma, estudos de melhoramento genético e seleção de materiais com maior eficiência no uso de nutrientes têm sido incentivados. Diferentes trabalhos indicam que é possível modular a eficiência nutricional explorando a interação entre a planta e o nível de suprimento de nutrientes, o que possibilita selecionar genótipos mais eficientes e com capacidade de adaptação em solos de baixa fertilidade (MACHADO et al., 2016; NETO et al., 2016; STARLING et al., 2018, MARTINS et al., 2019).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que meio da aplicação de fertilizantes e/ou por uma maior eficiência de absorção apresentada pelos genótipos, para se alcançar boa produtividade e maiores ganhos na qualidade dos produtos finais é necessário que os nutrientes minerais estejam disponíveis nos estágios adequados do desenvolvimento do cafeeiro.

6. REFERÊNCIAS

ALESSANDRINI, L.; ROMANI, S.; PINNAVAIA, G.; DALLA ROSA, M. Near infrared spectroscopy: An analytical tool to predict coffee roasting degree. *Analytica Chimica Acta*, v. 625, n. 1, p. 95-102, 2008.

AMORIM, H. V. Estado nutricional do cafeeiro e qualidade da bebida. *Revista de Agricultura*, v. 43, n. 2, p. 93-103, 1968.

ARNON, D. I.; STOUT, P. R. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant physiology*, v. 14, p.371-375, 1939.

ASHIHARA, H. Metabolism of alkaloids in coffee plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2006.

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K. Plant nutrient efficiency: towards the second paradigm. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1998. p.183-204.

BRAGANÇA, S. M.; MARTINEZ, H. E. P.; LEITE, H. G.; SANTOS, L. P.; LANI, J. A.; SEDIYAMA, C. S.; VENEGAS, V. H. A. Acumulação de macronutrientes pelo cafeeiro conilon. In: Simpósio de Pesquisa de Cafés do Brasil, 5., 2007, Águas de Lindóia, SP. Anais... Águas de Lindóia: SPCB, 2007.

BRAGANÇA, S. M.; PRIETO MARTINEZ, H. E.; LEITE, H. G.; SANTOS, L. P.; SEDIYAMA, C. S.; ALVAREZ V, V. H.; LANI, J. A. Accumulation of macronutrients for the Conilon Coffee Tree. *Journal of Plant Nutrition*, v. 31, p. 103-120, 2008.

BRAGANÇA, S. M.; MARTINEZ, H. E. P.; LEITE, H. G.; SANTOS, L. P.; LANI, J. A.; SEDIYAMA, C. S.; ALVAREZ V, V. H. Acumulação de matéria seca pelo cafeeiro conilon. *Revista Ceres*, v.57, p. 48-52, 2010.

BRAGANÇA, S. M.; PREZOTTI, L. C.; LANI, J. A. Nutrição do cafeeiro Conilon. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. (Ed.). *Café Conilon*. 2 ed. atual. ampli. Vitória, ES: Incaper, 2017. p. 327-345.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEN, W.; JONES, R. L. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.

CALDEIRA, M. V. W.; RONDON NETO, R. M.; SCHUMAKER, M. V. Avaliação da eficiência nutricional de três procedências australiana de acácia negra (*Acacia mearnsii* DE Wild.). *Revista Árvore*, v.26 n.5, p.615-620, 2002.

CAMARGO, A. P. As oito fases fenológicas da frutificação do cafeeiro. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 24., Poços de Caldas, 1998. Anais... Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, v.1. p.41-42, 1998.

CAMARGO, A. P.; CAMARGO, M. B. P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. *Bragantia*, v.60, p.65-68, 2001.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. D. R.; CHALFOUN, S. M.; BOTREL, N.; JUSTE JUNIOR, E. S. G. Relações entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e da qualidade de bebida do café. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 29, p. 449-454, 1994.

CARVALHO, G. R.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, L. F.; BARTHOLO, G. F. Eficiência do ethephon na uniformização e antecipação da maturação de frutos de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) e qualidade da bebida. *Ciência de Agrotecnologia*, v. 27, p. 98-106, 2003.

CATANI, R. A.; MORAES, F. R. P. A composição química do cafeeiro. Revista de agricultura, v. 33, p.45-52, 1958.

CATANI, R. A.; PELLEGRINO, D.; BITTENCOURT, V. C.; JACINTHO, A. O.; GRANER, C. A. F. A concentração e a quantidade de micronutrientes e de alumínio no cafeeiro, *Coffea arabica*, L., variedade mundo novo (B. Rodr.) Choussy, aos dez anos de idade. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, v. 24, p. 97-106, 1967.

CHAGAS, S. J. R.; CARVALHO, V. D.; COSTA, L. Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.31, p.555-561, 1996.

CIC. Centro de Inteligência do Café, 2010. Estatística. Disponível em: <<http://www.cicbr.org.br>>. Acesso em: 20 set. 2020.

CLEMENTE, J. M.; MARTINEZ, H. E. P.; ALVES, L. C.; LARA, M. C. R. Effect of N and K doses in nutritive solution on growth, production and coffee bean size. Revista Ceres, v. 60, n. 2, p. 279-285, 2013.

CLEMENTE, J. M.; MARTINEZ, H. E. P.; ALVES, L. C.; FINGER, F. L.; CECON, P. R. Effects of nitrogen and potassium on the chemical composition of coffee beans and on beverage quality. Acta Scientiarum. Agronomy, v. 37, p. 297-305, 2015.

CLEMENTE, J. M.; MARTINEZ, H. E. P.; PEDROSA, A. W.; POLTRONIERI NEVES, Y.; CECON, P. R.; JIFON, J. L. Boron, copper, and zinc affect the productivity, cup quality, and chemical compounds in coffee beans. Journal of food quality, v. 2018, 2018.

CONAB. Compêndio de Estudos Conab / Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de café. V. 6 - SAFRA 2020 - N.3 - Terceiro levantamento | setembro, p. 1-54, 2020.

COVRE, A. M.; RODRIGUES, W. P.; VIEIRA, H. D.; BRAUN, H.; RAMALHO, J.; PARTELLI, F. L. Nutrient accumulation in bean and fruit from irrigated and non-irrigated *Coffea canephora* cv. Conilon. Emirates Journal of Food and Agriculture, v.28, p.402-409, 2016.

DUBBERSTEIN, D.; PARTELLI, F. L.; DIAS, J. R. M.; ESPINDOLA, M. C. Concentration and accumulation of macronutrients in leaf of coffee berries in the Amazon, Brazil. Australian Journal of Crop Science, v. 10, p.701-710, 2016.

DUBBERSTEIN, D.; PARTELLI, F. L.; ESPINDULA, M. C.; DIAS, J. R. M. Concentration and accumulation of micronutrients in robust coffee. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 41, 2019.

FAQUIN, V. Nutrição mineral de plantas. Lavras: ESAL/FAEPE, 1994. 186p.

FARNEZI, M. M. M.; SILVA, E.B.; GUIMARÃES, P. T. C. Nutritional diagnosis of coffee trees in the Alto Jequitinhonha Region (MG): Dris standards and critical nutrient ranges. *Brazilian Journal of Soil Science*, v.33, p.969-978, 2009.

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. (Eds.). *Conilon coffee*. 3 ed. updated and expanded. Vitória, ES: Incaper, 2019. p. 29-49.

FONSECA, A. F. A.; MACHAFOFILHO, J. A.; VERDIN FILHO, A. C.; FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G. EUGÊNIO, M. H. A. Quality and Classification of Conilon Coffee. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. (Eds.). *Conilon coffee*. 3 ed. updated and expanded. Vitória, ES: Incaper, 2019. p. 685-729.

FONTES, P. C. R. Diagnóstico do estado nutricional das plantas. 2ed. Viçosa-MG: UFV, 2006, 122p.

FURLANI JUNIOR, E.; ALVES, C. D. C.; LAZARINI, E.; FERRARI, S. Aplicação de calcário e boro em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Cultura Agrônômica*, v.13, p.1-25, 2004.

GABELMAN, W.H.; GERLOFF, G.C. The search for and interpretation of genetic controls that enhance plant growth under deficiency levels of a macronutrient. *Genetic Aspects of Plant Nutrition*, v.72, p.335-350, 1983.

GUARÇONI, A. Fatores de sucesso no manejo nutricional do cafeeiro. *Informações Agrônômicas*, v.114, p. 1-12, 2013.

GUIMARÃES, P. T. G. Nutrição do cafeeiro e sua relação com a qualidade do café. *Informe Agropecuário*, v. 32, p. 39-51, 2011.

LACERDA, J. S.; MARTINEZ, H. E.; PEDROSA, A. W.; CLEMENTE, J. M.; SANTOS, R. H.; OLIVEIRA, G. L.; JIFON, J. L. Importance of Zinc for Arabica Coffee and Its Effects on the Chemical Composition of Raw Grain and Beverage Quality. *Crop Science*, v. 58, p. 1360-1370, 2018.

LAPOINTE, A., COUILLARD, C. E LEMIEUX, S. Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 17, n. 10, p. 645-658, 2006.

LAVIOLA, B. G.; MARTINEZ, H. E. P.; SALOMÃO, L. C. C.; CRUZ, C. D.; MENDONÇA, S. M.; ROSADO, L. D. S. Acúmulo de nutrientes em frutos de cafeeiro em duas altitudes de cultivo: Micronutrientes. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.31, p.1439-1449, 2007.

LAVIOLA, B. G.; MARTINEZ, H. E. P.; SALOMÃO, L. C. C.; CRUZ, C. D.; MENDONÇA, S. M.; ROSADO, L. D. S. Acúmulo de frutos e variação na concentração foliar de NPK no café cultivado em quatro altitudes. *Bioscience Journal*, 24: 19-31, 2008.

LOOMPSTRA, C. R., LIESE, A. D., HAFFNER, S. M., WAGENKNECHT, L. E. & HANLEY, A. J. Association between the intake of caffeinated and decaffeinated coffee and measures of insulin sensitivity and beta cell function. *Diabetologia*. v. 54, p. 320-328, 2011.

MACHADO, L. S.; MARTINS, L. D.; RODRIGUES, W. N.; FERREIRA, D. S.; CÔGO, A. D.; TOMAZ, M. A.; DO AMARAL, J. F. T. Efficiency and response of conilon coffee genotypes to nitrogen supply. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, p. 1892-1898, 2016.

MALAVOLTA, E.; LIMA FILHO, O. F. Nutrição mineral (e adubação) do cafeeiro-lavouras tradicionais, adensadas, irrigadas, arborizadas e orgânicas. In: *Simpósio de Pesquisas do Café do Brasil*, 1., 2002, Poços de Calda, MG. *Anais... Poços de Calda: Embrapa Café*, p. 331-353, 2002.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Viçosa: UFV, 2011. 486p.

MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. London, Academic Press Inc., 1986. 674p.

MARSCHNER, P. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3ªed. New York, Academic Press. 2012, 651p.

MARTINEZ, H. E. P.; MENEZES, J. F. S.; SOUZA, R. B. D.; VENEGAS, V. H. A.; GUIMARÃES, P. T. G. Faixas críticas de concentrações de nutrientes e avaliação do estado nutricional de cafeeiros em quatro regiões de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, p. 703-713, 2003.

MARTINEZ, H. E. P.; POLTRONIERI, Y.; FARAH, A.; PERRONE, D. Zinc supplementation, production and quality of coffee beans. *Revista Ceres*, v.60, p.293-299, 2013.

MARTINEZ, H. E. P.; CLEMENTE, J. M.; LACERDA, J. S. D.; NEVES, Y. P.; PEDROSA, A. W. Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. *Revista Ceres*, v. 61, p. 838–848, 2014.

MARTINEZ, H. E. P.; LACERDA, J. S. D.; CLEMENTE, J. M.; SILVA FILHO, J. B. D.; PEDROSA, A. W.; SANTOS, R. H. S.; CECON, P. R. Production, chemical composition, and quality of Arabic coffee subjected to copper doses. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 53, p. 443-452, 2018.

MARTINS, L. D.; FERREIRA, D. S.; RODRIGUES, W. N.; COLODETTI, T. V.; BRINATE, S. B.; CÔGO, A. D.; BARROS, V. M. S.; PARTELLI, F. L. AMARAL, J. F. T.; TOMAZ, M. A. Exploring the nutritional efficiency of genotypes of *Coffea arabica* L. from different parental lineages in contrasting environments for N availability. *African Journal of Biotechnology*, v.18, p. 435-443, 2019.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. *Cultura de café no Brasil: Novo manual de recomendações*. Rio de Janeiro, MAPA /PROCAFE, 2005. 438p.

MESQUITA, C. M.; REZENDE, J. E.; CARVALHO, J. S.; FABRI JÚNIOR, M. A.; MORAES, N. C.; DIAS, P. T.; ARAÚJO, W. G. *Manual do café: manejo de cafezais em produção*. Belo Horizonte: Emater-MG, 2016. 72p.

MORAES, F. R. P.; CATANI, R. A. A absorção de elementos minerais pelo fruto do cafeeiro durante sua formação. *Bragantia*, v. 23, p.331-336, 1964.

NETO, A. P.; FAVARIN, J. L.; HAMMOND, J. P.; TEZOTTO, T.; COUTO, H. T. Analysis of phosphorus use efficiency traits in *Coffea* genotypes reveals *Coffea arabica* and *Coffea canephora* have contrasting phosphorus uptake and utilization efficiencies. *Frontiers in plant science*, v. 7, p. 408, 2016.

POLTRONIERI, Y.; MARTINEZ, H. E.; CECON, P. R. Effect of zinc and its form of supply on production and quality of coffee beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.91, p. 2431-2436, 2011.

NGUGI, K.; ALUKA, P.; MAINA, D. Variation of mineral micronutrient elements in robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) as measured by energy dispersive X-Ray fluorescence. *Annual Research & Review in Biology*, v. 9, p. 1-13, 2016.

NOBRE, G. W.; BORÉM, F. M.; ISQUIERDO, E. P.; PEREIRA, R. G. F.; OLIVEIRA, P. D. D. Composição química de frutos imaturos de café arábica (*Coffea arabica* L.) processados por via seca e via úmida. *Coffee Science*, v.6, p.107-113, 2011.

PARTELLI, F. L.; VIEIRA, H. D.; SILVA, M. G.; RAMALHO, J. C. Crescimento vegetativo sazonal em ramos de diferentes idades do cafeeiro conilon. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 3, p. 619-626, 2010.

PARTELLI, F. L.; ESPINDULA, M. C.; MARRÉ, W. B.; VIEIRA, H. D. Dry matter and macronutrient accumulation in fruits of conilon coffee with different ripening cycles. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 38, n. 1, p. 214-222, 2014.

PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. D.; CHALFOUN, S. M.; PÁDUA, T. D. Efeito de micronutrientes na população fúngica associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, v.26, p.918-926, 2002.

PEREIRA, R. G. A.; MALTA, M. R. Fatores que podem promover alterações nos grãos de café. In: PEREIRA, R. G. F. A. (Ed.). *Qualidade do café/ Cafés especiais*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. p. 25-39.

RENA, A.B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. *Informe Agropecuário*, v.11, p.26-40, 1985.

RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade*. 1 Ed. Piracicaba: POTAFOS, 1986, 447p.

RENA, A. B.; CARVALHO, C. H. S. Causas abióticas da seca de ramos e morte de raízes em café. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). *Produção Integrada de café*. Vicososa: UFV, p. 197-222. 2003.

ROMHELD, V.; MARCCHNER, H. Function of micronutrientes in plants. In: MOTVEDT, J. J.; GIORDANO, P. M.; LINDSAY, W. L. (Ed). *Micronutrients in agriculture*. 2ed. Madison: SSSA, 1991. P. 297-328.

SFREDO, G. J.; OLIVEIRA, M. C. N. Soja: molibdênio e cobalto. *Embrapa Soja- Documentos (INFOTECA-E)*, 2010, 36p.

SIMÕES, R. O.; FARONI, L. R. D. A.; QUEIROZ, D. M. Qualidade dos grãos de café (*Coffea arabica* L.) em coco processados por via seca. *Caatinga*, v. 21, p.139-146, 2008.

SOUZA, F. D. F.; CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; PENA, G. F.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; CRUZ, C. D. Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 13, p. 221-227, 2013.

STARLING, L. C. T.; MARTINS, L. D.; RODRIGUES, W. N.; REINICKE, T. M.; DO AMARAL, J. F. T.; TOMAZ, M. A.; ESPINDULA, M. C. Variability and nutritional balance among genotypes of *Coffea canephora* (Rubiaceae) in drought versus adequate water supply. *Genetics and Molecular Research*, v. 17, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. 4 ed. Sunderland, US: Sinauer Associates, 2010. 719p.

VINECKY, F.; DAVRIEUX, F.; MERA, A. C.; ALVES, G. S. C.; LAVAGNINI, G.; LEROY, T.; BONNOT, F.; ROCHA, O. C.; BARTHOLO, G. F.; GUERRA, A. F. RODRIGUES, G. C. MARRACCINI, P. ANDRADE, A. C. Controlled irrigation and nitrogen, phosphorous and potassium fertilization affect the biochemical composition and quality of Arabica coffee beans. *The Journal of Agricultural Science*, v. 155, p. 902-918, 2017.

Capítulo 04

ESTRESSE ABIÓTICO EM PLANTAS E SEUS MARCADORES

Paola de Avelar Carpinetti

Bruno Paes de Melo

Vinicius Sartori Fioresi

Luiz Fernando de Camargos

1. INTRODUÇÃO

As plantas são organismos sésseis que vivem em ambientes em constante mudança e que muitas vezes são desfavoráveis para o seu desenvolvimento. As flutuações das condições ambientais exigiram que as plantas desenvolvessem táticas adaptativas potentes para evitar ou tolerar efeitos adversos e, assim, sobreviver e prosperar. Essas condições ambientais adversas podem ser divididas em dois grandes grupos: (a) as que envolvem fatores bióticos, como infecções por patógenos (por exemplo, fungos, bactérias e vírus) e ataques por herbívoros (entre eles, os insetos); e (b) fatores abióticos, que usualmente envolvem extremos de temperatura (calor, frio e congelamento), disponibilidade de água (seca e inundação), e aspectos relacionados ao solo (como escassez de nutrientes, salinidade e metais pesados) (KHAN et al., 2020).

O estresse abiótico é caracterizado quando tais condições ambientais afetam o desenvolvimento da planta ou refletem em produção abaixo dos níveis ideais, sendo assim, um dos maiores desafios para a agricultura mundial (CRAMER et al., 2011). A preocupação com esse tema tem aumentado significativamente, já que as mudanças climáticas recentes contribuem para o agravamento do problema. A seca, o frio e a salinidade são os principais fatores ambientais que afetam a distribuição geográfica das plantas na natureza, limitam a produtividade agrícola e ameaçam a segurança alimentar (ZHU, 2016). Algumas estatísticas apontam que problemas relacionados a esses fatores impactam cerca de 64, 57 e 6% das terras cultiváveis, respectivamente, podendo representar uma redução de aproximadamente 50%

na produtividade agrícola global (YADAV et al., 2020). Ainda em relação a salinidade, algumas estimativas apontam que atualmente 20% da área cultivada no mundo sofra com problemas de salinidade e é possível que nos próximos 25 anos, esse número alcance 30% da área cultivada, sendo uma das razões a prática de irrigação (SHAHID et al., 2018; WANG et al., 2003) such as drought, salinity, extreme temperatures, chemical toxicity and oxidative stress are serious threats to agriculture and the natural status of the environment. Increased salinization of arable land is expected to have devastating global effects, resulting in 30% land loss within the next 25 years, and up to 50% by the year 2050. Therefore, breeding for drought and salinity stress tolerance in crop plants (for food supply

Para neutralizar o efeito das adversidades ambientais, plantas desenvolveram mecanismos de defesa eficientes, manipulando sua tolerância, e potencial de resposta através de mecanismos moleculares e celulares integrados. Essas respostas, essencialmente, são determinadas pela intensidade e duração do fator causador. No entanto, a fase de desenvolvimento em que a planta se encontra, também é preponderante na modulação e tipo de resposta, uma vez que características morfofisiológicas podem variar durante o desenvolvimento e com isso, apresentar sensibilidade diferencial ao estresse. Um exemplo ocorre com o trigo, que é mais sensível a altas temperaturas durante a fase reprodutiva (floração), do que durante a fase vegetativa. Em geral, a resposta das plantas envolve diferentes tipos e compartimentos celulares, além da modulação de diversos genes, proteínas, moléculas reguladoras, agentes de sinalização e compostos químicos, que estabelecem inúmeras de rotas e redes interligadas (GILL et al., 2016).

Os mecanismos de aclimação e adaptação, pelos quais as plantas toleram o estresse, integram respostas bioquímicas, fisiológicas e moleculares e, didaticamente, podem ser divididos em quatro fases: (1) fase de resposta, que ocorre no início do estresse e é caracterizada pela percepção do estresse, ocasionada geralmente por um distúrbio da homeostase; (2) fase de restituição ou de resistência, a qual inclui processos de reparo e adaptação, que ocorrem conforme a continuidade do estresse; (3) fase final, quando o estresse acontece a longo prazo, e envolve sobrecarga da capacidade de adaptação podendo levar a doenças crônicas ou a morte; e por fim a (4) fase de regeneração, quando a planta supera o estresse e recupera parcial ou totalmente a homeostase (LICHTENTHALER, 1998).

Todos esses eventos envolvem uma grande diversidade de genes induzíveis por estresse, e seus produtos podem atuar tanto diretamente, como as enzimas responsáveis pela síntese de vários osmoprotetores, por exemplo a prolina; as proteínas abundantes da embriogênese tardia (*late embryogenesis abundant proteins – LEA*) que exercem importante papel no tamponamento da hidratação celular; proteínas com função anticongelantes (*antifreeze proteins – AFP*), chaperonas que auxiliam no correto dobramento de proteínas acumuladas no estresse; e enzimas de desintoxicação, como a ascorbato-peroxidase. Mas também podem ter um papel regulatório mais abrangente, como os desempenhados por fatores de transcrição (*transcription factors – TF*), proteínas cinases e enzimas envolvidas no metabolismo de fosfoinosítideo, essenciais para a modulação da expressão gênica e as vias de transdução de sinal (KHAN et al., 2020).

O conhecimento a respeito de como as plantas interpretam os sinais do estresse e se adaptam a ambientes adversos, são questões biológicas fundamentais e têm conduzido inovações em culturas há décadas, seja através do melhoramento clássico ou modernos projetos de engenharia genética. Avanços no melhoramento de culturas impactam na melhoria da produtividade agrícola e também da sustentabilidade ambiental, uma vez que as culturas com maior susceptibilidade ao estresse consomem mais água e fertilizantes e, portanto, sobrecarregam o meio ambiente (ZHU, 2016). Nesse cenário, marcadores fisiológicos, bioquímicos e genéticos representam importantes ferramentas para o estudo dessas complexas vias que integram a resposta ao estresse abiótico em plantas, além de serem úteis para o mapeamento e caracterização de fenótipos de interesse (STUBER, 2010).

O presente capítulo tem como objetivo fornecer um panorama acerca das vias de transdução de sinal e principais eventos moleculares que capacitam as plantas a se adaptarem ou se aclimatarem ao estresse abiótico. A partir desse conhecimento, apresentar de forma complementar e prática, uma seção com os principais marcadores utilizados para o estudo e caracterização de plantas submetidas aos diversos tipos de estresse abiótico.

2. PLANTAS EM AMBIENTES ADVERSOS

Diferentes estresses abióticos, como frio, calor, seca, inundação e sal, podem provocar distúrbios celulares comuns e estresses secundários, incluindo lesão de membrana, danos por espécies reativas, desnaturação de proteínas e estresse osmótico. A versatilidade da resposta a diferentes condições desfavoráveis em plantas está relacionada a uma intrincada rede que compreende diferentes níveis, como defesas celulares, fisiológicas e morfológicas. Alguns autores sugerem que as frentes de respostas de defesa celular mais generalizadas e conservadas em plantas são cutícula (proteção externa), dessaturação de lipídios de membrana, ativação do sistema de defesa contra espécies reativas, indução de chaperonas moleculares e acúmulo de solutos compatíveis a necessidade celular (HE et al., 2018).

Na resposta ao estresse, essas defesas são orquestradas, dentro de uma complexa rede regulatória, envolvendo moléculas de sinalização, incluindo hormônios do estresse (por exemplo, o ácido abscísico), espécies reativas de oxigênio (por exemplo, o peróxido de hidrogênio), íons cálcio (Ca^{2+}), sulfeto de hidrogênio (H_2S), óxido nítrico (NO), poliaminas e fitocromos. Além de um conjunto de proteínas efetoras (como as proteínas cinases), proteínas envolvidas no balanço redox (por exemplo, as enzimas NADPH oxidase e superóxido dismutase), bem como fatores de regulação gênica a jusante, principalmente representados pelos fatores de transcrição. Assim, após o reconhecimento do estresse e consequente transdução de sinal, os fatores a jusante, levam à alteração da expressão gênica e das atividades de proteínas, iniciando assim os sistemas de defesa da planta (KRASENSKY & JONAK, 2012; KU et al., 2018).

A **Figura 1** introduz os mecanismos gerais pelos quais as plantas percebem os estresses ambientais, realizam a transdução de seus sinais e, por meio de uma resposta sofisticada e finamente coordenada, integram os sinais de estresse, o metabolismo hormonal e as respostas adaptativas que levam à tolerância. De maneira geral, os estresses são sentidos por receptores ou proteínas de membrana, gerando uma perturbação no balanço iônico através da membrana, com influxo de cálcio para o citosol. O aumento repentino nas concentrações desse íon no citosol faz com que uma cascata de sinalização mediada por proteínas cálcio-dependentes e cinases culmine na ativação de fatores de transcrição que, por

sua vez, vão modificar a expressão de genes relacionados ao remodelamento da fisiologia vegetal. Caso os mecanismos disparados pelo estresse não sejam suficientemente efetivos no combate dos efeitos deletérios sobre as biomoléculas causados principalmente pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como a oxidação de lipídeos de membrana, a degradação de proteínas e ácidos nucleicos, as células iniciam programas de morte celular, cujo processo global é chamado de senescência (AKPINAR et al., 2012; GILL et al., 2016; ZHU, 2016).

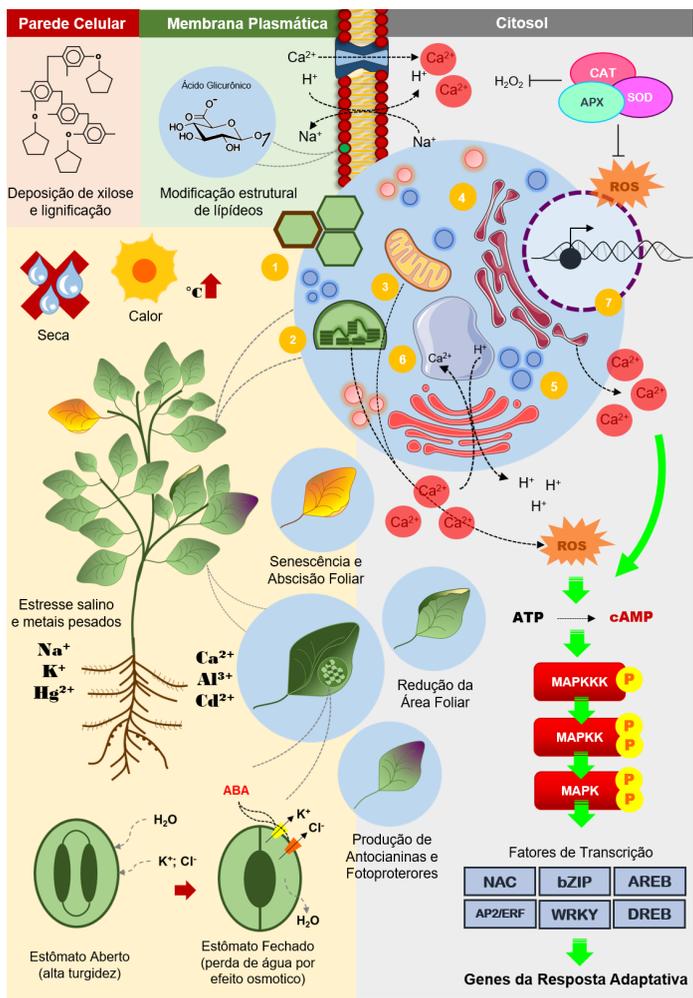


Figura 1. Estresses abióticos, integração de sinais e respostas adaptativas em plantas. As plantas quando submetidas às intempéries ambientais disparam

programas de adaptação e remodelamento fisiológicos como forma de superar as adversidades e dar prosseguimento ao seu ciclo natural de vida. Os principais tipos de estresses abióticos estão relacionados às características dos ambientes que cercam as plantas e das mudanças climáticas que ocorrem nesse ambiente. Os mais comuns resumem-se a temperatura (calor ou frio excessivos), a disponibilidade de água (seca ou alagamento) e a composição do solo (estresse salino, estresse por metais tóxicos ou acidez). As plantas são capazes de perceber diferentes sinais de estresse por meio de receptores primários, que podem estar embebidos em sua membrana plasmática ou em outros compartimentos celulares **(1)**. Frequentemente, a ativação desses sensores culmina em um fluxo de íons através da membrana que, normalmente, culmina com influxo de Ca^{2+} para o citosol. Como efeito localizado dos estresses abióticos, a perturbação do balanço energético dos fotossistemas nos cloroplastos **(2)** e da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias **(3)** culminam na produção de ROS, que é também uma resposta compartilhada por outros compartimentos, como a saturação da via de dobramento de proteínas no retículo endoplasmático **(4)** e ativação de peroxidases e oxidases nos peroxissomos **(5)**. O conteúdo citosólico de Ca^{+2} é balanceado, após o influxo desencadeado pela sinalização dos estresses abióticos, por meio de transportadores antiporte vacuolares **(6)**. Coletivamente, esses sinais são integrados e potencializados por outros mensageiros secundários, como o AMP cíclico produzido pela ativação da adenilato-ciclase em resposta a ROS e Ca^{2+} e convergem para a ativação de proteínas cinases, incluindo CDPKs (cinases dependentes de cálcio) e cascatas de MAP-cinases, que vão ativar as vias de biossíntese de hormônios, como o ABA. Finalmente, os fatores de transcrição responsivos a estresse, reforçados pela sinalização hormonal, são responsáveis pela modulação transcricional de diversos genes no núcleo **(7)**, resultando no remodelamento da fisiologia vegetal e nas respostas adaptativas que levam a fenótipos característicos de plantas submetidas a estresses. Em nível molecular, as plantas respondem com a lignificação das paredes celulares e deposição de hemicelulose, ou ainda a modificação da composição lipídica das membranas plasmáticas como forma de aumentar a rigidez estrutural das células em resposta a flutuações de temperatura e no potencial osmótico. Diversas enzimas envolvidas com a biossíntese de osmólitos, pigmentos, termoprotetores e outros metabólitos secundários também são ativadas,

além das enzimas detoxificadoras de ROS, que tentam restabelecer a homeostase redox das células submetidas aos estresses. Em nível sistêmico, são detectadas alterações morfológicas na raiz e nas folhas, como a proliferação de raízes laterais em resposta a seca, e alterações bioquímicas, como a secreção de fitoquelantes em resposta a metais pesados, bem como a reclusão e o fechamento estomáticos, além da redução da área foliar e abscisão. Caso os mecanismos da resposta adaptativa não sejam suficientemente eficientes para restaurar a homeostase da planta, as células acionam a senescência precoce, redirecionando o fluxo de nutrientes para os tecidos reprodutivos e a geração de sementes por meio de seus programas de morte celular desencadeados por estresse.

3. VIAS DE SINALIZAÇÃO NO ESTRESSE ABIÓTICO EM PLANTAS

Na natureza, a tolerância e a sobrevivência das plantas são alcançadas por sua capacidade de tornar suas respostas flexíveis às variações ambientais. Por sua vez, a flexibilidade da resposta é governada pelas vias de sinalização. Muitas vias de resposta a diferentes estresses compartilham os mesmos intermediários e ramos metabólicos, além de comunicarem com vias do metabolismo primário da planta, como a do fornecimento energético (que impacta no crescimento do vegetal). Mas também podem induzir rotas metabólicas exclusivas (AKPINAR et al., 2012).

Uma via de transdução de sinal genérica começa com a percepção do sinal, pelos sensores de estresse, e desencadeiam uma resposta que envolvem intermediários da sinalização, ou segundos mensageiros, por exemplo, fosfatos de inositol e espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) e ácido abscísico (*abscisic acid* – ABA). Esses mensageiros secundários podem atuar na modulação dos níveis intracelulares de cálcio (Ca^{2+}), frequentemente iniciando uma cascata de fosforilação de proteínas, como as envolvendo proteína cinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase* – MAPK), ou proteína cinase dependente de cálcio (*Ca²⁺-dependent protein kinases* – CDPK), que finalmente tem como alvo as proteínas diretamente envolvidas na proteção celular ou os fatores de transcrição que controlam conjuntos específicos de genes regulados pelo estresse (XIONG et al., 2002).

3.1. ABA na sinalização do estresse

As respostas moleculares das plantas a estresses abióticos envolvem interações entre várias vias metabólicas e de sinalização. Mensageiros químicos, como os fitormônio, desempenham papéis cruciais na regulação dos mecanismos de tolerância ao estresse, além de seu papel no crescimento e desenvolvimento. A expressão gênica responsiva ao estresse em várias plantas é principalmente regulada por vias dependentes e independentes de ABA. Outros fitormônios, principalmente o ácido jasmônico, etileno e ácido salicílico, também têm papéis significativos na atividade de respostas e sinalização do estresse abiótico. Particularmente, todas as frentes de defesas bioquímicas, mencionadas no tópico anterior, podem ser mobilizadas por ABA, incluindo ceras cuticulares, proteínas de choque térmico (*heat shock proteins – HSPs*), antioxidantes e enzimas detoxificadoras e osmoprotetores (por exemplo, o aminoácido prolina). Ele também tem importantes papéis em vários processos fisiológicos e de desenvolvimento de plantas, como dormência de sementes, morfogênese embrionária, abertura estomática, manutenção do turgor celular e biossíntese de lipídios e proteínas de armazenamento (EL-ESAWI, 2017; HE et al., 2018).

Condições de alta salinidade, seca e baixa temperatura são consideradas os principais fatores causadores do estresse hiperosmótico, caracterizado por uma diminuição da pressão de turgor e perda de água. A principal função do ABA está relacionada à regulação do balanço hídrico da planta e a tolerância ao estresse osmótico. Existem quatro componentes principais da cascata de sinalização ABA sob condição de estresse: (1) receptor ABA (como, receptor PYL), (2) proteína fosfatase tipo 2C (*type 2C protein phosphatase – PP2C*); proteína SnRK2 (*sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2*) e fatores de transcrição responsivos a ABA (*ABA-responsive element – ABRE*). Sob estresse abiótico, o ABA se liga aos receptores intracelulares PYL e à fosfatase PP2C, formando um complexo ternário (ABA-PYL-PP2C). Esse complexo ativado, é responsável pela autofosforilação de membros SnRK2 e eles são os principais reguladores de estresse abiótico. Uma vez que SnRK2 é ativada, ela fosforila fatores de transcrição a jusante (ABREB/ARF) e, por sua vez, induz genes responsivos a ABA, o que ainda leva à adaptação de plantas sob vários estresses abióticos (HUBBARD et al., 2010; SADDHE et al., 2017).

A via de sinalização de ABA faz interface com outros elementos da via de transdução de sinais, como canais iônicos, espécies reativas de oxigênio, além de interagir com vias de outros fitormônio, formando uma complexa rede de defesa contra estresses ambientais. Compreender como ocorre essa integração entre as vias de sinalização de defesa, ajuda a revelar novos alvos importantes para a obtenção de culturas mais tolerantes ao estresse abiótico (KHAN et al., 2020).

3.2. Mecanismos sensores

As plantas têm a capacidade de perceber inúmeras variações ambientais, e com isso, entende-se que elas apresentam diversos mecanismos sensores de estresse. Contudo, apesar de muitos esforços, apenas alguns possíveis sensores foram identificados em plantas. Entre os desafios impostos estão a redundância funcional dos genes que codificam proteínas sensoras e ainda dificuldades experimentais, pois demonstrar que uma proteína ou outra macromolécula funciona como um sensor para um sinal físico (por exemplo, mudança na pressão osmótica, concentração de íons ou temperatura) é tecnicamente muito desafiador. Acredita-se que as plantas percebem alterações das condições ambientais por uma interrupção ou variação em processos fisiológicos vegetais, modificando funções como o transporte iônico, além da estabilidade de proteínas ou do mRNA. Esses efeitos podem resultar em uma dificuldade entre o acoplamento de reações ou outras funções celulares. Assim, a percepção dessas perturbações primárias pode sinalizar para diferentes respostas, mediante a alteração de rotas existentes ou ativação de vias especializadas de resposta ao estresse (ZHU, 2016).

Embora a detecção do estresse seja frequentemente pensada por ocorrer na superfície celular ou na membrana plasmática, mediante a percepção de um ligante, diferentes tipos de mecanismos sensores estão envolvidos na percepção desses distúrbios. Sinais de estresse, teoricamente, podem ser detectados desde que o sinal de estresse provoque: (1) efeitos mecânicos do estresse na planta ou na estrutura celular, como mudança no estado do componente celular (carboidrato, proteína, lipídeo, DNA ou RNA); (2) alterações no metabolismo celular, geralmente detectadas pelo acúmulo de substâncias resultantes do desacoplamento de reações enzimáticas (por exemplo, a acumulação de ROS durante o estresse

causado pela luminosidade excessiva); (3) atividade de proteínas especializadas, envolvidas diretamente na percepção do estresse (por exemplo, canais de cálcio que respondem a alterações na temperatura); (4) modificações epigenéticas da estrutura do DNA ou do RNA (por exemplo, alterações na cromatina que ocorrem durante o estresse térmico) (TAIZ et al., 2015). Alguns exemplos de mecanismos sensores de estresse em plantas estão apresentados na tabela a seguir:

Tabela 1 – Exemplos de mecanismos sensores de estresses em plantas

Estresse	Gene	Função	Ação
Seca	<i>OSCA1</i>	canal de cálcio	Na seca e no estresse osmótico o turgor celular é alterado e <i>OSCA1</i> é ativado, possivelmente pela diferença na tensão da membrana. Com isso, facilita o influxo de Ca^{2+} , resultando na ativação de uma cascata de sinalização de tolerância à seca.
Salinidade	<i>MOCA1</i>	glicosil-transferase	<i>MOCA1</i> transfere ácido glucurônico (GlcA), que é negativamente carregado, para formar um glicosíngolípido (GIPC). Esse lipídeo na superfície externa da membrana plasmática, através de sua cabeça polar, liga cátions monovalentes, como Na^+ . Após a ligação do Na^+ , um canal de influxo de cálcio desconhecido é ativado, o que resulta na ativação da via SOS para excluir o excesso de Na^+ da célula.
Calor	<i>PhyB</i>	fotorreceptor	O calor pode ser percebido primariamente por fitocromos (<i>PhyB</i>), fotorreceptores vegetais que regulam a fotomorfogênese. A conversão pelo calor de <i>PhyB</i> ativado em inativo, resulta em maior estabilização de PIF4, um fator de transcrição que modula a expressão de genes que controlam o crescimento das plantas.
Frio	<i>COLD1</i>	proteína transmembrana na membrana plasmática e ER	Proposta como sensor primário de baixas temperatura. <i>COLD1</i> interage com a subunidade α de uma proteína G (<i>RGA1</i>). Essa interação resulta em atividade aumentada da GTPase e um influxo de Ca^{2+} na célula, levando à ativação da resposta de tolerância ao frio.

Fonte: (LAMERS et al., 2020)

A partir do reconhecimento inicial do estresse, os sensores iniciam cascatas que transmitem o sinal para diferentes organelas e ativam fatores de transcrição que induzem a expressão de um determinado conjunto de genes envolvidos na resposta. Por vezes, as perturbações causadas pelo estresse atingem particularmente alguns compartimentos celulares, como o acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático (RE); danos causados pelas ROS, afetando principalmente os cloroplastos no estresse luminoso, mas também as mitocôndrias e os peroxissomos como consequência em quase todos os tipos de estresse; além da parede celular da planta, que é frequentemente modificada quando exposta a condições adversas, principalmente o estresse hídrico (ZHANG et al., 2018).

Para algumas organelas, como o RE, existem vias de resposta específicas muito bem caracterizadas, como a via de resposta a proteínas mal dobradas (*Unfolded Protein Response – UPR*), que tem pelo menos três sensores (a proteína cinase de membrana Ire1, e dois fatores de transcrição também associados à membrana do RE, bZIP17 e bZIP28). A ativação dessa via envolve o desligamento da chaperona molecular BiP desses sensores, para atuar no acúmulo de proteínas desenoveladas. As respostas geradas por essa via visam restaurar a função normal da célula interrompendo a tradução de proteínas, degradando proteínas mal dobradas e ativando as vias de sinalização que levam ao aumento da produção de chaperonas. Caso o estresse no RE persistir e a célula for incapaz de restaurar a homeostase, as vias de sinalização de morte celular programada são ativadas (BAO & HOWELL, 2017).

3.3. Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são átomos, íons e moléculas derivados do oxigênio atmosférico (O_2), que devido instabilidade de seus elétrons desemparelhados, possuem alto potencial de reatividade com moléculas biológicas. Embora os mecanismos envolvendo ROS em plantas não sejam completamente compreendidos, é evidente a importância das espécies reativas de oxigênio em diversos processos celulares, incluindo as vias de resposta a estresse abiótico e mecanismos de tolerância e adaptação das plantas. As duas principais fontes de ROS durante o estresse abiótico são: (1) via de sinalização, onde ROS são

produzidos com a finalidade de sinalizar como parte da rede de transdução de sinal de resposta ao estresse abiótico; e (2) via metabólica, na qual ROS são produzidas como consequência do desequilíbrio da atividade metabólica. Esse aumento de ROS pode culminar em danos oxidativos às membranas (peroxidação lipídica), proteínas, moléculas de RNA e DNA, e até levar à destruição oxidativa da célula (estresse oxidativo). Além dos danos diretos, as ROS podem gerar toxicidade celular causada pela formação de subprodutos do metabolismo do estresse que são tóxicos para as células (CHOUDHURY et al., 2017; KHAN et al., 2020).

Nesse sentido, e para evitar esses danos, as plantas possuem um grande número de proteínas que compõem um sistema de desintoxicação de ROS, como por exemplo a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, bem como componentes antioxidantes como ácido ascórbico e glutathione, que estão presentes em quase todas as células e compartimentos subcelulares. Esses componentes agem como moduladores das respostas ao estresse das plantas através da interferência entre a sinalização hormonal, sinalização metabólica e de desenvolvimento. Frequentemente, genes envolvidos nesses mecanismos protetivos do estresse oxidativo são utilizados em estudos que visam a obtenção de plantas mais tolerantes e adaptadas a diferentes condições de estresses abióticos (CHOUDHURY et al., 2017).

Quando atuam como mensageiros secundários na transdução de sinal, as ROS são geradas em resposta à percepção do estresse, por exemplo, mediada pelo influxo de íons cálcio e/ou pela fosforilação e ativação da enzima NADPH oxidases na membrana plasmática e consequente produção de ROS. Uma vez geradas, essas espécies irão propagar o sinal por meio de alterações do status redox de diferentes componentes celulares. Alterações na estrutura e/ou função de proteínas pode, por exemplo, regular a ligação de fatores de transcrição e assim modular a transcrição de genes responsivos ao estresse. Já ROS de origem metabólica podem, por exemplo, alterar diretamente o estado de oxidação de enzimas regulatórias do metabolismo celular, alterando sua função e modulando, assim, diferentes reações metabólicas, a fim de combater os efeitos do estresse (YOU & CHAN, 2015).

Tanto ROS de sinalização como de origem metabólica são gerados em diferentes compartimentos subcelulares, como por exemplo, ROS metabólicos no cloroplasto e ROS de sinalização no apoplasto. Os principais locais produtores

de ROS durante o estresse abiótico são o cloroplasto, mitocôndria, peroxissomo e apoplasto. No entanto, cada compartimento estabelece e controla sua própria homeostase, através de uma contínua regulação entre a produção e eliminação dessas espécies, gerando uma assinatura redox, que varia em diferentes tecidos e células. Mas esses sinais não ficam confinados, uma vez que os compartimentos podem afetar o nível de ROS um do outro, como por exemplo, pelo mecanismo de transporte de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através das membranas, regulado por meio de aquaporinas. Esse processo dinâmico entre os compartimentos é de fundamental importância para mecanismos de tolerância e adaptação em plantas sob estresse. Isso porque, diferentes estresses abióticos ou estresses combinados, impactam de forma diferencial a homeostase de ROS nos compartimentos celulares, com isso geram uma combinação específica de sinais, o que determina uma resposta mais adequada à condição adversa enfrentada pelo vegetal (SUZUKI, 2015).

3.4. Ca^{2+} e proteínas cinases cálcio-dependentes

Os mensageiros secundários se destacam pela capacidade de propagar um sinal primário com grande intensidade e alcance. Entre eles o Ca^{2+} , se sobressai como talvez o mais importante, ao lado do AMP cíclico (*cyclic adenosine monophosphate* – *cAMP*). As células vegetais mantêm a concentração de Ca^{2+} citosólica em baixas concentrações (entre 100-350 nM), porém estocam esse íon no retículo endoplasmático e no vacúolo para serem resgatados. Geralmente, em resposta a estímulos (bióticos, abióticos, hormonais), canais em organelas e na própria membrana plasmática se abrem para ocorrer um influxo de Ca^{2+} para o citosol, via difusão, contribuindo para alterações no gradiente eletroquímico. Proteínas Ca^{2+} ATPases (também chamadas de bombas de cálcio) e transportadores antiporte Ca^{2+}/H^+ são responsáveis tanto por incrementar a concentração dos íons cálcio, por processos sinalizadores, quanto por reestabelecer as condições normais de concentração desse íon após perda de excitação (BUCHANAN et al., 2015; GILL et al., 2016).

Algumas famílias de sensores de Ca^{2+} foram identificadas em plantas, e talvez a mais conhecida seja a calmodulina (CaM) e as proteínas relacionadas. A

ligação do íon cálcio à calmodulina promove uma alteração conformacional da estrutura proteica, ativando-a e permitindo sua interação com diversas proteínas envolvidas em uma infinidade de respostas essenciais, como regulação da transcrição e atividade enzimática. Outros sensores relevantes são do grupo das proteínas semelhantes à calcineurina B (*calcineurin B-like – CBL*), que são serina/ treonina fosfatases dependentes de cálcio e interagem com proteínas cinases para ativar a cascata de sinalização dependente de Ca^{2+} (KURUSU et al., 2015)

CaM e CBL são pequenas proteínas que contêm múltiplos domínios de ligação de Ca^{2+} , mas não possuem outros domínios efetores, assim, para transmitir o sinal de Ca^{2+} , interagem com proteínas alvo e regulam sua atividade. Já as proteínas cinases dependentes de Ca^{2+} (*Ca²⁺-dependent protein kinases – CDPK*), que integram uma terceira classe de proteínas com importante papel na sinalização mediada por cálcio, além de atuarem como sensores (devido a capacidade de perceber o influxo de íons cálcio por conter domínios de ligação de Ca^{2+}), também desempenham um papel efetor, através do seu domínio cinase, e assim, funcionam tanto como sensores de Ca^{2+} quanto como efetores de sua atividade (GILL et al., 2016).

Como um dos resultados mais relevantes da cascata de sinalização mediada por Ca^{2+} em resposta a estresses abióticos, está a ativação de fatores de transcrição, que irão regular (positiva ou negativamente) a transcrição de diversos genes importantes na resposta ao estresse. No entanto, essa regulação atua de diferentes formas nas células e entre os diferentes tipos de estresse. Por exemplo, em resposta ao estresse térmico e salino, vários genes sensores são ativados em resposta aos sinais de Ca^{2+} , como calmodulinas e também de CMLs (*CaM-like proteins*). Em outro estudo, foi demonstrado que a superexpressão de uma calmodulina (GmCaM3) leva a inibição de expressão de genes correlacionados ao estresse induzido por frio, atuando como um efetor negativo da via (JAE et al., 2005; TOWNLEY & KNIGHT, 2002).

Embora seja bastante estabelecido que a variação nas concentrações intracelulares de íons cálcio seja evento chave na transdução de sinal estimulado por estresses, ainda pouco se sabe como os diferentes sinais provocam respostas celulares distintas e específicas. Alguns autores sugerem que um sinal de Ca^{2+} é apresentado não somente pela modulação da concentração de íons cálcio,

mas também por sua informação espacial e temporal. Assim, o sinal deve ser compreendido como uma combinação de alterações em todos os parâmetros de Ca^{2+} produzidos por um determinado estímulo, e esse conjunto de fatores é chamado de “assinatura de Ca^{2+} ”. Embora tais assinaturas possam explicar parcialmente a especificidade das respostas celulares, as moléculas que percebem e interpretam os sinais de Ca^{2+} fornecem especificidade adicional para o acoplamento de parâmetros de Ca^{2+} às respostas celulares (LUAN et al., 2002).

3.5. Proteínas cinases SnRKs e cascata da MAPK

A fosforilação reversível de proteínas é um dos mecanismos mais importantes em qualquer mecanismo de transdução de sinal. As proteínas cinases desempenham um papel fundamental na ligação entre respostas adaptativas ao estresse da planta, e estabelecimento da homeostase celular. Em plantas, a família de cinase SnRKs (*sucrose non-fermenting 1-related protein kinases*), dividida em três subfamílias (SnRK1, SnRK2 e SnRK3), é conhecida pela participação em diversas vias de resposta e adaptação ao estresse abiótico, incluindo sinalização por ABA (via TFs da família NAC), sinalização de ROS, regulação da homeostase iônica e o estresse oxidativo, respectivamente (KHAN et al., 2020). Os membros da subfamília SnRK2 são serina/treonina cinases, e já são bem caracterizados quanto a seus papéis na regulação da resposta da planta ao ABA, por meio de fosforilação direta de vários alvos a jusante, por exemplo, SLAC1 (*slow anion channel-associated 1*), envolvido controle estomático; e fatores de transcrição necessários para a expressão de vários genes de resposta ao estresse (BARAJAS-LOPEZ et al., 2018).

Entre os importantes membros da subfamília SnRK3 (também conhecidos como PKs ou CIPKs) está a cinase SOS2 (*salt overly sensitive 2*), um componente central da via SOS (*Salt Overly Sensitive pathway*), a primeira via de sinalização de estresse abiótico estabelecida nas plantas. As CIPKs são cinases caracterizadas por interagirem com proteínas de ligação de cálcio semelhantes a calcineurina B (CBL). Na via SOS, que regula a sensibilidade à salinidade em *A. thaliana*, SOS2, uma CIPK, é ativada por SOS3, uma CBL, quando ocorre um influxo de Ca^{2+} , que desencadeado pelo estresse. O complexo cinase SOS3-SOS2 atua na

homeostase intracelular de Na^+ e K^+ , um importante mecanismo para tolerância à salinidade. Além disso, outros estudos já demonstraram a participação de complexos CBL-CIPK em várias vias de sinalização de estresse abiótico, onde o cálcio serve como um segundo mensageiro e, particularmente, onde a regulação das atividades do transportador de íons está envolvida parece controlar a expressão gênica (BARAJAS-LOPEZ et al., 2018; ZHU, 2016).

Na sinalização desencadeada por estresse osmótico, temos outro exemplo da participação de membros dessa família nas vias de resposta e adaptação ao estresse abiótico. A proteína cinase OST1 (*open stomata 1*), um membro da subfamília SnRK2, que é responsiva a ABA e modula a produção de H_2O_2 através da enzima NADPH oxidase, controlando assim a abertura e fechamento estomático, importante mecanismo em resposta a vários estímulos estressores (KHAN et al., 2020).

Outro grupo de cinases com papel central nas vias de transdução de sinal em plantas são das MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*). Essas são enzimas que constituem cascatas de sinalização presentes em todas as células eucarióticas. O papel das MAPKs na imunidade das plantas já é estabelecido para uma variedade de estresses, e é melhor caracterizado em resposta a estresses, porém estudos demonstram que são também ativadas por seca, salinidade, frio, ozônio, ROS, e no estresse por metais como cádmio e cobre. Além de serem responsáveis por processos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento mediado por hormônios (GILL et al., 2016).

O módulo ou cascata é geralmente constituído por uma série de três proteínas cinases: MAPK, MAPKK e MAPKKK. O mecanismo clássico de ativação inicia-se com um determinado sinal ou alteração celular que leva a ativação de MAPKKK. MAPKKK atua em seguida fosforilando MAPKK e assim ativando-a. MAPKK por sua vez fosforila MAPK e ativa-a. A forma fosforilada de MAPK pode ser translocada dentro da célula e fosforilar outros transdutores de sinais como outras cinases, enzimas regulatórias no metabolismo ou TFs, regulando desta forma a função celular. O início da sinalização, com ativação de MAPKKK pode ocorrer mediado por fosforilação via uma cinase à montante ou ligação com subunidades da Proteína G, sendo que esse sinal é atenuado ou reprimido por ação de fosfatases (BUCHANAN et al., 2015).

Sinais específicos à montante podem ativar múltiplas cascatas de MAPKs e ao mesmo tempo essas proteínas cinases são responsivas a uma grande gama de sinais, indicando uma rede de transdução convergente e divergente ao mesmo tempo (BUCHANAN et al., 2015). Esse padrão de convergência é bem descrito quando analisamos o módulo MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6 ativado por condições de salinidade ou frio, sendo posteriormente responsável por fosforilar e ativar TFs, o que culminará na expressão de 152 genes envolvidos no metabolismo de resposta ao estresse, sinalização e regulação transcricional (SHOU et al., 2004). Apesar de ainda pouco explorado, resultados promissores têm indicado que a cascata de MAPK atua como um pouco importante de convergência e de cruzamento em resposta à diferentes sinais abióticos (HUANG et al., 2012).

3.6. Fatores de transcrição

Proteínas regulatórias, como os fatores de transcrição (TFs), atuam como os maiores reguladores da resposta a situações de estresse em plantas. Esses fatores são importantes na regulação da expressão gênica em resposta à essas condições. Sua atuação dualista, em respostas adaptativas, geralmente está direcionada a elementos *cis* presentes na estrutura do promotor de genes que poderão ser induzidos ou reprimidos em resposta aos sinais induzidos por estresses. Assim, são também conhecidos como unidades reguladoras da transcrição ou “regulons” (BUCHANAN et al., 2015). Vários TFs já foram descritos na atuação como *regulons* em mecanismos de resposta a estresse abiótico. Famílias de fatores de transcrição encontrados em plantas como bZIP, AP2/ERF, MYB, MYC, Cys2His2 Zinc-finger e NACs estão envolvidas em praticamente todos os processos biológicos, logo são correlacionadas também com mecanismos adaptativos de tolerância ao estresse (SADE et al., 2018).

A família de genes bZIP (*basic leucine zipper*) é uma das maiores famílias de TF, caracterizada por um domínio bZIP altamente conservado, envolvidos na regulação do crescimento, desenvolvimento e a resposta ao estresse. As proteínas bZIP funcionam como componentes-chave em resposta a uma ampla gama de estresses abióticos, incluindo seca, salinidade e temperaturas extremas (WANG et al., 2018). Um exemplo da participação de TFs dessa família, na resposta ao

estresse em plantas, são as proteínas bZIP17, bZIP28 e bZIP60, localizadas no retículo endoplasmático, que desempenham papéis importantes nas respostas ao estresse no ER (GILL et al., 2016). Outros importantes membros são as proteínas bZIP do grupo A, que incluem proteínas de ligação a elementos responsivos a ABA (*ABA-responsive element binding proteins – AREB*) ou fatores de ligação ABRE (*ABRE binding factors – ABF*), que foram caracterizadas como reguladores importantes da expressão gênica na via ABA-dependente em resposta ao estresse abiótico (HIRAYAMA & SHINOZAKI, 2010; REGUERA et al., 2012; YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZA, 2006).

A atuação de TFs da família bZIP, na via de resposta ao estresse ABA-dependente, foi inicialmente demonstrada em *Arabidopsis*. Esses estudos mostraram que ABRE/ABF são ativados por fosforilação, mediada pela cinase SnRK2s (um dos principais componentes da via de sinalização por ABA), e se ligam à região promotora e ativam a expressão gênica de genes dependentes e responsivos a ABA (FUJITA et al., 2013). No entanto, estudos recentes suportam a possibilidade de *crossstalk* entre as vias ABA-dependente e ABA-independente na resposta ao estresse abiótico, e as proteínas AREB/ABF e DREB, participariam dessa convergência, mediante ativação por SnRK2s, sob estresse hídrico. Além disso, estudos mostraram que proteínas da via ABA-dependente (AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 e ABF3), interagem com proteínas da via ABA-independente (DREB2A, DREB1A e DREB2C) e desempenham papéis importantes na regulação da resposta à seca (ROYCHOUDHURY et al., 2013).

A via de resposta ao estresse ABA-independente envolve genes como RD29A e COR15, que atuam na resposta a desidratação, salinidade e temperatura. Os TFs que se ligam na região promotora desses genes são principalmente da família AP2/ERF, como os fatores de transcrição CBF/DREB1 e DREB2 (XU et al., 2008). DREB2 está envolvido mais especificamente na indução de genes de resposta a desidratação e estresse salino, sendo ativado por modificações pós-traducionais, via ubiquitinação (ligação com E3 ubiquitina ligase) (QIN et al., 2008). Já CBF/DREB1 é induzido mais rapidamente e transitoriamente em baixas temperaturas, levando também a ativação de expressão de seus genes alvo em função dessa condição. Estudos demonstraram que *Arabidopsis* superexpressando CBF/DREB1

ou a forma ativa de DREB2 se mostraram mais tolerantes a condições de estresse abiótico. Além disso, foram analisados os genes induzidos em resposta a DREB1 e DREB2 e observou-se que além de existirem genes especificamente induzidos por cada TF, um grupo foi compartilhado entre ambos (SAKUMA et al., 2006).

As proteínas NAC são outra família de TFs com enorme importância tanto em papéis vitais na regulação dos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, como na regulação da expressão de genes em resposta ao estresse abiótico. Essa uma superfamília de TFs é específica de planta e está presente em uma ampla gama de espécies. A expressão dos genes NAC pode ser regulada pela ação de *cis* elementos responsivos ao estresse contidos na região promotora, como por elementos responsivos a ABA (ABREs), elementos responsivos à desidratação (DREs), elementos responsivos ao ácido jasmônico e, também, ao ácido salicílico. Esses genes também podem ser regulados em nível pós-transcricional, por um complexo mecanismos que envolve a clivagem de genes mediada por microRNA ou splicing alternativo. Os TFs NAC também sofrem intensa regulação pós-tradução, incluindo ubiquitinação, dimerização, fosforilação ou proteólise. Essas etapas regulatórias ajudam os fatores de transcrição NAC a desempenhar funções múltiplas na maioria dos processos da planta (SHAO et al., 2015).

Uma das primeiras evidências da participação de proteínas NAC na regulação de genes envolvidos na resposta a estresse abiótico foi a identificação da sequência de reconhecimento NAC (*NAC recognition sequence – NACRS*) na região promotora do gene ERD1 (*early response to dehydration1*), induzido em resposta à seca em *Arabidopsis*. Nas últimas décadas, inúmeros estudos têm associado TFs da família NAC à mecanismos de adaptação e tolerância a estresses ambientais (ZHU, 2016). Muitos estudos empregaram a engenharia genética para utilizar proteínas NAC responsivas ao estresse no melhoramento de culturas (LIU et al., 2020; MAO et al., 2015; RABARA et al., 2014). Exemplos como esses demonstram a importância do estudo de fatores de transcrição como potencial para o desenvolvimento de variedades tolerantes às condições de estresse.

4. MARCADORES NO ESTRESSE ABIÓTICO

Como relatado nos tópicos anteriores, para restaurar a homeostase celular em situação de estresse, as vias de respostas de plantas são intrincadas e sofisticadas, além de, muitas vezes, mostrarem conexões multi-camadas entre si e entre vias de sinalização do desenvolvimento normal do vegetal. Isso faz com que a seleção de marcadores para avaliação do estresse seja uma tarefa difícil e muitas vezes a interpretação dos resultados demanda um conhecimento extenso sobre fisiologia e bioquímica do estresse em plantas. Além disso, nem todos os mecanismos de resposta são conservados e/ou completamente decifrados em todas as plantas, o que faz com que existam relativamente poucos marcadores universais do estresse abiótico em plantas. Nessa seção, foram compilados na **Tabela 2** os principais marcadores celulares, bioquímicos e gênicos para estudos das respostas adaptativas ao estresse, bem como sua análise em diversos sistemas vegetais como forma de direcionar o estudo complexo das vias de remodelamento fisiológico e a análise de dados provenientes desse objetivo.

Tabela 2. Marcadores celulares, moleculares, fisiológicos e genes na resposta adaptativa de plantas aos estresses abióticos.

Marcadores Celulares			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
Fechamento estomático	O movimento estomático, caracterizado pela abertura e fechamento, é um processo regulado pelo hormônio ABA em função da flutuação da temperatura e/ou disponibilidade de água. A turgidez das células-guarda é controlada por canais de potássio (K^+) e cloreto (Cl^-) e, de acordo com o fluxo osmótico da água, o estômato pode se encontrar aberto (alta turgidez – maior potencial osmótico no interior das células) ou fechado (baixa turgidez – maior potencial osmótico fora das células). O fechamento estomático diminui a taxa fotossintética e a transpiração, diminuindo, consequentemente, a geração de ROS por sobrecarga do aparato fotossintético e a perda de água por transpiração.	Aberto/fechado	Avaliação de campos randômicos na superfície abaxial de folhas por microscopia óptica ou microscopia confocal com coloração das secções com iodeto de propídeo e excitação a 543 nm.
Ajuste da área foliar	O ajuste da área foliar é um processo que, assim como o fechamento estomático, diminui a taxa fotossintética. O ajuste pode ser feito por enrolamento das extremidades ou por abscisão foliar.	-	Avaliação fenotípica. Deve-se observar atentamente o perfil das folhas em uma planta controle (exemplar selvagem ou amostra não submetida ao tratamento) em relação às amostras tratadas. Para oferecer um parâmetro quantitativo, pode-se proceder à contagem de folhas com sintomas em relação as folhas assintomáticas.
Espessamento de parede celular	O acúmulo de ROS mediado por estresse leva ao espessamento da parede celular como forma de garantir maior rigidez mecânica. Esse espessamento é alcançado por meio da deposição e polimerização de compostos fenólicos em lignina e pela modificação da estrutura dos polímeros que constituem a parede celular, como a hemicelulose.	Esterificação entre glicoproteínas e compostos fenólicos	Imunolocalização mediada por anticorpos específicos contra glicoproteínas e polímeros de parede celular e suas variações esterificadas e não-esterificadas e análise por microscopia confocal e/ou eletrônica.
		Deposição de pectinas	Quantificação de compostos fenólicos por reação de Follin.
		Lignificação	Mapeamento de genes envolvidos no processo de biossíntese de polímeros de parede celular.

Tabela continua na próxima página

Tabela 2. Marcadores celulares, moleculares, fisiológicos e genes na resposta adaptativa de plantas aos estresses abióticos
(*Continuação da tabela*)

Marcadores Celulares			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
Modificações do perfil lipídico da membrana plasmática	As modificações do perfil lipídico da membrana plasmática em células vegetais são causadas principalmente pelas flutuações de temperatura e pela peroxidação lipídica mediada por ROS.	Frio: aumento na concentração de ácidos graxos insaturados	Na prática, é laborioso acompanhar as modificações da composição lipídica das membranas. A avaliação dessas modificações pode ser feita por meio da inferência indireta avaliando-se a expressão de genes relacionados a dessaturação de ácidos graxos.
		Calor: aumento na concentração de ácidos graxos saturados	Extração em ácido tricloroacético (TCA) e reação com ácido tiobarbitúrico para formação de um composto colorido avermelhado.
		Aumento da concentração do aldeído malônico (MDA)	Quantificação espectrofotométrica em 532 nm.
Morte celular programada	Quando os mecanismos de resposta ao estresse não conseguem superá-lo, as plantas desencadeiam a senescência induzida por estresse como forma de remobilizarem seus nutrientes para os órgãos reprodutivos e sementes na tentativa de perpetuarem a espécie. A extensão dos sintomas de senescência (clorose e necrose foliar) são indicativos da maior tolerância ou suscetibilidade ao estresse.	Aumento da clorose foliar	A clorose foliar pode ser diretamente avaliada como um parâmetro fenotípico, observando-se a área foliar em que há perda de clorofila ou pela quantificação espectrofotométrica direta do pigmento.
		Aumento da necrose foliar e radicular	A necrose foliar e radicular podem ser avaliadas por ensaios de coloração de folhas e raízes por corantes vitais. Em folhas, normalmente se utiliza o Azul de Tripán ou o Azul de Evans e a extensão da morte celular é diretamente associada a intensidade da coloração azul, uma vez que o corante só é capaz de penetrar células mortas. Na raiz, essa avaliação por ser feita por meio da coloração das raízes com iodo de propídeo e sua avaliação sob microscopia confocal. Em células mortas, parede celular e núcleo são corados e em células vivas, apenas a parede é corada. Portanto, a maior incidência de núcleos corados em campos randômicos indica maior extensão da morte celular na raiz.

Tabela continua na próxima página

Tabela 2. Marcadores celulares, moleculares, fisiológicos e genes na resposta adaptativa de plantas aos estresses abióticos (Continuação da tabela)

Marcadores Celulares			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
Morte celular programada (continuação)	(continuação)	Aumento da degradação de proteínas e ácidos nucleicos	A degradação de proteínas e ácidos nucleicos pode ser avaliada por métodos quantitativos e qualitativos. A eletroforese dos ácidos nucleicos e do extrato proteico total de plantas submetidas a estresse permitem inferir sobre a qualidade da amostra, que reflete diretamente na taxa de degradação. Grandes áreas de arraste indicam maior grau de degradação. No caso das proteínas, pode-se estimar a taxa de decaimento proteico por métodos quantitativos, como o de Bradford, comparando-se a amostra controle com a amostra tratada, assumindo-se como ausência de degradação a quantidade de proteínas na amostra controle e calculando-se (de forma relativa) a taxa de degradação com base na quantificação de proteínas na amostra tratada.
Marcadores Moleculares – Metabolismo Hormonal			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
Ácido abscísico (ABA)	ABA é o principal hormônio na integração dos sinais ambientais e da fisiologia adaptativa, controlando a expressão de fatores de transcrição importantes nas vias de sinalização ABA-dependentes e o fechamento estomático.	Aumento na concentração de ABA	Quantificação espectrofotométrica baseada em kits de imunodiagnóstico (ELISA)
Marcadores Moleculares – Metabolismo Oxidativo			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
Espécies reativas de oxigênio (ROS)	ROS são produtos de processos metabólicos (balanceados ou desbalanceados), como a fotossíntese e a respiração celular, ou produtos da atividade de peroxidases e oxidases em resposta a estresses. Podem ocorrer em cloroplastos, mitocôndrias, retículo endoplasmático (RE) e peroxissomos.	Aumento como consequência da sobrecarga dos fotossistemas e diminuição da condutância estomática	O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é a forma mais comumente analisada de ROS e reflete o panorama global do estado redox das células. Na avaliação qualitativa, o H_2O_2 reage com a diaminobenzamida (DAB) ou o azul tritrotetrazólico (NBT) formando um precipitado marrom e azul, respectivamente, nas folhas. Quantitativamente, o peróxido em meio ácido reage com o iodeto de potássio sendo degradado a O_2 e H_2O . Essa degradação leva a diminuição da absorvância da reação a 390 nm e sua quantificação pode ser realizada baseada em uma curva padrão.

Tabela continua na próxima página

Tabela 2. Marcadores celulares, moleculares, fisiológicos e genes na resposta adaptativa de plantas aos estresses abióticos (Continuação da tabela)

Marcadores Moleculares – Metabolismo Oxidativo			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
Atividade enzimática (CAT, SOD, APX e GPX)	Em resposta ao acúmulo de ROS, as plantas aumentam a transcrição e a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APX) e a glutatona-peroxidase (GPX). A SOD converte radicais superóxido em H ₂ O ₂ nos cloroplastos. Por sua vez, as enzimas CAT e APX convertem os radicais hidroxil em H ₂ O e O ₂ tanto nos cloroplastos como no citosol, bem como a GPX.	Aumento na atividade enzimática	Ensaio de atividade enzimática baseado na degradação de ROS promovida pela enzima e seu efeito sobre a reação enzimática.
Osmólitos nitrogenados	Os osmólitos nitrogenados, representados em sua maioria por aminoácidos ou derivados, desempenham um papel importante na resposta aos estresses abióticos conferindo tolerância a perda de água e acúmulo de ROS, além de também atuarem como anticongelantes em casos de temperaturas extremas baixas.	Aumento na concentração de prolina, glicina, glicina-betaína e ácido γ -aminobutírico (GABA), além de poliaminas	A quantificação de prolina é a técnica mais amplamente utilizada para a quantificação de osmólitos nitrogenados. Ela baseia-se na reação da prolina em ácido sulfosalicílico com a ninidrina, formando um cromóforo de cor azulada, cuja leitura é feita em 520 nm e a concentração calculada com base na absorvância das amostras e coeficiente de extinção molar da prolina. Análises fracionadas de aminoácidos e outros derivados nitrogenados são conduzidas por cromatografia líquida de alta eficiência.
Açúcares solúveis	Os açúcares solúveis, graças a suas propriedades redutoras e sua alta camada de solvatação, são osmólitos sintetizados pelas plantas em resposta à seca e ao estresse osmótico. Quando em altas concentrações, são capazes de otimizar o potencial osmótico celular, melhorar o estado de hidratação e proteger as membranas lipídicas contra calor excessivo e congelamento.	Aumento na concentração de maltose, rafinose e trealose	Deteção baseada em reações óxido-redutoras. Para a deteção geral de açúcares solúveis é utilizado o método do DNS (ácido dinitrosalicílico), em que os açúcares redutores reagem com o DNS a quente se oxidando e formando um composto de cor amarronzada. A quantificação é feita por leitura espectrofotométrica a 540 nm e baseada em curva padrão de um monossacarídeo. Para quantificações de açúcares específicos, normalmente é aplicada a cromatografia líquida de alta eficiência.
Pigmentos – clorofila	A clorofila compreende um grupo de pigmentos porfirínicos fotossintéticos presentes nos cloroplastos que confere a cor esverdeada às folhas. As plantas apresentam clorofila <i>a</i> e <i>b</i> , que diferem uma da outra por um grupamento metil em vez de aldeído na posição 3 do anel tetrapirrol.	Diminuição do teor de clorofila em estresse	A quantificação de clorofilas é feita por espectrofotometria direta, em que os extratos alcoólicos das folhas são submetidos a leitura em 480 nm, 645 nm e 663 nm e as concentrações de clorofila calculadas por equações que relacionam a absorvância e o coeficiente de extinção molar desses pigmentos.

Tabela continua na próxima página

Tabela 2. Marcadores celulares, moleculares, fisiológicos e genes na resposta adaptativa de plantas aos estresses abióticos (Continuação da tabela)

Marcadores Moleculares – Metabolismo Oxidativo			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
Pigmentos - carotenoides	Os carotenoides são pigmentos de natureza lipídica, derivados dos terpenos. Devido a sua natureza conjugada, são excelentes anti-oxidantes e sua abundância está associada a maior tolerância aos efeitos deletérios do acúmulo de ROS.	Diminuição do teor de carotenoides devido à oxidação	Assim como a clorofila, são analisados por espectrofotometria direta.
Pigmentos - antocianinas	As antocianinas são pigmentos arroxeados derivados de flavonoides com função termoprotetora e antioxidante. São produzidas em resposta a luz excessiva e a privação de água.	Aumento do teor de antocianinas em resposta ao calor e seca	Extração em álcool-ácido clorídrico e quantificação por espectrofotometria com leituras em 529 nm e 650 nm.
Marcadores Fisiológicos			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
Condutância estomática	Os estômatos são a principal estrutura foliar envolvida no controle das trocas gasosas entre a planta e o ambiente. A resistência e a condutância estomática são medidas diretas da eficiência dessas trocas e reforçam os valores analisados para a taxa fotossintética e a transpiração, que devem ser menores em plantas submetidas a estresse hídrico e osmótico, por exemplo.	Diminuição da condutância estomática para minimizar as perdas de água por transpiração	Analisador de gás por infra-vermelho (IRGA, <i>infra-red gas analyzer</i>).
Fixação de CO ₂ Fotossíntese + Transpiração	O consumo de CO ₂ tem uma relação direta com a taxa fotossintética das plantas, que é diminuída no estresse abiótico em função da redução da área foliar e dos mecanismos de fechamento e reclusão estomáticos, como efeito colateral da diminuição da perda de água por transpiração e da otimização do uso da água no interior das células.	Diminuição da taxa fotossintética e da taxa de transpiração ¹	Analisador de gás por infra-vermelho (IRGA, <i>infra-red gas analyzer</i>).
(1) Diminuição da taxa fotossintética em menor razão, comparada com a diminuição da taxa de transpiração, e associada à diminuição da condutância estomática, indica a existência de mecanismos adaptativos que otimizam o uso da água e diminuem sua perda, sendo características frequentemente associadas à melhor performance das plantas em situação de estresse hídrico.			

Tabela continua na próxima página

Tabela 2. Marcadores celulares, moleculares, fisiológicos e genes na resposta adaptativa de plantas aos estresses abióticos (Continuação da tabela)

Marcadores Fisiológicos			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
Teor relativo de água	O teor relativo de água refere-se ao conteúdo de água das células comparado em dois pontos distintos. Geralmente é um indicativo da eficiência do uso de água em estudos de estresse osmótico, como seca e estresse salino, uma vez que maior teor relativo de água indica uma menor transpiração, com consequente melhoria na performance oxidativa das células e menor murcha das folhas.	Diminuição do teor relativo de água	A determinação do teor relativo de água é feita em situação comparativa, geralmente em plantas irrigadas e posteriormente submetidas ao estresse hídrico. A planta tem sua massa fresca determinada e é submetida a secagem para determinação da massa seca e, consequentemente, do teor de água. O teor determinado para a planta irrigada é considerado integral (TRA = 1) e, após submetida a estresse, expresso em função da perda de água promovida pelo estresse.
Fluxo iônico por extravasamento de eletrólitos	Quando uma planta é submetida a um tipo de estresse abiótico, normalmente, instaura-se um fluxo de íons através da membrana plasmática em resposta ao estresse. Entretanto, com o acúmulo de EROS e os efeitos deletérios dos estresses sobre a membrana plasmática, pode haver extravasamento de eletrólitos causados por ruptura das membranas. Portanto, o extravasamento de eletrólitos é um parâmetro que infere sobre a integridade das membranas.	Aumento do extravasamento de eletrólitos em estresse	Medida comparativa em plantas controle e plantas estressadas ou ao longo do tempo realizadas com um condutivímetro.
Marcadores Gênicos			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
<i>CAT</i>	Catalase/Enzima anti-oxidante	Aumenta	Análise de expressão gênica por qRT-PCR e cálculo da expressão por método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$.
<i>SOD</i>	Superóxido dismutase/Enzima anti-oxidante	Aumenta	
<i>APX</i>	Ascorbato peroxidase/Enzima anti-oxidante	Aumenta	
<i>GPX</i>	Peroxidase da glutatona/Enzima anti-oxidante	Aumenta	
<i>AREB-1</i>	ABA responsive element-binding/Fator de transcrição	Aumenta	
<i>DREB1/2A</i>	Dehydration responsive elemento-binding/Fator de transcrição	Aumenta	
<i>RD29A</i>	Responsive to desiccation 29A/Fator de transcrição	Aumenta	
<i>RD29B</i>	Responsive to desiccation 29B/Fator de transcrição	Aumenta	

Tabela continua na próxima página

Tabela 2. Marcadores celulares, moleculares, fisiológicos e genes na resposta adaptativa de plantas aos estresses abióticos (Continuação da tabela)

Marcadores Gênicos			
Marcador	Papel Biológico	Variações	Análise
<i>RD20</i>	<i>Responsive to desiccation 20</i> /Fator de transcrição	Aumenta	Análise de expressão gênica por qRT-PCR e cálculo da expressão por método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$.
<i>RAB18</i>	<i>Ras-related preotein 18</i> /LEA protein	Aumenta	
<i>PAL</i>	<i>Phenylalanine ammonia liase</i> /Enzima da via dos fenil-propanóides e síntese de compostos fenólicos	Aumenta	
<i>NRP-1/2</i>	<i>N-rich protein 1 and 2</i> /Fator de transcrição	Aumenta	
<i>VPE</i>	<i>Vacuolar processing enzyme</i> /Enzima do tipo caspase-like em processos de morte celular	Aumenta	
<i>CNX</i>	<i>Calnexin</i> /Proteína cálcio-dependente	Aumenta	
<i>GLK1</i>	<i>Golden like-1 protein</i> /Manutenção dos cloroplastos	Diminui	
<i>NYC1</i>	<i>Non-yellow Coloring 1</i> /Degradação de clorofila	Aumenta	
<i>PaO</i>	<i>Pheophorbide oxidase</i> /Degradação de clorofila	Aumenta	
<i>BFN1</i>	<i>Bifunctional nucleasse 1</i> /Degradação de ác. nucleicos e proteínas	Aumenta	
<i>SINA1</i>	<i>Seven in Absentia</i> /Protease	Aumenta	

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKPINAR, B. ANI; AVSAR, BIHTER; LUCAS, STUART J.; BUDAK, HIKMET. Plant abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*, v. 7, n. 11, p. 1450–1455, 2012.

BAO, YAN & HOWELL, STEPHEN H. The Unfolded Protein Response Supports Plant Development and Defense as well as Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 344, 2017.

BARAJAS-LOPEZ, JUAN DE DIOS; MORENO, JOSE RAMON; GAMEZ-ARJONA, FRANCISCO M.; PARDO, JOSE M.; PUNKKINEN, MATLEENA; ZHU, JIAN-KANG; QUINTERO, FRANCISCO J.; FUJII, HIROAKI. Upstream kinases of plant SnRKs are involved in salt stress tolerance. *The Plant Journal*, v. 93, n. 1, p. 107–118, 2018.

BUCHANAN, BOB B.; GRUISSEM, WILHELM; JONES, RUSSELL L. *Biochemistry & molecular biology of plants*. 2nd. ed. Nova Jersey, EUA: Wiley, 2015.

CHOUDHURY, FEROZA K.; RIVERO, ROSA M.; BLUMWALD, EDUARDO; MITTLER, RON. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, v. 90, n. 5, p. 856–867, 2017.

CRAMER, GRANT R.; URANO, KAORU; DELROT, SERGE; PEZZOTTI, MARIO; SHINOZAKI, KAZUO. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, v. 11, n. 1, p. 163, 2011.

EL-ESAWI, MOHAMED A. Introductory Chapter: Hormonal Regulation in Plant Development and Stress Tolerance. In: *Phytohormones - Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses*. InTech, 2017.

FUJITA, YASUNARI; YOSHIDA, TAKUYA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, KAZUKO. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, v. 147, n. 1, p. 15–27, 2013.

GILL, SARVAJEET SINGH; ANJUM, NASER A.; GILL, RITU; TUTEJA, NARENDRA. Abiotic Stress Signaling in Plants-An Overview. In: *Abiotic Stress Response in Plants*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 1–12, 2016.

HE, MEI; HE, CHENG-QIANG; DING, NAI-ZHENG. Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, v. 9 p. 1771, 2018.

HIRAYAMA, TAKASHI & SHINOZAKI, KAZUO. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *Plant Journal*, v. 61, n. 6, p. 1041–1052, 2010.

HUANG, GUO-TAO; MA, SHI-LIANG; BAI, LI-PING; ZHANG, LI; MA, HUI; JIA, PING; LIU, JUN; ZHONG, MING; GUO, ZHI-FU. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*, v. 39, n. 2, p. 969–987, 2012.

HUBBARD, K. E.; NISHIMURA, N.; HITOMI, K.; GETZOFF, E. D.; SCHROEDER, J. I. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes & Development*, v. 24, n. 16, p. 1695–1708, 2010.

KHAN, MARYAM; JANNAT, AROOMA; MUNIR, FAIZA; FATIMA, NOSHEEN; AMIR, RABIA. Biochemical and Molecular Mechanisms of Abiotic Stress Tolerance. In: *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II*. Singapore: Springer Singapore, p. 187–230, 2020.

KRASENSKY, J. & JONAK, C.. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, n. 4, p. 1593–1608, 2012.

KU, YEE-SHAN; SINTAHA, MARIZ; CHEUNG, MING-YAN; LAM, HON-MING. Plant Hormone Signaling Crosstalks between Biotic and Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 10, p. 3206, 2018.

KURUSU, TAKAMITSU; KUCHITSU, KAZUYUKI; TADA, YUICHI. Plant signaling networks involving Ca²⁺ and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 427, 2015.

LAMERS, JASPER; VAN DER MEER, TOM; TESTERINK, CHRISTA. How Plants Sense and Respond to Stressful Environments. *Plant Physiology*, v. 182, n. 4, p. 1624–1635, 2020.

LICHTENTHALER, HARTMUT K. The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 851, n. 1 STRESS OF LIFE, p. 187–198, 1998.

LIU, XUE HUAN; LYU, YU SHU; YANG, WEIPING; YANG, ZHENG TING; LU, SUN JIE; LIU, JIAN XIANG. A membrane-associated NAC transcription factor OsNTL3 is involved in thermotolerance in rice. *Plant Biotechnology Journal*, v. 18, n. 5, p. 1317–1329, 2020.

LUAN, SHENG; KUDLA, JÖRG; RODRIGUEZ-CONCEPCION, MANUEL; YALOVSKY, SHAUL; GRUISSEM, WILHELM. Calmodulins and Calcineurin B-like Proteins. *The Plant Cell*, v. 14, n. suppl 1, p. S389–S400, 2002.

MAO, HUDE; WANG, HONGWEI; LIU, SHENGXUE; LI, ZHIGANG; YANG, XIAOHONG; YAN, JIANBING; LI, JIANSHEG; TRAN, LAM SON PHAN; QIN, FENG. A transposable element in a NAC gene is associated with drought tolerance in maize seedlings. *Nature Communications*, v. 6, p. 1–7, 2015.

QIN, FENG; SAKUMA, YOH; TRAN, LAM-SON PHAN; MARUYAMA, KYONOSHIN; KIDOKORO, SATOSHI; FUJITA, YASUNARI; FUJITA, MIKI; UMEZAWA, TAISHI; SAWANO, YORIKO; MIYAZONO, KEN-ICHI. Arabidopsis DREB2A-Interacting Proteins Function as RING E3 Ligases and Negatively Regulate Plant Drought Stress-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*, v. 20, n. 6, p. 1693–1707, 2008.

RABARA, ROEL C.; TRIPATHI, PRATEEK; RUSHTON, PAUL J. The potential of transcription factor-based genetic engineering in improving crop tolerance to drought. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, v. 18, n. 10, p. 601–614, 2014.

REGUERA, MARIA; PELEG, ZVI; BLUMWALD, EDUARDO. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1819, n. 2, p. 186–194, 2012.

ROYCHOUDHURY, ARYADEEP; PAUL, SAIKAT; BASU, SUPRATIM. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Reports*, v. 32, n. 7, p. 985–1006, 2013.

SADDHE, ANKUSH ASHOK; KUNDAN, KUMAR; PADMANABH, DWIVEDI. Mechanism of ABA Signaling in Response to Abiotic Stress in Plants. In: *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 173–195, 2017.

SADE, NIR; DEL MAR RUBIO-WILHELMI, MARÍA; UMNAJKITIKORN, KAMOLCHANOK; BLUMWALD, EDUARDO. Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, v. 69, n. 4, p. 845–853, 2018.

SAKUMA, YOH; MARUYAMA, KYONOSHIN; OSAKABE, YURIKO; QIN, FENG; SEKI, MOTOAKI; SHINOZAKI, KAZUO; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, KAZUKO. Functional Analysis of an Arabidopsis Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*, v. 18, n. 5, p. 1292–1309, 2006.

SHAHID, SHABBIR A.; ZAMAN, MOHAMMAD; HENG, LEE. Soil Salinity: Historical Perspectives and a World Overview of the Problem. In: *Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques*. Springer International Publishing, p. 43–53, 2018.

SHAO, HONGBO; WANG, HONGYAN; TANG, XIAOLI. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 902, 2015.

SHOU, HUIXIA; BORDALLO, PATRICIA; WANG, KAN. Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 399, p. 1013–1019, 2004.

STUBER, CHARLES W. Biochemical and Molecular Markers in Plant Breeding. In: *Plant Breeding Reviews*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., p. 37–61, 2010.

SUZUKI, NOBUHIRO. ROS as Key Players of Abiotic Stress Responses in Plants. In: *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*. Springer International Publishing, p. 57–82, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. S. *Plant Physiology and Development*. 6th. ed. Sinauer Associates, Incorporated, Publishers, 2015.

TOWNLEY, HELEN E.; KNIGHT, MARC R. Calmodulin as a potential negative regulator of arabidopsis COR gene expression. *Plant Physiology*, v. 128, n. 4, p. 1169–1172, 2002.

WANG, WANGXIA; VINOCUR, BASIA; ALTMAN, ARIE. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, v. 218, n. 1, p. 1–14, 2003.

WANG, YANYAN; ZHANG, YUJUAN; ZHOU, RONG; DOSSA, KOMIVI; YU, JINGYIN; LI, DONGHUA; LIU, AILI; MMADI, MARIE ALI; ZHANG, XIURONG; YOU, JUN. Identification and characterization of the bZIP transcription factor family and its expression in response to abiotic stresses in sesame. *PLOS ONE*, v. 13, n. 7, p. e0200850, 2018.

XIONG, LIMING; SCHUMAKER, KAREN S.; ZHU, JIAN-KANG. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell*, v. 14, n. suppl 1, p. S165–S183, 2002.

XU, ZHAO-SHI; NI, ZHI-YONG; LIU, LI; NIE, LI-NA; LI, LIAN-CHENG; CHEN, MING; MA, YOU-ZHI. Characterization of the TaAIDFa gene encoding a CRT/DRE-binding factor responsive to drought, high-salt, and cold stress in wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 280, n. 6, p. 497–508, 2008.

YADAV, SUMMY; MODI, PAYAL; DAVE, AKANKSHA; VIJAPURA, AKDASBANU; PATEL, DISHA; PATEL, MOHINI. Effect of Abiotic Stress on Crops. In: *Sustainable Crop Production*. IntechOpen, 2020.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, KAZUKO; SHINOZAKI, KAZUO. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 781–803, 2006.

YOO, JAE HYUK; PARK, CHAN YOUNG; KIM, JONG CHEOL; DO HEO, WON; CHEONG, MI SUN; PARK, HYEONG CHEOL; KIM, MIN CHUL; MOON, BYEONG CHEOL; CHOI, MAN SOO; KANG, YUN HWAN. Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 5, p. 3697–3706, 2005.

YOU, JUN & CHAN, ZHULONG. ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 1092 2015.

ZHANG, YU; LV, YANG; JAHAN, NOUSHIN; CHEN, GUANG; REN, DEYONG; GUO, LONGBIAO. Sensing of Abiotic Stress and Ionic Stress Responses in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 11, p. 3298, 2018.

ZHU, JIAN KANG. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, v. 167, n. 2, p. 313–324, 2016.

Capítulo 05

IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS SOBRE A DIVERSIFICAÇÃO DE BROMÉLIAS RESIDENTES EM *INSELBERGS* NA FLORESTA ATLÂNTICA

Yumi Sheu

Liliana Aparecida Ribeiro Martins

Thaís Lazarino Maciel da Costa

Taís Cristina Bastos Soares

1. INTRODUÇÃO

Um dos propósitos mais elementares da biogeografia é estudar os padrões de distribuição das espécies. Esses padrões podem ser observados em múltiplas escalas temporais em relação aos parâmetros geográficos e processos ecológicos que podem ter impulsionado ao padrão atual de distribuição dos mesmos (LOMOLINO, 2005). A Filogeografia é um ramo da biogeografia que estuda os princípios e os processos que governam a distribuição de espécies geneticamente relacionadas em uma escala espacial e temporal (AVISE, 2000). Os estudos filogeográficos utilizam, atualmente, uma abordagem multilocos que associa os dados de filogenia aos padrões de distribuição das espécies, a fim de reconstruir a história evolutiva de linhagens genealógicas no tempo e no espaço (AVISE, 2009; HICKERSON et al., 2010). Este tipo de estudo é importante, pois torna possível avaliar processos evolutivos que possam ter resultado na estruturação populacional das espécies estudadas (AVISE, 2009).

Inselbergs são considerados afloramentos rochosos abruptamente isolados principalmente granitóides e gnáissicos originados de elementos da paisagem do pré-crambiano sobre escudos continentais cristalinos (POREMBSKI & BARTHLOTT, 2000). Abrigam tipicamente vegetação rupícola incorporada dentro de uma paisagem composta de comunidades vegetais contrastantes, das quais espécies da família Bromeliaceae se destacam como elementos característicos dessas comunidades.

Estudos filogeográficos focados em espécies adaptadas a *inselbergs* forneceram apenas alguns *insights* sobre processos evolutivos que levaram a diversificação das linhagens e/ou espécies (PALMA-SILVA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2014) revelando alta diferenciação, forte estrutura genética com níveis diferenciados de diversidade genética, suportando a hipótese que *inselbergs* atuam como centro de endemismo e de diversidade genética.

Dessa forma, investigar as forças que dirigem os processos evolutivos e de estruturação populacional ao longo do tempo e obter estimativas de diversidade genética em populações naturais tornam-se fundamentais para endossar estratégias de conservação *in situ*. Nesse capítulo apresentamos uma revisão sobre os principais aspectos evolutivos sobre diversificação de bromélias em *inselbergs* na Floresta Atlântica, contextualizando informações básicas para um melhor entendimento e compreensão da complexa história evolutiva dessa família.

2. FLORESTA ATLÂNTICA E O FENÔMENO DA MEGADIVERSIDADE

O continente sul-americano abriga uma das regiões de maior megadiversidade do planeta, a Floresta Atlântica, a qual originalmente cobria uma área de 1.315.460 km² e, atualmente, está reduzida em aproximadamente 7 a 33% de sua área original (MYERS et al., 2000; RIBEIRO et al., 2009; REZENDE et al., 2018). Estende-se continuamente na porção leste do território brasileiro, incluindo ainda Misiones na Argentina e o leste do Paraguai (GALINDO-LEAL & CÂMARA 2005). Além disso, é circundada pela diagonal seca da América do Sul (composta pelas áreas abertas da Caatinga, Cerrado e Chaco) configurando uma ilha florestal isolada na porção leste do continente sul Americano (AB'SABER, 1977).

A biota da Floresta Atlântica engloba entre 1 a 8% de toda biodiversidade do planeta (SILVA & CASTELETI, 2005). O elevado número de espécies endêmicas e a diversidade de plantas vasculares indica que este domínio fitogeográfico figura dentre àqueles que apresentam as mais altas do mundo (MARTINELLI et al., 2008). Entre os gêneros de angiospermas, 159 são endêmicos da Floresta Atlântica e aproximadamente metade desses são monotípicos (STEHMANN et al., 2009). Ademais, alguns grupos de angiospermas apresentam grande representatividade neste domínio, como por exemplo a família Bromeliaceae (MARTINELLI et al., 2008; BFG, 2020).

A Floresta Atlântica é composta por diferentes formações florestais, tais como: Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Semidecidual, além de ecossistemas associados tais como as Formações Pioneiras (restingas), manguezais e os refúgios vegetacionais ou Campos de Altitudes (IBGE, 2012).

As diferentes fitofisionomias conferem ampla heterogeneidade, a qual é traduzida em uma alta biodiversidade (CNRBMA, 2020). É constituída por regiões arenosas ao nível do mar, assim como por áreas emersas em manchas de campos de altitude, sendo frequentemente encontrados acima de 2000 m (SAFFORD 1999; 2007).

No entanto, a despeito da conservação, esse domínio fitogeográfico tem sido drasticamente reduzido a fragmentos cada vez mais esparsos, uma vez que a pecuária e agricultura atingiram toda a extensão florestal (MARTINELLI et al., 2008; MITTERMEIER et al., 2011). O avanço antrópico sobre a área florestal ocorre conforme interesses econômicos e devido à expansão urbana, o que pode acarretar maior pressão sobre fitofisionomias específicas que se encontram nestas áreas. Por ser uma das florestas mais ameaçadas do mundo, a perda da biodiversidade pode trazer consequências diretas, tais como erosão genética, perda de ecossistemas, de populações e processos evolutivos fundamentais que fazem a manutenção da biodiversidade (GALINDO-LEAL & CÂMARA, 2005). Assim, é de suma importância a delimitação de áreas prioritárias para a conservação (MARTINELLI et al., 2008; MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2011).

A grande heterogeneidade observada pode ser explicada pelas variações dos gradientes latitudinal (de 5°S a 30°S) e altitudinal (ao nível do mar à cerca de 1700m) presentes (D'HORTA et al., 2011). Dessa forma, a heterogeneidade ambiental e o isolamento podem ter sido fatores preponderantes para a grande variedade de espécies endêmicas encontradas dentro do cenário de regiões megadiversas (MYERS et al., 2000).

O entendimento da megadiversidade na região tropical difere na eleição do mecanismo causador dos processos de especiação (COX & MOORE, 2010; PIANKA, 1966). Alguns autores defendem que a instabilidade dessa região (na qual incluem-se as Florestas tropicais pluviais) é a principal causa da megadiversidade, como por exemplo, a ocorrência de importantes eventos tectônicos (RIBEIRO,

2006; SAADI, 1993). Acredita-se, ainda, que constantes distúrbios locais nas comunidades e ecossistemas (CONNELL, 1978) possam ter levado a separação e diferenciação das linhagens e do nicho ecológico, resultando em especiação. Por outro lado, outros autores argumentam que a estabilidade da região tropical associada a um clima tropical característico com regimes de precipitação anual altos e poucas variações sazonais influenciou no surgimento de regiões megadiversas (D’HORTA et al., 2011). Um dos fatores preponderantes para este cenário pode ser devido às flutuações climáticas no Quaternário, no qual as regiões tropicais podem ter sofrido perturbações em menores escalas quando comparadas às regiões temperadas e menores variações de temperatura e precipitação anuais (MONTAGNINI & JORDAN, 2005), ou seja, tanto a flora quanto a fauna teriam mais tempo para se diversificarem.

Por serem regiões geologicamente mais antigas, as espécies tropicais foram acumulando pequenas adaptações que levaram aos inúmeros processos de especiação após determinado período (PIANKA, 1966) resultando no crescimento das taxas de mutação e seleção, provocando o surgimento de novas espécies de forma mais acelerada.

Em suma, o fenômeno da megadiversidade nas florestas tropicais impulsionou a criação de inúmeras hipóteses que tentam explicar a diversificação e riqueza das linhagens, seja relacionada à estabilidade ou à instabilidade. No entanto, Huggett (2004) explica que apenas um único processo não é capaz de explicar a origem da megadiversidade dos trópicos, pois os organismos podem responder de forma diferenciada. Para tanto, abordagens utilizadas em ecologia evolutiva e biogeografia molecular podem auxiliar na compreensão dos diferentes processos de diversificação responsáveis por gerar variações de riqueza de espécies em múltiplas escalas espaciais e temporais (RABOSKY, 2013).

3. DIVERSIFICAÇÃO DA BIOTA POR HIPÓTESES BIOGEOGRÁFICAS

A elevada diversidade biológica no contexto da biogeografia, observada em regiões tropicais, é um fator atuante para investigações sobre quais os processos históricos e evolutivos podem estar envolvidos em originar e manter a diversidade

da biota. Estudos filogeográficos, paleoclimáticos e geológicos abarcam múltiplas metodologias que, até então, não possibilitavam quantificar de maneira satisfatória e robusta essa diversidade. Existem diferentes hipóteses debatidas na literatura, por exemplo, barreiras riverinas, gradientes ecológicos e de refúgios pleistocênicos, que são capazes de explicar os possíveis processos responsáveis por gerar padrões de diversidade vistos atualmente. Porém, destaca-se ainda, que a diversificação das espécies no Neotrópico não pode ser explicada por apenas um único modelo de vicariância ou de mudanças ambientais (HOORN et al., 2010). E a biodiversidade da Floresta Atlântica parece ser moldada em uma história complexa envolvendo não somente uma hipótese de diversificação (CARNAVAL et al., 2009; D' HORTA et al., 2011). Todas as hipóteses sugeridas foram revisadas dentro de um contexto coalescente por Leite & Rogers (2013), onde estes sugerem novas perspectivas filogenéticas, através de padrões genéticos para a análise das hipóteses de diversificação.

3.1. Barreiras riverinas

Uma hipótese bastante conhecida é a “barreiras de rios”, proposta inicialmente por Wallace (1852), sugerindo que a geração da diversidade das espécies ocorreu após surgimento dos grandes rios como barreiras vicariantes (barreiras geográficas primárias) durante o Mioceno tardio. Muitos estudos têm confirmado essa hipótese para uma gama de grupos taxonômicos, a exemplo da diversificação de primatas do gênero *Callithrix* (ROOSMALEN et al., 1998) e *Saguinus* (PERES et al., 1996), além de aves de diversas famílias (CLUTTON-BROCK, 1992; HAFFER, 1992; RIBAS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; FERNANDES et al., 2014). Ribas et al. (2012), revelaram através de modelos biogeográficos e datação molecular a influência do surgimento dos grandes rios Amazônicos na especiação no gênero de aves *Psophia*, destacando a importância de estimativas de tempos de divergência genética para estudos que envolvem biogeografia e especiação. Além disso, morfoestruturas como cadeias montanhosas (CHAPMAN, 1917; KATTAN et al., 2016) podem atuar também como barreiras primárias, impedido o fluxo gênico entre as populações, permitindo a diferenciação e, conseqüentemente, diversificação da biota (PATTON et al., 1994; CABANNE et al., 2008).

Dentro do contexto da Floresta Atlântica, foram verificadas evidências de contribuição dos rios atuando como barreiras ao fluxo gênico entre linhagens geneticamente diferentes, a exemplo do rio Doce (MARTINS, 2011), o rio São Francisco (CABANNE et al., 2008), o rio Paranapanema (PIRES et al., 2011) e o rio Jequitinhonha (BATALHA-FILHO, 2012). Ribeiro (2006), utilizou análises biogeográficas e inferiu uma datação mais antiga para o rio Doce, em relação às divergências encontradas, sendo um possível caso de barreira secundária e, ainda, é considerado um local de quebra genética em diversos organismos que ocorrem do norte ao sul das margens (COSTA, 2003, FOUQUET et al., 2012). Ademais, as regiões norte e sul diferenciam quanto a sua composição florísticas em relação a táxons restritos a cada margem oposta (CARNAVAL et al., 2014).

3.2. Gradientes ecológicos

A hipótese de gradientes ecológicos propõe que espécies teriam se diferenciado ao longo de mudanças ambientais, em um gradiente ecológico na qual promove seleção divergente, mesmo na presença de fluxo gênico (ENDLER, 1977).

Segundo essa hipótese, as áreas de transição ecológica seriam pontos de encontro entre táxons irmãos ou outros grupos genéticos (LARA et al., 2005). Apesar de, nesse contexto, não haver isolamento físico (vicariância) ao fluxo gênico, as populações teriam se adaptado às características seletivas de um ambiente razoavelmente uniforme, que varia em clina, levando à especiação parapátrica (ENDLER, 1982).

3.3. Refúgios pleistocênicos

Hipóteses como a dos refúgios Pleistocênicos proposta por Haffer (1969) implicam que as espécies se diversificaram por especiação alopátrica, devido a sucessivos ciclos de expansão e contração vegetacional em resposta aos ciclos climáticos glaciais durante o Pleistoceno, nos quais as savanas Sul-Americanas teriam atingido sua extensão máxima durante o Último Máximo Glacial (UMG), com conexões entre blocos savânicos localizados ao norte e ao sul da Amazônia (WEBB, 1991).

Essencialmente, a floresta se contraiu em fragmentos (refúgios), em períodos muito secos e frios do UMG, ocasionando uma redução e a fragmentação das populações das espécies associadas com a vegetação por isolamento genético. Contrariamente, as savanas se expandiam nesse mesmo período. Já no período Último Máximo Interglacial (UMI), quando o clima era mais úmido, as florestas se expandiam através de um contato secundário entre as populações. Além disso, Carnaval & Moritz (2008), reconhecem regiões de alta adequabilidade (a região norte, ao norte do Rio São Francisco e a região central, entre os Rios São Francisco e o Doce), ou seja, as florestas mantiveram-se úmidas e estáveis, constituindo-se refúgios florestais no UMI. Porém, muito se tem debatido sobre a validação dessa teoria, pois uma série de trabalhos (COLINVAUX et al., 2000; MAYLE et al., 2004; WERNECK et al., 2012) não indicam que o UGM foi caracterizado por ampla distribuição de savanas.

4. INSELBERGS: ASPECTOS GERAIS E EVOLUTIVOS

Os *inselbergs* são definidos como afloramentos rochosos graníticos ou gnáissico, isolados, originados de elementos da paisagem do pré-crambiano sobre escudos continentais cristalinos (POREMBSKI et al., 2010). Estas formações rochosas destacam-se pela heterogeneidade vegetal e estrutural que apresentam na Floresta Atlântica. Apresentam condições ambientais extremas, como altas temperaturas, solos pouco desenvolvidos ou ausentes e baixa retenção de água e exposição a ventos fortes (POREMBSKI & BARTHLOTT, 2000; de PAULA et al., 2016; COUTO et al., 2017). Esses filtros ambientais condicionaram a formação de uma flora rica e endêmica, muito distinta da vegetação circundante com predominância de espécies xéricas (POREMBSKI, 2007). Por causa de sua natureza geográfica disjunta, os *inselbergs* são frequentemente comparados às ilhas oceânicas, já que a maioria deles exibe um forte isolamento ecológico marcado por área circundante (POREMBSKI et al., 2000; BURKE, 2003).

De acordo com Safford & Martinelli (2000), os *inselbergs* englobam toda a costa leste do Brasil, inseridos desde o semiárido nordestino até os altiplanos nebulares do Rio Grande do Sul. Muito embora esses afloramentos em sua maioria graníticos sejam comuns nas paisagens brasileiras, estudos acerca da

flora e seus aspectos históricos são ainda incipientes diante de sua importância (PALMA-SILVA et al., 2011; HMELJEVSKI et al., 2017; de PAULA et al., 2016). Desta forma, investigações sobre a história evolutiva, sistemática e ecologia são fundamentais para auxiliar no entendimento da diversificação frente a respostas a flutuações climáticas pretéritas.

No território brasileiro, a maior concentração de *inselbergs* está na região nordeste, no domínio da Caatinga (AB'SÁBER, 1967), ainda que exista uma grande concentração desses afloramentos rochosos contemplada dentro da Mata Atlântica, na região sudeste, principalmente nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (de PAULA et al., 2016). A região sudeste, no entanto, é considerada um dos três *hotspots* mundiais de diversidade de plantas em *inselberg*, juntamente com Madagascar e sudoeste da Austrália (POREMBSKI, 2007).

A grande maioria dos *inselbergs* que emergem no sudeste do Brasil, localizam-se entre os Estados do Rio de Janeiro (RJ), Espírito Santo (ES), em partes do sul da Bahia, sudeste de Minas Gerais (MG) e em algumas regiões do estado de São Paulo (SP) (de PAULA et al., 2020). O conjunto de características únicas, associados a uma biota dinâmica e variável resultou nas grandes diferenças observadas nos *inselbergs* do sudeste brasileiro (SAFFORD & MARTINELLI, 2000). Essa região central compreende uma fitogeografia específica da Floresta Atlântica e, recentemente, baseada na flora amplamente diversificada da família Bromeliaceae foi denominada como “*Sugar Loaf Land*” (de PAULA et al., 2016; 2020). Para estes *inselbergs*, foram listadas registradas 548 espécies de plantas vasculares, atribuídas a 69 famílias e 212 gêneros, com predomínio das famílias Bromeliaceae, Orchidaceae e Asteraceae (de PAULA et al., 2020). Entre as Bromeliaceae, os gêneros *Alcantarea*, *Orthophytum*, *Pitcairnia*, *Stigmatodon* e *Tillandsia* dominam a paisagem de *inselbergs* no Brasil (de PAULA et al., 2016; 2020).

Entre os levantamentos florísticos realizados por Porembski & Barthlott (2000), foram contabilizadas 57 famílias e 3.500 espécies de angiospermas nos *inselbergs*. Destas famílias, destacam-se pelas características epífitas e de adaptação, Orchidaceae e Bromeliaceae, sendo essa última contendo gêneros (*Alcantarea*, *Encholirium*, *Orthophytum*, *Pitcairnia*, *Tillandsia* e *Vriesea*) que dominam a paisagem de *inselbergs* no Brasil (de PAULA et al., 2016).

Algumas investigações sobre a história evolutiva de algumas espécies de bromélias demonstraram um reduzido fluxo gênico intraespecífico entre *inselbergs*, caracterizando-as como ilhas e elevado grau de isolamento ecológico (BARBARÁ et al., 2007; PALMA-SILVA et al., 2011; HMELJEVSKI et al., 2017; MOTA et al., 2020). Sabe-se que a interrupção ao fluxo gênico está associada, entre outros fatores, ao tamanho de área habitada por espécie em comparação com a distância de migração dos indivíduos, promovendo um isolamento por distância ou geográfico (WRIGHT, 1943). O modelo *stepping stone* (isolamento por distância), considera que o grau de isolamento pode interferir de maneira significativa na diferenciação genética, uma vez que populações conferem uma redução gradual na similaridade genética devido ao aumento da distância geográfica e restrição da dispersão (KIMURA & WEISS, 1964; HELLBERG et al., 2002). Dessa forma, as estimativas de fluxo gênico para populações sofrendo processos de *stepping stone*, serão altas em populações mais próximas e reduzidas nas mais distantes (HELLBERG et al., 2002).

O endemismo, registrado nos *inselbergs*, reflete uma evolução mais antiga e longa, com evidências paleobotânicas, sugerindo que afloramentos rochosos cobriram os cumes das montanhas do sudeste do Brasil desde o Pleistoceno (BEHLING, 1997; SAFFORD, 1999). Alguns autores também defendem que *inselbergs* podem ter atuado como refúgio para espécies xerófilas ou adaptadas ao frio durante ciclos glaciais, no Pleistoceno do Quaternário (SPEZIALE & EZCURRA, 2012; SCARANO, 2002). Quando um clima mais seco favoreceu a expansão das espécies adaptadas a tal condição no leste do Brasil (BEHLING, 2002; LEDRU et al., 2007; CARNAVAL & MORITZ, 2008). Por outro lado, durante os períodos interglaciais, no Pleistoceno do Quaternário, ocorreram expansões das florestas úmidas e retração da vegetação xérica, que permaneceu em topos de morros de elevadas altitudes, onde as condições edafoclimáticas não eram propícias para o desenvolvimento de fisionomias florestais, formando os campos de altitude e os chamados *inselbergs* (BEHLING, 2002).

Safford & Martinelli (2000) listam quatro razões que podem refletir no grande número de espécies registradas nos *inselbergs* do Brasil: 1) sucessivos ciclos de expansão e contração vegetacional, e conseqüentemente a sua flora rupícola, em resposta a flutuações climáticas glaciais durante o Pleistoceno, no Quaternário, que

favoreceu a diversificação por especiação alopátrica. Somado a isso, as savanas Sul-Americanas teriam atingido sua extensão máxima durante o Último Máximo Glacial (UMG), com conexões entre blocos savânicos localizados ao norte e ao sul da Amazônia; 2) a variação do gradiente altitudinal do Sudeste Brasileiro levando a uma heterogeneidade ambiental entre *inselbergs* próximos, cujas diferenças únicas pode acarretar divergência genética dentro de espécies; 3) prevalência das famílias Bromeliaceae e Velloziaceae, as quais são formadas em parte por táxons capazes de alterar facultativamente de habitats epífitos para rupícolas e saxícolas; e por fim 4) a predominância de encostas estéreis, favorecendo assim, uma multiplicidade de locais para colonização e evolução local.

5. A FAMÍLIA BROMELIACEAE

Dentre as famílias de plantas com grande representatividade nos *inselbergs*, destaca-se a Bromeliaceae (de PAULA et al., 2016; 2020; FRAGA et al., 2019; COUTO et al., 2017). Essa família configura entre as dez famílias de angiospermas com maior riqueza de táxons para a flora brasileira (MARTINELLI et al., 2008; FRAGA et al., 2019; BFG 2020), abrigando aproximadamente 77 gêneros e 3630 espécies (GOUDA, BUTCHER & GOUDA, continuamente atualizado) distribuídas quase que exclusivamente no Neotrópico (SMITH & DOWNS 1974; GIVNISH et al., 2011). São reconhecidos para a família três grandes centros de diversidade: a Floresta Atlântica Brasileira; as encostas andinas do Peru, Colômbia e Equador; México e América Central (SMITH & DOWNS, 1974; ZIZKA et al., 2009). A única exceção ao padrão de distribuição exclusivamente americana é a espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr, localizada na região da costa da Guiné, na África Ocidental (BEZING, 2000; COSTA, 2002; BFG, 2020).

Os representantes de Bromeliaceae apresentam uma plasticidade fenotípica das mais variadas formas, desenvolvendo-se bem nos mais diferentes ambientes, e em quase todos os ecossistemas americanos. Isso engloba desde áreas ao nível do mar até locais com grandes altitudes (com cerca de 4.000 m), regiões com temperaturas elevadas e lugares com a temperatura próxima de zero, como os cumes das serras (SMITH & DOWNS, 1974; 1979). Por exemplo, as bromélias xeromórficas do gênero *Tillandsia* detêm características particulares resistentes

a seca, tais como, densa camada de tricomas peltados nas folhas (MALES & GRIFFITHS, 2017).

Estima-se que cerca de 50% das espécies e 73% dos gêneros de bromélias ocorram em todo o território brasileiro (BFG, 2020) englobando diferentes domínios fitogeográficos como a Caatinga, a Restinga, a Floresta Amazônica, a Floresta Atlântica, o Cerrado e até os Campos Rupestres (LEME, 1993; BFG, 2020). Somente no domínio da Mata Atlântica, são registradas 943 espécies de bromélias, distribuídas em 35 gêneros (BFG, 2020).

Com o avanço do processo de extrativismo ilegal para fins comerciais, queimadas, exploração de rochas ornamentais, dentre outros, têm contribuído para a destruição da vegetação natural desses ambientes únicos (COFFANI-NUNES, 2002; MARTINELLI et al., 2008; FRAGA et al., 2019). Somado a isso, em diversas regiões do Brasil, esses afloramentos rochosos não são considerados áreas prioritárias para conservação e não possui legislação específica que garantam legalmente sua preservação. Além disso, com a promulgação do novo Código Florestal (Lei 12.651 de 25 de maio de 2012) corre-se o risco de uma redução ainda maior do tamanho das populações naturais sendo sujeitas à erosão genética. Dessa forma, investigar as forças que dirigem os processos evolutivos e de estruturação populacional ao longo do tempo e obter estimativas de diversidade genética em populações naturais tornam-se fundamentais para endossar estratégias de conservação *in situ*.

Fraga et al. (2019), identificaram o Espírito Santo como o segundo maior estado em riqueza de espécies e endemismos para a família na Floresta Atlântica, e listaram a ocorrência de 323 espécies neste domínio fitogeográfico, sendo 143 exclusivas desta formação. Para a região Sul do Espírito Santo, novos táxons vêm sendo descritos tais como *Pitcairnia azouryi* Martinelli & Forzza registrada para o município de Cachoeiro de Itapemirim (MARTINELLI & FORZZA 2006), *Pitcairnia abyssicola* Leme & L. Kollmann, *Neoregelia dayvidiana* Leme & A. P. Fontana e *Vriesea mimosoensis* D.R. Couto, Kessous & A.F. Costa, descritas para a região de Pedra dos Pontões, no município de Mimoso do Sul (LEME et al., 2009; COUTO et al., 2020); *Alcantarea patriae* Versieux & Wand. (VERSIEUX & WANDERLEY, 2007) para o município de Jerônimo Monteiro; *Nidularium alegreense* Leme & Kollmann, para o município de Alegre (LEME et al., 2010)

e *Neoregelia dactyloflammans* Leme & L. Kollmann, para a região de Muqui (LEME & KOLLMANN, 2011).

Apesar da grande diversidade encontrada no estado do Espírito Santo, Fraga et al. (2019) apontaram Bromeliaceae como a segunda família com maior número de táxons ameaçados no estado. A expansão urbana é um dos fatores que mais exerce pressão sobre as áreas cobertas por vegetação, levando à degradação das florestas e à perda de habitats, resultando em remanescentes florestais fragmentados. Os processos de migração e colonização de novas áreas essenciais para a manutenção das populações em longo prazo são também prejudicados, podendo acarretar alterações nas mudanças na composição e abundância de espécies, ou mesmo à perda de processos naturais das comunidades (TABARELLI et al., 2005).

Sob o ponto de vista ecológico, as Bromeliaceae apresentam elevado grau de importância nos ecossistemas, muitas são espécies - chave, auxiliando no fornecimento de néctar floral, água acumulada (em folhas servindo como tanques de captação) e abrigo para insetos associados, pequenos mamíferos, anfíbios e aves (BENZING, 2000). Seus complexos sistemas contribuem para a manutenção da estabilidade ecossistêmica de uma floresta, já que apresentam altos níveis de especialização pelo efeito das adaptações às condições climáticas e oligotróficas (ARANDA-PRES & RODRIGUEZ, 2006). Algumas espécies também servem como bioindicadores, auxiliando no manejo e conservação de muitas espécies raras ou ameaçadas de extinção (SIQUEIRA-FILHO, 2003). Os tanques das bromélias funcionam também como um micro ecossistema próprio, onde habitam microrganismos e artrópodes por vezes endêmicos destes locais (JABIOL et al., 2009), exemplos de vários gêneros (exemplo *Neoregelia*) da subfamília Bromelioideae.

Destacam-se sobre aspectos econômicos, como por exemplo, o abacaxi *Ananas comosus* (L.) Merrill, único representante da família com cultivo em larga escala e muito utilizado na fruticultura, podendo ser consumida na forma de sucos, doces e *in natura* (CARLIER et al., 2012). No nordeste brasileiro, o “caroá” (*Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez), espécie endêmica da Caatinga, é fonte de emprego e renda para diversas famílias nordestinas, com fabricação artesanal de chapéus, bolsas, entre outros produtos (SILVEIRA et al., 2009). Ademais, as espécies do gênero *Bromelia* são utilizadas na extração da enzima “bromelina”,

com atividade depurativa e digestiva, empregada na indústria alimentícia (clarificação de cervejas, fabricação de queijos, amaciamento de carnes, preparo de alimentos infantis e dietéticos, entre outros), e na medicinal tradicional possuindo propriedades anti-helmíntica, anti-inflamatória e anticancerígena, para a produção de fármacos e apresentam uma vasta revisão sobre as diversas espécies de Bromeliaceae com uso etnobotânico e farmacêutico (BENZING, 2000; MANETTI et al., 2009).

No entanto, a utilização mais comum é a aplicação de bromélias em projetos paisagísticos, devido à sua grande beleza, resistência e praticidade no manuseio sendo amplamente usada na decoração de jardins, interiores e em floriculturas como plantas ornamentais. O mercado brasileiro de bromélias movimenta cerca de 2,2 milhões de plantas por ano, porém isso ainda é muito pouco quando comparado ao mercado norte americano (12 milhões de plantas/ano) e europeu (22 milhões de plantas/ano) (RODRIGUEZ, 2012). Destacam-se alguns gêneros com grande potencial florístico: *Guzmania*, *Neoregelia*, *Vriesea* e *Tillandsia* (RODRIGUEZ, 2012) que devido a sua aparência exclusiva, são responsáveis por um volume comercial expressivo para colecionadores e comerciantes.

Visto à significativa redução e fragmentação de seu habitat e ao extrativismo ilegal, as populações naturais de bromeliaceas encontram-se sujeitas à erosão genética. Esta realidade exalta a demanda por estudos que avaliem a diversidade genética das mesmas. Tais estudos envolvem medidas de diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional, buscando representar matematicamente as mudanças nas variações genéticas de populações ao longo do tempo evolutivo por meio da detecção diversos eventos como mutação, migração, seleção natural e deriva genética randômica (MILLSTEIN & SKIPPER, 2007). Assim, o conhecimento da estrutura e distribuição das variantes genéticas em populações naturais de plantas é uma etapa fundamental para a realização de programas conservacionistas (CAVALLARI et al., 2006; BARBARÁ et al., 2007), indicando áreas e populações de maior ou menor importância para a preservação dos táxons em questão, auxiliando na avaliação do risco de extinção e manejo de recursos genéticos, essencial para a criação de formas sustentáveis de exploração econômica. (DOMINGUES et al., 2011).

5.1. Sistemática e evolução de Bromeliaceae

Tradicionalmente, a família foi dividida em três subfamílias: Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae (SMITH & DOWNS 1974; 1979). No entanto, Givinish et al. (2011) utilizando oito marcadores cloroplastidiais confirmaram filogeneticamente uma nova classificação e o reconhecimento dos antigos grupos parafiléticos de Pitcairnioideae em novas subfamílias, totalizando oito subfamílias: Brochinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Bromelioideae, Puyoideae e Pitcairnioideae. Ademais, a diversificação mais recente das linhagens modernas de Bromeliaceae se configurou a 19 Milhões de anos (Ma) no Escudo das Guianas ao norte da América do Sul (GIVNISH et al., 2007; GIVNISH et al., 2011).

Evolutivamente, Bromelioideae é a que se divergiu mais recentemente entre as linhagens de Bromeliaceae e freqüentemente aparece como monofilética e irmã de Puyoideae (SCHUTLE et al., 2005; GIVNISH et al., 2007; 2011; EVANS et al., 2015). A história evolutiva dessa subfamília é representada pela combinação de um hábito epifítico, formação de um tanque através da disposição das folhas servindo como habitat para muitos organismos, a capacidade dos tricomas foliares de absorver água e nutrientes, a polinização pelas aves, o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), e uma recente diversificação na região Neotropical, principalmente em formações florestais ao longo da costa leste do Brasil (BENZING, 2000; CRAYN et al., 2004; GIVNISH et al., 2011). No entanto, é possível verificar através de estudos moleculares (TERRY et al., 1997; CRAYN et al., 2004; GIVNISH et al., 2007; SCHULTER et al., 2005) que as relações inter e infragenéricas ainda são problemáticas.

Ademais, destaca-se Pitcairnioideae, que abriga gêneros como *Dyckia* Schult. & Schult.f. (ca. 168 spp.), *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (29 spp.), *Fosterella* L.B.Sm. (31 spp.), *Deuterocohnia* Mez (incluindo *Abromeitiella*, (27 spp.) e *Pitcairnia* L'Hér. (~405 spp.) (GOUDA, BUTCHER & GOUDA, continuamente atualizado). A subfamília Pitcairnioideae se distingue das demais subfamílias por apresentar morfologia com folhas com margens quase sempre espinescentes, ovário súpero ou semi-ífero, frutos do tipo cápsulas deiscentes e as sementes apresentam geralmente apêndices não plumosos (SMITH & DOWNS, 1974).

Ainda, de acordo com as hipóteses evolutivas obtidas por Givnish et al. (2007; 2011), os gêneros *Pitcairnia* e *Fosterella* compartilham algumas características anatômicas foliares e morfologia mais métrica e de fotossíntese C3 (SANTOS-SILVA et al., 2013). Divergiram-se anteriormente do “clado xérico” com metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), *Dyckia*, *Encholirium* e *Deuterocohnia*, esses últimos, invadiram novos ambientes, como florestas pluviais, topo de árvores e ambientes xéricos ocupando majoritariamente ambientes de clima estacional na região denominada arco-seco (Caatinga, Cerrado e Chaco) (PRADO & GIBBS, 1993). Além disso, Pitcairnioideae data do surgimento mais basal a 13,4 Ma nos Escudos das Guianas em direção ao Norte dos Andes (GIVNISH et al., 2011) sendo *Pitcairnia* irmã do restante da subfamília do clado xérico, e irmã de *Fosterella* (CRAYN et al., 2004; REX et al., 2009; GIVNISH et al., 2011; SCHUBERT, 2017).

6. MARCADORES EVOLUTIVOS FILOGENÉTICOS E FILOGEOGRÁFICOS EM BROMELIACEAE

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Conferem diversas vantagens sobre os marcadores morfológicos convencionais. Exibem neutralidade fenotípica, podendo ser herdados co-dominantemente, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, e por fim, podem ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos (TANKSLEY, 1983; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; ADHIKARI et al., 2017).

Kumar et al. (2009), listaram algumas propriedades que devem ser levadas em consideração na escolha de um marcador ideal: natureza altamente polimórfica (muito investigada em estudos de diversidade genética); herança codominante (diferenciação entre homozigotos dominantes e heterozigotos em organismos diploides); alta cobertura do genoma (distribuição uniforme ao longo do genoma); comportamento neutro e seletivo; acessível quanto à disponibilidade (deve ser fácil, rápido e barato para detectar); ensaios fáceis e com rapidez e por fim, alta reprodutibilidade.

Nos últimos anos, avanços em tecnologia e o conhecimento sobre sequências genéticas contribuíram significativamente para análises do genoma em diferentes organismos e têm sido bem documentados na literatura a utilização destas análises em estudos de genética da conservação (CAVALLARI et al., 2006; DOMINGUES et al., 2011; VESCO et al., 2011). Um dos requisitos relevantes para o estudo filogeográfico é a escolha do marcador molecular a ser utilizado. Atualmente, os marcadores moleculares baseados em sequência de nucleotídeos de DNA detectam diferenças em regiões como deleções, inserções, substituições em estudos intra e inter-populacional tem tido alta popularidade, devido a características biológicas e técnicas que as tornam ideais para estudos ecológicos e evolutivos. Nos estudos filogeográficos de plantas, de modo geral, os microsatélites (SSR) e as sequências cloroplastidiais (cpDNA) são os marcadores mais utilizados, porém o marcador é nuclear (nDNA) é usado em alguns casos.

O DNA cloroplastidial (cpDNA) possui também uma taxa de mutação menos frequente que a observada para o nDNA, tanto de plantas quanto de animais, e menos frequente ainda quando comparado com o DNA mitocondrial de animais (taxa de evolução rápida) (NAHUM, 2001). Esse marcador é ideal em estudos de padrões históricos de fluxo gênico, relações filogenéticas entre populações, reconstrução das rotas de dispersão e colonização de espécies de plantas (ENNOS et al., 1999; LI et al., 2002; CARVERS et al., 2003). O genoma mitocondrial (mtDNA) de plantas tenha características parecidas com o genoma do cloroplasto (cpDNA). Entretanto, como o mtDNA possui uma taxa de substituição lenta (taxa de mutação ser bem menor do que o cpDNA, tanto de substituições quanto de inserções e deleções) e herança uni-parental, ele não é muito utilizado nas análises moleculares (WOLFE et al., 1987; DUMOLIN-LAPÈGUE et al., 1997). Além disso, o mtDNA confere grande variação em tamanho do genoma, no rearranjo dos genes e sofre frequentes recombinações (PROVAN, 1999). Dessa forma, o mtDNA de plantas é muito menos estudado que o cpDNA (DUMOLIN-LAPÈGUE et al., 1997).

O cpDNA é caracterizado por ser um genoma conservado, com baixa ou ausente taxa de recombinação, baixos níveis de substituição de nucleotídeos, herança predominantemente uniparental (o que permite estudar o fluxo gênico via sementes, por exemplo) e tempos de coalescência curtos (FERREIRA &

GRATTAPAGLIA, 1998). Estudos filogeográficos que envolvam mais marcadores de sequências (multilocos) permitem ter um maior acesso ao genoma juntamente com metodologias coalescentes que inferem vários loci, tornando possível analisar um grande conjunto de dados e obter uma melhor resolução filogeográfica entre as populações (KNOWLES & MADDISON, 2002). Ademais, estimativas com dados multilocos concatenados, conferem ainda uma elevada acurácia na divergência histórica interpopulacional (MADDISON & KNOWLES, 2006; EDWARDS et al., 2007; KUBATKO & DEGNAN, 2007; HELED & DRUMMOND, 2010). Estudos de simulação têm mostrado que três loci concatenados são suficientes para obter uma árvore de espécie com alta acurácia e tempos de divergência satisfatórios (MADDISON & KNOWLES, 2006; MCCORMACK et al., 2009; HELED & DRUMMOND, 2010).

Podemos destacar ainda os microssatélites (SSR), que são sequências de DNA relativamente curtas, e que são altamente polimórficos (BORÉM & CAIXETA, 2009). Entretanto, a abundância e distribuição destes microssatélites variam de acordo com a região genômica e o grupo taxonômico em estudo (TOTH et al., 2000). Os marcadores SSR caracterizam-se: pela herança codominante, natureza multialélica, boa reprodutibilidade e extensa cobertura do genoma. Constituem-se de unidades 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem encontrados em todos os genomas de procariotos e eucariotos. Estão presentes tanto em regiões codificadoras como não codificadoras e são geralmente muito polimórficas devido ao alto nível de variação no número de repetições (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; BORÉM & CAIXETA, 2009). As taxas de mutações dos locos microssatélites determinam o nível de variabilidade dentro e entre as populações, fornecendo estimativas da estrutura genética das populações (HAMZA, 2010).

Estudos populacionais utilizando marcadores SSR de cpDNA demonstram que essa ferramenta tem se mostrado muito informativa para o estudo de padrões histórico evolutivos em populações de plantas (POWELL et al., 1995; LEMES et al., 2010). Ademais, a literatura traz iniciadores que amplificam regiões SSR do cpDNA de diversas espécies vegetais, e podem ser utilizados para solucionar problemas entre linhagens basais, inferir sobre táxons relacionados, avaliar a contribuição relativa entre sementes e fluxo de pólen, indicar gargalos históricos, efeito fundador e deriva genética (TÓTH et al., 2017; RODRÍGUEZ-CORREA et al., 2018).

Os estudos envolvendo as informações provenientes do genoma nuclear (nDNA) para explorações filogenéticas em plantas iniciaram-se com o uso do marcador nuclear ITS e da subunidade 18S do nrDNA (SUH et al., 2000). Os primeiros trabalhos utilizando o marcador ITS iniciaram-se na década de 90 e analisavam as relações evolutivas entre espécies de Asteraceae (BALDWIN, 1992; SUH et al., 2000). Conforme Zemberlan et al. (2012), cerca de dois terços dos artigos publicados, envolvendo estudos que analisam filogeneticamente níveis taxonômicos de gêneros ou inferiores, utilizaram este marcador.

Dentre as propriedades das sequências ITS que justificam sua ampla utilização são: simplicidade da técnica e facilidade de amplificação do marcador; herança biparental; uniformidade intragenômica; universalidade dos *primers*; variabilidade intergenômica capaz de resolver questões infra e genéricas; e por fim, altas taxas de substituições nas sequências (ZAMBERLAN et al., 2012). Além dessas vantagens citadas anteriormente, a resolução de complexos taxonômicos, de filogenia de famílias e taxonomia infra-genérica, são exemplos de aplicações onde o marcador ITS foi empregado, evidenciando sua ampla versatilidade (DEVOS et al., 2006; FIOR et al., 2006; ZAMBERLAN et al., 2012).

Uma outra utilidade em ascensão do ITS, além dos estudos de filogenia, está relacionada com a técnica proposta por Hebert et al. (2003), denominada DNA *barcoding*. Com base nas informações dos trabalhos desenvolvidos por Chase et al. (2005), Taberlet et al. (2007) e Kress et al. (2017), o marcador ITS apresenta alto potencial para uso como DNA *barcoding* - código de barras de DNA - permitindo a identificação de espécies vegetais. Esta técnica se baseia na análise de sequências curtas e padronizadas de DNA como ferramenta para identificar e descrever organismos a exemplo de um código de barras espécie-específico (CHEN et al., 2010).

Na família Bromeliaceae, por apresentar plantas morfologicamente muito distintas, a classificação muitas vezes depende de caracteres generativos, pois a floração ocorre raramente. Assim, métodos para auxiliar na determinação, como o DNA *barcoding* por meio de ITS, são de grande interesse para a comunidade de pesquisa (BRATZEL et al., 2020; MACHADO et al., 2020). Nos últimos anos, alguns esforços foram feitos para testar um conjunto de DNA *barcoding* em plantas de Bromeliaceae. No entanto, foi demonstrado que os cpDNA: *rbcL*, *trnH-psbA*

e matK não foram suficientes para a determinação das espécies, devido à baixa variação genética (MAIA et al., 2012). Atualmente, o gene nuclear de baixa cópia *Agt1* é identificado como um novo marcador de DNA *barcoding* adequado para identificação molecular de espécies de bromélias intimamente relacionadas, por meio da combinação da sequência de um éxon de evolução comparativamente lenta com um íntron adjacente, geneticamente variável (BRATZEL et al., 2020).

Dessa forma, essa revisão bibliográfica contextualiza informações básicas sobre os principais aspectos evolutivos das Bromeliaceas residentes em *inselbergs* na Floresta Atlântica. A preservação da diversidade genética de determinado táxon, se baseia pelo entendimento e compreensão da história evolutiva e dos processos geoclimáticos que possam estar atuantes, e sendo um os principais objetivos em vários programas de conservação, principalmente, para endossar decisões de conservação dentro de regiões megadiversas como a Floresta Atlântica.

7. REFERÊNCIAS

AB’SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. *Geomorfologia*, v.53, p.1-23, 1977.

ADHIKARI, S.; SAHA, S.; BISWAS, A.; RANA, T. S.; BANDYOPADHYAY, T. K.; GHOSH, P. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *Nucleus*, v. 60, p. 283–297, 2017.

ARANDA – PERES, A. N; RODRIGUEZ, A. P. M. Bromeliads. In.: Silva, J.A.T. da. (org.). *Floriculture, Ornam. Plant Biotech*. 1ª Ed. London, UK: Global Science Books, 2006, v.4, p. 644-655.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, v. 36, p. 3-15, 2009.

AVISE, J. C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, 2000. 447p.

BALDWIN, B. G. et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals Missouri Botanical Garden*. Gard. v. 82, p. 247-277, 1995.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, v.16, p.3759–3767, 2007.

BATALHA-FILHO, H. Padrões e processos de diversificação em aves da Amazônia e da Mata Atlântica. Tese de doutoramento. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2012.

BEHLING, H. Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the *Araucaria* forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). *Rev. Palaeobot. Palynol.*, v. 97, p. 109–121, 1997.

BEHLING, H. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 177, p. 19-27, 2002.

BENZING, D. H., *Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation*. London: Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 590, 2000.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. *Marcadores Moleculares*. 2. ed. Viçosa: UFV, 532 p. 2009.

BRATZEL, V. N. et al. The low-copy nuclear gene *Agt1* as a novel DNA *barcoding* marker for Bromeliaceae. *BMC Plant Biology*. V. 20, n. 111, p. 1-11, 2020

BURKE, A. *Inselbergs* in a changing world – global trends. *Diversity and Distributions*, v. 9, p. 375–383, 2003.

CABANNE, G. S.; D’HORTA, F. M.; SARI, E. H. R.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 49, p. 760-77, 2008.

CARLIER, J. D; SOUSA, T. E. S; D’EECKENBRUGGE; LEITÃO, J. M. A genetic map of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) including SCAR, CAPS, SSR and EST-SSR markers. *Mol Breeding*, v. 29, p. 245- 260, 2012.

CARNAVAL, A. C. et al. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings. Biological sciences*, v. 281, p.1461, 2014.

CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F. B.; RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*, v. 323, p. 785 – 789, 2009.

CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J Biogeogr*, v 35, p.1187-1201, 2008.

CARVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 1451-1460, 2003.

CAVALLARI, M. M.; FORZZA, R. C.; VEASEY, E. A.; ZUCCHI, M. I.; OLIVEIRA, G. C. X. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, Detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation*, v.15, p. 4357-4373, 2006.

CHAPMAN, F. M. The distribution of bird-life in Colombia: a contribution to a biological survey of South America. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 36, p. 1–729, 1917.

CHASE, M.W. et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v.360, n.1462, n.1889-1895, 2005.

CHEN, S. et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, v.5, n. 1, p. 1-13, 2010.

COFFANI-NUNES, J. V. Bromélias pp. 119-132 In: simões, I. L. & lino, c.f. (eds.) *Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais*. São Paulo. 2002.

COLINVAUX, P. A.; DE OLIVEIRA, P. E.; BUSH, M. B. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. *Quaternary Science Reviews*, v. 19, p. 141-169, 2000.

CONNELL, J. H. Diversity in tropical rain forests and coral reefs - high diversity of trees and corals is maintained only in a non-equilibrium state. *Science*, v. 199, p. 1302-1310, 1978.

CONSELHO NACIONAL RESERVA DA BIOSFERA DA MATA (ATLÂNTICA). *Anuário Mata Atlântica*. Disponível em: Acesso em: 16 ago. 2020.

COSTA, A. F. Revisão taxonômica do complexo *Vriesea paraibica* Wawra (Bromeliaceae). São Paulo, 2002, 222p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, v. 30, p. 71-86, 2003.

COUTO, D. R.; FRANCISCO, T. M.; MANHÃES, V. C.; DIAS, H. M.; PEREIRA, M. C. A. Floristic composition of a Neotropical *inselberg* from Espírito Santo state, Brazil: an important area for conservation. *Check List*, v. 13, n. 1, p. 2043, 2017.

COUTO, D.R.; KESSOUS, I. M.; COSTA, A. F. A new species of *Vriesea* (Bromeliaceae) from Pedra dos Pontões, Espírito Santo, Brazil: an area of endemism for Bromeliaceae at Atlantic Forest. *Phytotaxa*, v. 433, n. 2, p. 167–173, 2020.

COX, B. C.; MOORE, P. D. *Biogeography: An Ecological and Evolutionary Approach*, 7th edition. Blackwell Publishing, London, UK, 2005.

CRAYN, D. M.; WINTER, K.; J. SMITH, A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, p. 3703–3708, 2004.

D’HORTA, F. M.; CABANNE, G. S.; MEYER, D.; MIYAKI, C. Y. The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Mol. Ecol.*, v. 20, p. 1923–1935, 2011.

de PAULA et al. Sugarloaf Land in south-eastern Brazil: a tropical hotspot of lowland *inselberg* plant diversity. *Biodiversity Data Journal* 8: e53135, 2020.

de PAULA, L. F. A.; FORZZA, R. C.; NERI, A. V.; BUENO, M. L.; POREMBSKI, S. Sugar Loaf Land in south-eastern Brazil: A centre of diversity for mat-forming bromeliads on inselbergs. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, p. 459–476, 2016.

DEVOS, N. et al. The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: insights from nrDNA sequences and cpDNA PCR-RFLP data. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, v. 38, p. 767-778, 2006.

DOMINGUES, R. et al. Genetic variability of an endangered Bromeliaceae species (*Pitcairnia albiflos*) from the Brazilian Atlantic rainforest. *Genetics and Molecular Research*, v. 10, p. 2482-2491, 2011.

DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; PEMONGE, M.- H.; PETIT, R. J. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, v. 6, p. 393-397. 1997.

EDWARDS, S. V.; LIU, L.; PEARL, D. K. High-resolution species trees without concatenation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 104, p. 5936–5941, 2007.

ENDLER, J. A. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton., 1977, 262p.

ENDLER, J. A. Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. *Amer. Zool.*, 22: 441-452, 1982.

ENNOS, R. A. et al. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: HOLLINGSWORTH, P.M.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. (Ed.). *Molecular systematics and plant evolution*. London: Taylor and Francis, p. 1-19, 1999.

EVANS, T. M.; JABAILY, R. S.; GELLI DE FARIA, A. P.; DE OLIVEIRA L, S. F.; WENDT, T.; BROWN, G. K. Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany*, v. 40, p. 116–128, 2015.

FERNANDES, A. M.; COHN-HAFT, M.; HERBEK, T.; FARIAS, I. P. Rivers acting as barriers for bird dispersal in the Amazon. *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 22, p. 363–373, 2014.

FERNANDES, A. M.; WINK, M.; ALEIXO, A. Phylogeography of the chestnut-tailed antbird (*Myrmeciza hemimelaena*) clarifies the role of rivers in Amazonian biogeography. *Journal of Biogeography*, v. 39, p. 1524–1535, 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: CENARGEM-EMBRAPA, p. 220, 1998.

FIOR, S. et al. Molecular phylogeny of the Caryophyllaceae (*Caryophyllales*) inferred from chloroplast *matK* and nuclear rDNA ITS sequences. *American Journal of Botany*, v. 93, p. 399-411, 2006.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 22 ago. 2020.

FORZZA, R. C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R. F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R. B.; VERSIEUX, L. 2020. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6309>>.

FOUQUET, A.; RECODER, R.; TEXEIRA, M. Jr.; CASSIMIRO, J.; AMARO, R. C.; CAMACHO, A.; DAMASCENO, R.; CARNAVAL, A. C.; MORITZ, M. C.; RODRIGUES, M. T. Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 62, p. 826-838, 2012.

FRAGA et al. Fauna e flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. INMA: Santa Tereza, 2019, 432p.

GALINDO-LEAL, C.; JACOBSEN, T. R.; LANGHAMMER, P. F. E.; OLIVIERI, S. Estado dos hotspots: a dinâmica da perda de biodiversidade. Capítulo 2. In: Galindo-Leal, C. e Câmara, I. G. (Eds). Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas. Belo Horizonte: Conservação Internacional, p. 12-23, 2005.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; EE, B. V, RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P.A.; JABAILY, R.S., CRAYN, D. M.; SMITH, A C.; WINTER, K.; BROWN, G.K.; EVANS, T.M.; HOLST, B.K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P.E.; SYTSMA, K. J. Genetic structure of Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight- locus plastid phylogeny. *Am J Bot*, v. 133, p. 227–234, 2011.

GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C., BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. In: COLUMBUS, J.T., FRIAR, E. A.; PORTER, J. M., PRINCE, L. M., SIMPSON, M. G. (eds.) *Monocots: Comparative Biology and Evolution: Poales*. Claremont, CA: Rancho Santa Ana Botanic Garden. *Am J Bot*, p. 3-26, 2007.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C. S. Continuamente atualizado. *Encyclopaedia of bromeliads*, version 4. Utrecht: University Botanic Gardens. <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>. Acesso 17 ago 2020.

HAFFER, J. On the river effect in some forest birds of Southern Amazonia. *Boi. Mus. Para. Emílio Goeldi, Série Zoologia*, v. 8, p. 217-245, 1992.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, v. 165, p. 131–137, 1969.

HAMZA, N. B. Cytoplasmic and nuclear DNA markers as powerful tools in populations' studies and in setting conservation strategies. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 29, p. 4510-4515, 2010.

HEBERT, P. D. et al. Biological identifications through DNA *barcodes*. *Proceeding Biology Science*, v. 270, n.1512, p. 313-321, 2003.

HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Research article*, v. 27, p. 570 – 580, 2010.

HELLBERG, M. E.; BURTON, R. S.; NEIGEL, J. E.; PALUMBI, S. R. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*, 70, p. 273-290, 2002.

HICKERSON, M. J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K. A.; GRAHAM, C. H.; JOHNSON, J. B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P. F.; YODER, A.D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 291-301, 2010.

HMELJEVSKI, K. V.; NAZARENO, A. G.; BUENO, M. L.; DOS REIS, M. S.; FORZZA, R. C. Do plant populations on distinct inselbergs talk to each other? A case study of genetic connectivity of a bromeliad species in an Ocbil landscape. *Ecology and Evolution*, v. 7, p. 4704–4716, 2017.

HOORN, C.; WESSELINGH, F. P.; TER STEEGE, H.; BERMUDEZ, M. A.; MORA, A.; SEVINK, J.; SANMARTÍN, I.; SANCHEZ-MESEGUER, A.; ANDERSON, C. L.; FIGUEIREDO, J. P.; JARAMILLO, C.; RIFF, D.; NEGRI, F. R.; HOOGHIEMSTRA, H.; LUNDBERG, J.; STADLER, T.; SÄRKINEN, T.; ANTONELLI, A. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, v. 330, p. 927, 2010.

HUGGETT, R. J. *Fundamentals of biogeography*. Abingdon: Routledge, 2004. 439p.

IBGE. *Manual técnico da vegetação brasileira*. 2nd. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 2012, 75 p.

JABIOL, J. et al. Structure of aquatic insect communities in tank-bromeliads in a East- Amazonian rainforest in French Guiana. *Forest Ecology and Management*, n. 257, p. 351–360, 2009.

KATTAN, G. H.; TELLO, S. A.; GIRALDO, M.; CADENA, C. D. Neotropical bird evolution and 100 years of the enduring ideas of Frank M. Chapman. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 117, p. 407–413, 2016.

KIMURA, M.; WEISS, G. H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, v. 49, p. 561, 1964.

KNOWLES, L. L.; MADDISON, W. P. Statistical Phylogeography. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 2623-2635, 2002.

KRESS, W. J. Plant DNA barcodes: applications today and in the future. *Journal of Systematic and Evolutionary*, v. 55, n. 13, p. 291–307, 2017.

KUBATKO, L. S.; DEGNAN, J. H. Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. *Syst. Biol*, v. 56, p. 17–24, 2007.

KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal*, v. 2, p. 141-162, 2009.

LARA, M.; GEISE, L.; SCHNEIDER, C. L. Diversification of small mammals in the forest Atlantic of Brazil: testing alternatives. In: Lacey E A, Myers P. (eds) *Mammalian Diversification: from Chromosomes to Phylogeography* (Celebration of the Career of James L. Patton). University of California Press Berkeley, Los Angeles. pp. 311-335, 2005.

LEDRU, M. P.; SALATINO, M. L. F.; CECCANTINI, G.; SALATINO, A.; PINHEIRO, F.; PINTAUD, J. C. Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. *Divers. Distrib*, v. 13, p. 761–771, 2007.

LEITE, R.; ROGERS, D. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Org. Divers. Evol.*, v. 13, p. 639–664, 2013.

LEME, E. M. C.; KOLLMANN L. J. C. New species and a new combination of Brazilian Bromeliaceae. *Phytotaxa*, v. 16, p. 1–36, 2011.

LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. Bromélias na natureza. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual, p. 183, 1993.

LEME, E. M. C.; FONTANA, A. P.; HALBRITTER, H. Three New *Pitcairnia* Species (Bromeliaceae) from the *Inselbergs* of Espírito Santo, Brazil. *Systematic Botany*, v. 3, p. 487-496, 2010.

LEME, E. M. C.; KOLLMANN, L. J. C.; FONTANA, A. P. Two new species from Pedra dos Pontões, an unexplored mountain in Espírito Santo, Brazil. *Journal of the Bromeliad Society*, v. 59, p. 152–169, 2009.

LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 12: 2875-2883. 2003.

LOMOLINO, M. V.; RIDDLE, B. R.; WHITTAKER, R. J. et al. *Biogeography*. 4th Edition. Sinauer Associates. 2005, 375p.

MACHADO, N. A. et al. Systematics of *Vriesea* (Bromeliaceae): phylogenetic relationships based on nuclear gene and partial plastome sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 192, n.4, p. 656–674, 2020.

MADDISON, W. P.; KNOWLES, L. L. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Syst. Biol.*, v. 55, p. 21–30, 2006.

MAIA, V. H. et al. DNA *barcoding* bromeliaceae: achievements and pitfalls. *PLoS ONE*. V. 7, n.1, 2012.

MALES, J.; GRIFFTHIS, H. Functional types in the Bromeliaceae: relationships with drought-resistance traits and bioclimatics distributions. *Functional Ecology*, v. 1, p. 1868-1880, 2017.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. *Quim. Nova*, v. 32, n. 7, p. 1885-1897, 2009.

MARTINELLI, G.; FORZZA, R. C. *Pitcairnia* L'Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *P. azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *P. encholirioides* L. B. Sm. *Revista Brasil. Bot.*, v.29, n.4, p. 603-607, 2006.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata

Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. Rodrigueésia, v. 59, p. 209–258, 2008.

MARTINS, F. M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? Biological Journal of the Linnean Society, v.104, p. 499-509, 2011.

MAYLE, F. E.; BEERLING, D. J.; GOSLING, W. D.; BUSH, M. B. Responses of Amazonian ecosystems to climatic and atmospheric carbon dioxide changes since the last glacial maximum. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, v. 359, p. 499-514, 2004.

MCCORMACK, J. E.; KNOWLES, L. L.; HUANG, H. Maximum-likelihood estimates of species trees: how accuracy of phylogenetic inference depends upon the divergence history and sampling design. Syst. Biol, v. 58, p. 501–508, 2009.

MILLSTEIN, R. L.; SKIPPER, R. A. Population genetics. In: Hull DL, Ruse M (eds) The Cambridge companion to the philosophy of biology. Cambridge University Press, Cambridge, p. 22-43, 2007.

MITTERMEIER, R. A.; TURNER, W. R.; LARSEN, F. W.; BROOKS, T. M.; GASCON, C. Global Biodiversity Conservation: the Critical Role of Hotspots. In: Zachos, F.E. & Habel, J.C. (eds.) Biodiversity Hotspots. Heidelberg: Springer, 2011.

MONTAGNINI, F.; JORDAN, C. F. Tropical Forest Ecology. Berlin: Springer, 2005. 295p.

MOTA, M. R.; PINHEIRO, F.; LEAL, B. S. S.; SARDELLI, C. H.; WENDT, T.; PALMA-SILVA, C. From micro- to macroevolution: insights from a Neotropical bromeliad with high population genetic structure adapted to rock outcrops. Heredity, v.125, p. 353–370, 2020.

MYERS, N.; MITTERMEYER, R. A.; MITTERMEYER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAHUM, L. A. Evolução dos genomas. In Matioli, S.R.(ed.), Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos Editora, v. 8, p. 82-96, 2001.

PALMA – SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARA, T.; FAY, M. F.; COZZOLINO, S.; LEXER, C. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.)

facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical *inselbergs*. *Molecular Ecology*, v. 20, p. 3185–3201, 2011.

PATTON, J. L.; SILVA, M. N. F.; MALCOLM, J. R. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (*Rodentia: Echimyidae*) of the Amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution*, v. 48, p. 1314-1323, 1994.

PERES, C. A.; PATTON, J. L.; DA SILVA, M. N. F. Riverine barriers and gene flow in Amazonian Saddle-Back Tamarins. *Folia Primatol.*, v. 67, p. 113-124, 1996.

PIANKA, E. R. Latitudinal gradients in species diversity: A review of concepts. *American Naturalist*, v. 100, p. 33-46, 1966.

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; MUNT, D. D.; BARROS, F.; FÉLIX, L. P.; FAY, M. F.; PALMA-SILVA, C. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of *inselbergs* of northeastern Brazil. *BMC Evolutionary Biology*, v. 14, p. 49, 2014.

PIRES, G. M. D.; CABANNE, G. S.; RODRIGUES, F. S. How Past Vicariance Events Can Explain the Atlantic Forest Biodiversity? *Ecosystems Biodiversity*, PhD. Oscar Grillo (Ed.), InTech, 2011.

POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Granitic and gneissic outcrops (*inselbergs*) as centers of diversity for desiccationtolerant vascular plants. *Plant Ecology*, v. 151, p. 19–28, 2000.

POREMBSKI, S. Tropical *inselbergs*: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 30, p. 579- 586, 2007.

POREMBSKI, S.; BECKER, U.; SEINE, R. Islands on islands: habitats on *inselbergs*. In: Porembski S, Barthlott W, eds. *Inselbergs – biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions*, vol. 146. Berlin: Ecological Studies, Springer-Verlag, p. 49–67, 2000.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; MCDEVITT, R.; VENDRAMIN, G. G.; RAFALSKI, J. A. Polymorphic simple sequence repeats regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Population Biology*, v. 92, p. 7759-7763, 1995.

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forest South America. *Annals Missouri Botany Garden*, v. 80, p. 902-927, 1993.

PROVAN, J.; SORANZO, N.; WILSON, N. J.; GOLDSTEIN, D. B.; POWELL, W. A low mutation rate for Chloroplast Microsatellites. *Genetics*, v. 153, p. 943-947, 1999.

RABOSKY, D. L.; SANTINI, F.; EASTMAN, J.; SMITH, S. A.; SIDLAUSKAS, B.; CHANG, J.; ALFARO, M. E. Rates of speciation and morphological evolution are correlated across the largest vertebrate radiation. *Nature Communications*, v. 4, p.1958, 2013.

REX, M.; SCHULTE, K.; ZIZKA, G.; PETERS, J.; VÁSQUEZ, R.; IBISCH, P. L.; WEISING, K. Phylogenetic analysis of *Fosterella* L.B. Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 51, p. 472 – 485, 2009.

REZENDE, C. L.; SCARANO, F. R.; ASSAD, E. D.; JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; STRASSBURG, B. B. N.; TABARELLI, M.; FONSECA, G. A.; MITTERMEIER, R. A. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspect. Ecol. Conserv*, v. 16, p. 208–214, 2018.

RIBAS, C. C.; ALEIXO, A.; NOGUEIRA, A. C. R.; MIYAKI, C. Y.; CRACRAFT, J. A paleobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proc. R. Soc. B*, v. 279, p. 681-689, 2012.

RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, v. 4, p. 225-246, 2006.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol. Conserv*, v. 142, p. 1141–1153, 2009.

RODRIGUES, P. H. V. Bromélias: Aspectos Gerais e Produção Comercial. Aula da disciplina de floricultura e plantas ornamentais. ESALQ: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2012. Disponível em < <http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv0480/Bromelia%202012.pdf>>. Acesso em: 21 ago de 2020.

RODRÍGUEZ-CORREA, H.; OYAMA, K.; QUESADA, M.; FUCHS, E. J.; GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, A. Contrasting patterns of population history and seed-mediated gene flow in two endemic Costa Rican oak species. *Journal of Heredity*, v. 1, p. 13. 2018.

ROOSMALEN, M. G. M. VAN.; ROOSMALEN, R. A. VAN; MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B. A new and distinctive species of marmoset (*Callithrichinae*, Primates) from the lower Rio Aripuanã, state of Amazonas, Central Brazilian Amazonia. *Goeldiana Zoologia*, v. 22, p.1-23, 1998.

SAADI, A. Neotectônica da Plataforma Brasileira: esboço e interpretação preliminares. *Geonomos*, v. 1, p. 1-15, 1993.

SAFFORD, H. D.; MARTINELLI, G. Southeast Brazil. *In* Inselbergs: Biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions (S. Porembski & W. Barthlott, eds.). Springer, Berlin, p.339-389, 2000.

SAFFORD, H. D. Brazilian páramos I: an introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *Journal of Biogeography*, v. 26, p. 693–712, 1999.

SAFFORD, H. D. Brazilian páramos IV. Phytogeography of the campos de altitude. *Journal of Biogeography*, v. 34, p. 1701-1722, 2007.

SANTOS – SILVA, F.; SARAIVA.; MONTEIRO, R.; PITA, P.; MANTOVANI, A.; FORZZA, R. C. Invasion of the South American dry diagonal: what can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it? *Flora*, v. 208, p. 508 – 521, 2013.

SCARANO, F. R. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rainforest. *Annals of Botany*, v. 90, p. 517– 524, 2002.

SCHUBERT, K. Systematik und Evolution der Gattung Pitcairnia L’Heritier (Bromeliaceae). Universität Kassel, 2017.

SCHULTER, K.; HORRES, R.; ZIZKA, G. Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family (Poales, Bromeliaceae). *Senckenbergiana Biologica*, v. 85, p. 113–125, 2005.

SILVA, J. M. C.; CASTELETI, C. H. M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. *In* Galindo Leal C, Câmara IG (Eds). *Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectiva*, Belo Horizonte: Conservação Internacional, p. 43–59, 2005.

SILVEIRA, D. G.; AMORIM, E. P.; JESUS, O. N. DE; SOUZA, F. V. D.; PESTANA, K. N.; SANTOS, V. J. DOS; SANTANA, J. R. F. de. Variabilidade

genética de populações naturais de caroá por meio de marcadores RAPD. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 44, p. 283-290, 2009.

SIQUEIRA-FILHO, J. A. Fenologia da Floração, ecologia da polinização e conservação de Bromeliaceae na Mata Atlântica Nordestina. 2003. 114 p. Tese (Doutorado): Universidade Federal de Pernambuco. Recife: 2003.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monographs*, v. 14, p. 1–662, 1974.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Fl. Neotrop Monogr.* n. 14, Part 3, Hafner Press, New York. 1979.

SPEZIALE, K. L.; EZCURRA, C. The role of outcrops in the diversity of Patagonian vegetation: Relicts of glacial palaeofloras? *Flora*, v. 207, p. 141-149, 2012.

SUH, Y. et al. Phylogenetic relationships of maples (*Acer* L.; Aceraceae) implied by nuclear ribosomal ITS sequences. *Journal of Plant Research*, v. 113, p. 193-202, 2000.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 132-138. 2005.

TABERLET, P. et al. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA *barcoding*. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. 3, p.1-14, 2007.

TANKSLEY, S. D. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol Biol Rep*, v. 1, p. 3–8, 1983.

TERRY, R. G.; BROWN, G. K.; OLMSTEAD, R. G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *American Journal of Botany*, v. 84, p. 664-670, 1997.

TÓTH, E. G.; VENDRAMIN, G. G.; BAGNOLI, F.; CSEKE, K.; HÖHN, M. High genetic diversity and distinct origin of recently fragmented Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations along the Carpathians and the Pannonian Basin. *Tree Genetics & Genomes*, v. 13, p. 47, 2017.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, v. 10, p 967–981. 2000.

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. A new species of *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms, Bromeliaceae. *Hoehnea*, v. 34, p. 409-413, 2007.

VESCO, L. L.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERERA, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. *Scientia Horticulturae*, v. 128, p. 515–522, 2011.

WALLACE, A. R. On the monkeys of the Amazon. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, v. 20, p. 107-110, 1852.

WEBB, S. D. Ecogeography and the Great American Interchange. *Paleobiology*, v. 17, p. 266–280, 1991.

WERNECK, F. P.; T. GAMBLE, G. R.; COLLI, M. T.; RODRIGUES, J.; W. SITES. Deep diversification and long-term persistence in the South American “dry diagonal”: integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution*, v. 66, p. 3014–3034, 2012.

WOLFE, K. H.; LI, W. H.; SHARP, P. M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 84, p. 9054-9058, 1987.

WRIGHT, S. Isolation by distance. *Genetics*, v. 28, p. 114-138, 1943.

ZAMBERLAN, P. M. et al. Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 35, n. 4, p.1036-1043, 2012.

ZIZKA, G.; SCHIMIDT, M.; SCHULTE, K.; NOVOA, P.; PINTO, R.; KÖNIG, K. Chilean Bromeliaceae: Diversity, distribution and evaluation of conservation status. *Biodivers Conserv*, v. 18, p. 2449-2471, 2009.

TERPENOS EM MYRTACEAE: POTENCIAIS PARA A GENÉTICA E MELHORAMENTO

Marcia Flores da Silva Ferreira

Luiza Alves Mendes

Layra de Medeiros Cardozo

Luina Ribeiro Noia

Amélia Carlos Tuler

1. INTRODUÇÃO

As plantas, devido a sua forma sésil, estão submetidas a diversos fatores desfavoráveis ou estressantes. As inúmeras pressões seletivas enfrentadas pelas plantas ao longo da história, especialmente a relação planta/herbívoro, influenciaram na vasta diversidade de metabólitos produzidos por esses organismos (WINK, 2003).

Ehrlich & Raven (1964), tentando explicar as relações entre plantas e herbívoros, propuseram a teoria da coevolução para designar adaptações recíprocas entre plantas e borboletas, que levaram a sua interdependência. Eles observaram que plantas relacionadas hospedavam herbívoros semelhantes, sugerindo que a coevolução planta/herbívoro é impulsionada por mudanças nos metabólitos secundários nas plantas.

A coevolução ocorre quando uma interação entre dois ou mais organismos produz uma resposta evolutiva em cada um deles. Num sentido mais amplo, a coevolução entre planta e polinizador seria o principal processo responsável pela radiação adaptativa (BARÔNIO et al., 2016).

Nesse sentido, a hipótese da coevolução ajuda a explicar a diversidade de metabólitos secundários presentes em grupos de plantas Neotropicais, e sua contribuição para a diversificação e abundância de um grande número de espécies relacionadas nesses ambientes. Gêneros da família Myrtaceae como *Eugenia*, *Myrcia* e *Psidium* com 100 espécies ou mais apresentam contribuição

desproporcional para a diversidade e abundância total em áreas Neotropicais (ZAPPI, 2015; BEECH et al., 2017; KOCHUMMEN et al., 1990; KURSAR et al., 2009, OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000), entretanto estes gêneros são pouco estudados quanto a diversidade dos metabólitos secundários.

Myrtaceae Juss. (Myrtales) compreende cerca de 17 tribos, 132 gêneros e 5671 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com centros de diversidade no Sudeste da Ásia, na região da Oceania e na América Tropical (GOVAERTS et al., 2008; WILSON et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2017). A tribo Eucalypteae inclui sete gêneros, entre eles: *Eucalyptus*, *Corymbia* e *Anghophora* que dominam florestas abertas e bosques em toda a Austrália (BOHTE & DRINNAN, 2005). Com cerca de 2500 espécies, Myrteae é a maior tribo da família e um dos mais diversos grupos de angiospermas na América tropical (VASCONCELOS et al., 2017). Além de importante na composição da vegetação, a tribo é reconhecida por fornecer frutos carnosos que são consumidos principalmente por aves e mamíferos, desempenhando papel essencial na funcionalidade dos ecossistemas (LUGHADHA & PROENÇA, 1996; GRESSLER et al., 2006), além de possuir gêneros de interesse alimentício e medicinal como *Eugenia*, *Pimenta* e *Psidium* (GRATTAPAGLIA et al., 2012).

Uma característica distintiva da família Myrtaceae é a presença de glândulas de óleo, presentes tanto em órgãos vegetativos quanto reprodutivos (METCALF & CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981; BARROSO et al., 1984). A diversidade e constituição dos óleos essenciais produzidos é bem estudada nas espécies em há interesse comercial no óleo. Estas espécies ocorrem de forma natural geralmente em florestas dos trópicos secos e zonas temperadas (tribos Eucalypteae, Melaleuceae e Leptospermeae) (PADOVAN et al., 2014).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de plantas, desempenham importante papel ecológico e podem ser obtidos por hidrodestilação. Esses óleos podem ser produzidos a partir de várias partes das plantas, como: flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, tronco, dependendo da espécie (BARBOSA et al., 2016). Alguns óleos essenciais podem ter uma constituição química simples, como o de alho ou cravo da Índia, apresentando poucos compostos. No entanto, a maioria das espécies produzem óleos com muitos constituintes, tendo uma natureza complexa, como é o caso de óleos essenciais das

folhas de goiabeiras (*Psidium guajava*). Em uma espécie, cada composto no óleo pode variar quali e quantitativamente, apresentando assim uma quimiodiversidade intraespecífica. Da mesma forma, essa variação da composição química pode ser percebida entre as espécies relacionadas e a variabilidade quimiotípica é chamada de interespecífica. Ressalta-se ainda que a ontogenia da planta, a variação ambiental e a genética são reconhecidas como fontes de variação química.

A constituição química dos óleos essenciais é formada majoritariamente por terpenos. Resumidamente, a via biossintética para a produção dos terpenos ocorre através das vias do mevalonato (MVA) e do fosfato de metileritritol (MEP) que resultam em duas unidades de cinco carbonos: isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (PADOVAN et al., 2014). Estes dão origem aos monoterpenos (10 carbonos) e sesquiterpenos (15 carbonos), comumente encontrados nos óleos essenciais, além de outros compostos de mesma natureza, como di e triterpenos.

Terpenos constituem a mais diversa classe de compostos orgânicos voláteis em plantas (DUDAREVA et al., 2013) com funções em interações planta-ambiente. A família Myrtaceae tem dois grandes grupos de compostos foliares descritos, além da ampla diversidade de quimiotipos nas espécies (PADOVAN et al., 2014; BUSTOS-SEGURA et al., 2017; SOUZA et al., 2018). Um padrão quimiotípico de terpeno foliar, no qual α -pineno e 1,8-cineol (monoterpenos) são os compostos mais comuns e abundantes nos óleos essenciais na maior parte das espécies de Myrtaceae. No entanto, nas tribos Myrteae, Kanieae, Syzygieae, Xanthostemoneae, Syncarpieae e Lindsayomyrteae, existem altas concentrações de α -pineno, e marcante presença do sesquiterpeno β -cariofileno (PADOVAN et al., 2014).

Neste capítulo realizamos uma revisão sobre terpenos comumente encontrados nos óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae e seus aspectos químicos de interações ecológicas e atividades biológicas; apresentamos a situação atual do melhoramento genético nas espécies que tem a utilização comercial do óleo essencial, bem como exemplo de aplicação de conhecimento de interações bióticas das plantas produtoras de terpeno para obtenção de transgênico resistente a inseto. O conhecimento sobre os terpenos em espécies vegetais tem utilidade de forma ampla, seja no desenvolvimento de produtos via melhoramento; no

conhecimento de interações ecológicas planta-ambiente; nos estudos dos genes envolvidos na biossíntese de terpenos na família e; no entendimento da evolução destas espécies. Neste sentido, algumas comparações entre principais terpenos presentes nas espécies neotropicais também foram destacadas em relação ao restante das espécies da família.

2. TERPENOS EM PLANTAS

Os terpenos constituem uma classe de compostos orgânicos voláteis produzidos por plantas, fungos, bactérias e alguns insetos (CHEN et al., 2015). Eles são compostos por unidades de isopreno (C_5), que é a base de sua classificação, ou seja, duas unidades de isopreno formam monoterpenos (C_{10}), três unidades formam sesquiterpenos (C_{15}), quatro unidades formam diterpenos (C_{20}), seis unidades formam triterpenos (C_{30}) e oito unidades formam tetraterpenos (C_{40}). Além dos diferentes números de carbonos, os terpenos podem ter várias funcionalidades químicas diferentes, incluindo álcool, aldeído, fenol, cetona, grupos éter e hidrocarboneto (GUIMARÃES et al., 2019; IUPAC, 2020). A possibilidade de combinações entre números de isopreno e de funcionalidades químicas permite a existência de uma grande variedade de terpenos, tornando-os a maior e mais diversa classe de compostos naturais com cerca de 50.000 metabólitos terpenóides identificados em plantas e fungos (THOLL, 2015; CHEN et al., 2015).

Essa diversidade estrutural é gerada por várias vias metabólicas dos terpenos, bem como por tipos de células especializadas que participam de sua biossíntese (ZULAK & BOHLMANN, 2010; CHO et al., 2017). As terpeno-sintases (TPSs) são uma classe diversa de enzimas que catalisam a biossíntese de hemiterpenos (C_5), monoterpenos, sesquiterpenos ou diterpenos usando os substratos dimetilalil pirofosfato (DMAPP), geranyl pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) ou geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), respectivamente (MCGARVEY & CROTEAU, 1995). Poucas TPSs estão envolvidas na síntese de terpeno primário como as giberelinas, a maioria participa da produção de metabólitos secundários especializados envolvidos nas interações ecológicas das plantas.

A função mais bem estabelecida para os terpenos vegetais é a defesa contra inimigos biológicos - seja diretamente por meio do direcionamento de herbívoros

como toxinas ou repelentes, ou indiretamente por meio da atração de predadores ou inimigos parasitóides de tais herbívoros (KESSLER & HEIL, 2011; PICHERSKY & RAGUSO, 2018). Os terpenos podem ser induzíveis, sintetizados de novo em resposta ao dano dos herbívoros, ou constitutivos (por exemplo, α -pineno e β -cariofileno) que são armazenados nas glândulas de pigmento subepidérmico e liberado após alimentação de herbívoros e danos à folha (PARÉ & TUMLINSON, 1997). Normalmente, os tricomas glandulares são mais abundantes nas folhas jovens. A superabundância de terpenos pode causar autotoxicidade, mas as plantas capazes de armazenar terpenos em tricomas ou outras estruturas glandulares escapam desse efeito autotóxico (MOORE et al., 2014). A espécie *Eucalyptus grandis* apresenta diversos perfis de terpenos, o maior número de genes de terpeno sintase (TPS) e também estruturas de armazenamento especializadas, como glândulas de óleo, assim como outras espécies da família Myrtaceae (WILSON, 2010).

A ação dos terpenos na interação planta-ambiente é relatada na família Myrtaceae, na atração de animais benéficos, na mediação das interações entre microrganismos das raízes das plantas no solo, na defesa contra herbívoros e patógenos; em características dissuasoras para insetos e tóxicas para fungos; atividades larvicida, inseticida, antimicrobiana e anti-inflamatória (MENDES et al., 2016; DIAS et al., 2015; PADOVAN et al., 2014; STEFFEN et al., 2012; LIMA et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2008). Todas essas interações são importantes para programas de melhoramento de plantas cultivadas.

3. FUNÇÕES ECOLÓGICAS E ADAPTATIVAS DE TERPENOS EM PLANTAS

Os compostos orgânicos voláteis são constituídos por meio de rotas bioquímicas, de forma constitutiva ou induzida por estressores bióticos e abióticos, e são emitidos por todas as partes e órgãos das plantas, podendo exercer importantes funções ecológicas. Estes elementos são essenciais na comunicação invisível da planta que pode ser percebida e explorada por herbívoros, por predadores de herbívoros e pelas plantas vizinhas e, além disso, apresentam diversas funções que protegem a planta de estresses abióticos (LORETO et al., 2014). Os terpenos

voláteis ou semivoláteis de baixo peso molecular, que incluem isopreno, monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, são alguns dos constituintes dos óleos voláteis mais estudados e associados com as funções ecológicas e interações das plantas com o ambiente (THOLL, 2015) (Figura 1).

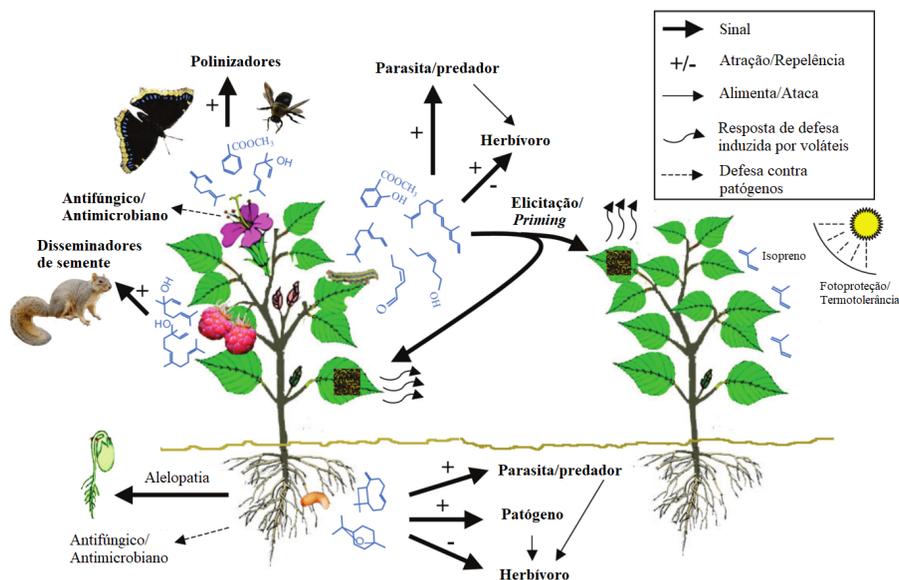


Figura 1. As plantas são expostas a vários estresses bióticos e abióticos, acima e abaixo do solo. As emissões de compostos orgânicos voláteis, incluindo os terpenos, ocorrem nos níveis de folha, raiz e flor. Os terpenos desempenham inúmeras funções nas plantas como defesa contra patógenos, parasitas e predadores; atraem polinizadores e disseminadores de sementes; possuem atividades antifúngica e antimicrobiana; possuem ação alelopática; conferem fotoproteção e termotolerância; dentre outras funções. Fonte: Adaptado de Dudareva et al. (2006).

A principal função geralmente atribuída aos voláteis florais é a atração e orientação de polinizadores (KNUDSEN et al., 2006), embora também sejam associados na defesa floral contra diversos insetos (JUNKER & BLÜTHGEN, 2008; WILLMER et al., 2009). No entanto, podem atrair insetos antagônicos que geram impactos negativos na função floral ao se alimentarem de tecido floral, bem como perturbar polinizadores legítimos (MCCALL & IRWIN, 2006; JUNKER &

BLÜTHGEN, 2010; HUANG et al., 2012). O maior grupo de voláteis florais são os terpenos, que incluem monoterpenos e sesquiterpenos, sendo o representante mais difundido desta última classe citada o β -cariofileno, que ocorre em mais de 50% dos odores florais das plantas das famílias de angiospermas e é um dos 12 compostos voláteis mais comuns em aromas florais (KNUDSEN et al., 2006; HUANG et al., 2012). Este terpeno ainda não demonstrou ação na atração de polinizadores, mas foi relatado que atua na defesa contra herbívoros quando ocorre nos tecidos não florais (HUANG et al., 2012).

Em nível foliar, há um aumento na liberação de óleos voláteis quando as plantas estão sob estresse bióticos como ataque por herbívoros ou patógenos, ou estresses abióticos, como secas ou altas temperaturas, e, de forma mais geral, estresses oxidativos. Os voláteis podem atrair predadores inimigos dos herbívoros indutores, entretanto, qualquer membro do ecossistema pode responder a eles, gerando uma teia de interações tróficas. Portanto, é possível associar estas substâncias como uma das pistas mais importantes que permitem aos herbívoros localizarem plantas hospedeiras e aos carnívoros localizarem suas presas (DICKE & BALDWIN, 2010; LORETO & SCHNITZLER, 2010; LORETO et al., 2014; VISSER, 1986; BRUCE & PICKETT, 2011; MCCORMICK et al., 2012).

Assim como nas folhas, a produção de óleos voláteis em raízes pode mediar as interações entre plantas, herbívoros e carnívoros. As plantas expostas à herbivoria de raízes mostraram emitir uma mistura volátil caracterizada por altas concentrações de compostos de enxofre específicos (que são relatados como altamente tóxicos para insetos) combinados com baixas concentrações de outros compostos como o β -farneseno, os quais são atuantes como atrativos para herbívoros e carnívoros (SOLER et al., 2007). Estudos feitos sobre a colonização da raiz por fungos micorrízicos arbusculares, os quais são conhecidos por terem funções benéficas para as plantas que melhoram a resistência aos estresses bióticos e abióticos e a disponibilidade de nutrientes, comprovaram um aumento na produção de monoterpenos e sesquiterpenos além de ácido abscísico, clorofilas e carotenóides, especialmente sob condições de estresse hídrico ou após a aplicação de ácido jasmônico (ASENSIO et al., 2012).

O papel dos terpenos voláteis na defesa indireta subterrânea foi bem estabelecido com base em estudos em milho que mostram que o sesquiterpeno

β -cariofileno, que é emitido das raízes após o ataque da lagarta do milho ocidental, *Diabrotica virgifera*, atrai nematoides entomopatogênicos (RASMANN et al., 2005; TURLINGS et al., 2012; THOLL, 2015). Essas descobertas levaram à tentativas de engendrar a produção de β -cariofileno em cultivares de milho americanas não emissoras, o que resultou em um aumento da atração de nematoides e maior resistência ao ataque do inseto praga (DEGENHARDT et al., 2009; THOLL, 2015). No entanto, as emissões constitutivas de β -cariofileno apresentam custos adicionais, visto que comprometem a germinação da semente, o crescimento da planta e a produtividade (ROBERT et al., 2013; THOLL, 2015).

Além de promover as interações com herbívoros e seus inimigos, misturas voláteis constitutivas e induzidas (incluindo os terpenos voláteis) podem servir como sinais de “alarme” interespecíficos, intraespecíficos e para a própria planta que o emitiu, para iniciar ou induzir respostas de defesa em plantas vizinhas ou em tecidos não atacados da mesma planta (ARIMURA et al., 2000; FROST et al., 2007; HEIL & KARBAN, 2010; HEIL, 2014; THOLL, 2015). Nessas interações, os voláteis podem, não necessariamente, precisar entrar no tecido foliar da planta vizinha, mas permanecer na superfície da folha. Ademais, sugeriu-se que os terpenos estão envolvidos nas interações de plantas parasitas, especificamente, na atração da planta parasita *Cuscuta pentagona* (dodder) para estabelecer contato com o tomate como seu hospedeiro (RUNYON et al., 2006).

4. ASPECTOS QUÍMICOS DOS PRINCIPAIS TERPENOS EM MYRTACEAE

Em Myrtaceae o perfil foliar de terpenos dos óleos essenciais é descrito para várias espécies, assim como a variabilidade quimiotípica intra e interespecífica dos mesmos. Entretanto, a maior quantidade de estudos disponíveis, referem-se às espécies em que o óleo essencial tem importância econômica, as quais incluem as espécies dos gêneros *Eucalyptus*, *Corymbia*, *Melaleuca* e *Leptospermum*, comuns em florestas dos trópicos secos até zonas temperadas, que apresentam perfil de terpenoides com predominância dos monoterpênicos dos quais destacam-se α -pineno e 1,8-cineol (KESZEI et al., 2010; PADOVAN et al., 2014). Espécies do gênero *Psidium*, de ocorrência neotropical, são exemplos de quimiotipos de

óleos essenciais com predominância de sesquiterpenos (MENDES et al., 2018; BERNARDES, 2017). A variação quimiotípica tem consequências tanto para interações ecológicas quanto para a indústria de óleo essencial. Quimiotipos de plantas ou polimorfismos químicos são definidos pela variação discreta nos metabólitos secundários dentro de uma espécie (MOORE et al., 2014). Adicionalmente, variações quantitativas que implicam na quantidade produzida de cada composto são importantes para o melhoramento de plantas. Neste tópico abordaremos alguns exemplos dos principais terpenos estudados em Myrtaceae e discussão no aspecto químico dos mesmos.

Nos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus*: *E. camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. globulus*, *E. crebra* e *E. tereticornis* os monoterpenos 1,8-cineol e α -pineno foram importantes na constituição do óleo (IQBAL et al., 2003). Em uma revisão de literatura, que considerou oito espécies de eucalipto distribuídas em 27 países, na maioria delas, o composto 1,8-cineol foi presente nos óleos essenciais foliares (BARBOSA et al., 2016). Quando presente no óleo essencial da espécie, esse terpeno foi presente praticamente em todos os óleos essenciais independente da origem da planta, indicando que o 1,8-cineol foi um importante marcador dos óleos essenciais destas espécies e os fatores abióticos (condições climáticas, tratos culturais, podas, irrigação, sombreamento, fertilização do solo e outros) não apresentaram influência na constituição do óleos produzidos, sendo a genética da planta o fator mais relevante para o gênero *Eucalyptus*. Nesta revisão o rendimento dos óleos essenciais das espécies de *Eucalyptus* nos vários países, variou de 0,19 a 6,07%.

O 1,8-cineol ou eucaliptol é um monoterpeneo oxigenado de cadeia cíclica. Através do coeficiente de partição e volume molecular, obtidos pelo software Molinspiration (www.molinspiration.com/cgi-bin/properties), é possível fazer algumas observações a respeito das estruturas das moléculas. O coeficiente de partição (P) representa o equilíbrio do analito entre duas fases imiscíveis, utilizando os meios aquoso e orgânico, sendo assim uma importante medida da hidrofobicidade de uma molécula. Esse software realiza o cálculo fazendo medidas de quanto do analito se distribui na mistura de água e octanol, e o resultado é apresentado em escala logarítmica ($\log P$) (Tabela 1). Se $\log P = 0$, então $P = 1$, assim, o analito tem a mesma afinidade pelas duas fases; se $\log P < 0$, logo $P <$

1, maior é a hidrofiliidade; por outro lado, se $\log P > 0$, $P > 1$, dessa forma, o analito será mais hidrofóbico, ou seja, tem maior afinidade pela fase orgânica. Considerando que as membranas celulares são formadas por substâncias apolares, uma hipótese sugerida é que o analito poderia ter maior facilidade de penetração e maior ação tóxica ao organismo quanto maior for o P. No entanto, deve-se levar em consideração o volume (V) que essa molécula ocupa, se este for adequado, a atividade biológica poderá ser ainda mais eficiente. Outros fatores precisam ser considerados, como por exemplo: existem relatos que a maior atividade antimicrobiana de óleos essenciais pode ser devido a possuírem compostos contendo uma hidroxila ligada a um anel aromático (FARAG et al., 1998).

O 1,8-cineol apresenta $\log P$ de 2,72 e volume molecular de $166,66 \text{ \AA}^3$. Se este for comparado aos valores observados para o α -pineno ($\log P = 3,54$ e $V = 151,81 \text{ \AA}^3$), verifica-se que o α -pineno tem maior hidrofobicidade e volume menor que o 1,8-cineol. Assim, considerando a atividade tóxica em organismos com uma membrana mais apolar, talvez o α -pineno poderia ser mais eficiente para indivíduos com superfícies mais apolares. Em um trabalho que utilizou óleos essenciais de cinco espécies de eucalipto (*Eucalyptus cloeziana*, *E. citriodora*, *E. saligna*, *E. grandis* e *E. microscorys*) em atividade antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*) a única espécie que não apresentou atividade antibacteriana em *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis* foi o óleo da espécie *E. microscorys*, que possui a maior quantidade de 1,8-cineol (86,72%), se comparado às outras espécies (ESTANISLAU, 2001). Este resultado revela que este composto majoritário não teve uma ação tóxica tão promissora quanto os outros óleos que apresentavam compostos mais hidrofóbicos, como citrônella (MO de cadeia linear, $\log P = 3,60$) e mirceno (MH de cadeia linear, $\log P = 3,99$). É relevante destacar que outros parâmetros físico-químicos devem ser levados em consideração para atribuir a maior atividade tóxica, como estabilidade do composto a reações de oxidação, sua volatilidade, entre outros. Na tabela 1 estão apresentados terpenos comumente encontrados nos óleos essenciais de Myrtaceae e os valores de coeficiente de partição ($\log P$) e volume molecular.

Tabela 1. Compostos comumente encontrados em óleos essenciais da família Myrtaceae com os valores de coeficiente de partição (log P) e volume molecular.

Composto	Log P	V (Å ³)
α-pineno	3,54	151,81
β-pineno	3,33	152,37
limoneno	3,62	157,30
1,8-cineol	2,72	166,66
α-terpineol	2,60	170,65
linalol	3,21	175,59
β-cariofileno	5,17	229,95
α-humuleno	5,30	234,00
óxido de cariofileno	4,14	234,01
nerolidol	5,06	253,17
α-bisabolol	4,68	248,23

O gênero *Melaleuca* representa uma classe de plantas aromáticas e medicinais, conhecidas pela produção de óleos essenciais (BARBOSA et al., 2013). O óleo da espécie *Melaleuca alternifolia* apresenta majoritariamente o composto terpinen-4-ol, além de α-terpineol, 1,8-cineol e outros (HART et al., 2000). O composto terpinen-4-ol teve destaque com atividade antimicrobiana em 12 organismos enquanto o 1,8-cineol demonstrou essa ação para sete organismos, porém com atividade relativamente menor (CARSON & RILEY, 1995). Por outro lado, α-terpineol apresentou significativa atividade para 11 organismos (CARSON & RILEY, 1995). Considerando que tanto o α-terpineol quanto o terpinen-4-ol apresentam log P = 2,60 e volume de 170,65 Å³, justifica-se terem praticamente a mesma eficiência para atividade antimicrobiana.

Os óleos essenciais das espécies *Melaleuca ericifolia*, *M. leucadendron* e *M. armillaris* foram analisados por cromatografia gasosa e as composições químicas foram obtidas (FARAG et al., 2004). *M. ericifolia* apresenta o metil eugenol (96,84%) como constituinte principal, enquanto *M. leucadendron* e *M. armillaris* são ricos em 1,8-cineol apresentando 64,30% e 33,93%, respectivamente. Os óleos essenciais dessas espécies foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana. *M. ericifolia* apresentou os maiores efeitos inibitórios contra *Bacillus subtiles* e *Aspergillus niger*, em comparação com os óleos das outras espécies. Esse resultado

foi atribuído ao metil eugenol ($\log P = 2,41$ e $V = 179,67 \text{ \AA}^3$) que representa quase a totalidade da composição do óleo (FARAG et al., 2004). O 1,8-cineol e o óxido de cariofileno, que são os majoritários para as outras espécies, são mais apolares quando comparado ao metil eugenol e poderiam ter maior ação tóxica, porém para esses organismos não tiveram. Nesse caso, é importante destacar que o metil eugenol possui um anel aromático com substituinte contendo oxigênio e autores relataram que essa estrutura pode contribuir para essa atividade (FARAG et al., 1998).

Em relação ao gênero *Psidium*, em um trabalho com os óleos essenciais de cinco cultivares da espécie *Psidium guajava* para verificar a atividade larvicida em *Aedes aegypti* observou-se a variabilidade da composição química e qual cultivar seria mais promissora para essa finalidade (MENDES et al., 2017). Os compostos majoritários encontrados nos óleos foram: limoneno, β -carofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno, selin-11-en-4 α -ol e β -bisabolol. A cultivar com melhor atividade larvicida foi a Século XXI, que apresentou β -carofileno (26,6%) e óxido de cariofileno (15,5%) como os principais compostos. De acordo com a Tabela 1, β -carofileno é um dos componentes mais apolares ($\log P = 5,17$) podendo ter melhor passagem pelas membranas externas das larvas e contribuindo com a maior toxicidade em relação aos óleos das outras cultivares que tiveram menor quantidade desse composto. Em relação ao rendimento dos óleos essenciais houve variação de 0,15 a 0,37% m.m⁻¹ dependendo da cultivar.

O óleo essencial da espécie *Psidium guineense* possui o álcool sesquiterpênico espatulenol ($\log P = 3,91$ e $V = 233,07 \text{ \AA}^3$) como o principal constituinte (80,71%) (NASCIMENTO et al., 2018). Ao avaliar atividade antioxidante do óleo essencial e do padrão espatulenol, observou-se que ambos tiveram a ação proposta, no entanto, o óleo essencial foi mais eficiente do que o composto majoritário puro. Dessa forma, verifica-se que os compostos minoritários são importantes para a atividade antioxidante.

5. ASPECTOS ECOLÓGICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PRINCIPAIS ESPÉCIES ESTUDADAS EM MYRTACEAE

Neste tópico serão apresentados alguns exemplos de espécies amplamente utilizadas ou estudadas quanto aos terpenos em Myrtaceae tanto das tribos Eucalypteae, Melaleuceae e Leptospermeae, geralmente ausentes nas Américas e comuns em florestas dos trópicos secos até zonas temperadas, quanto da tribo Myrteae de ocorrência em ambientes neotropicais. Posteriormente uma revisão de funções ecológicas e atividades biológicas de interesse conhecidas foi realizada para os principais terpenos estudados na família (Tabela 2).

Investigações feitas em voláteis de *Eucalyptus oleosa* e *Eucalyptus torquata*, demonstraram ação acaricida contra *Tetranychus urticae*. Os principais compostos encontrados no óleo de *E. oleosa* foram 1,8-cineol (31,96%), α -pineno (15,25%) e trans-anetol (7,32%) e no óleo de *E. torquata* foram o 1,8-cineol (28,57%), α -pineno (15,74%) e globulol (13,11%) (EBADOLLAHI et al., 2017). Sob as plantações de eucaliptos na região campestre do sul do Brasil, poucas plantas se estabelecem, e a hipótese levantada foi o envolvimento de alelopatia na formação desse padrão. O óleo essencial de *Eucalyptus saligna*, que consiste principalmente de monoterpenos e apresentou α -pineno e 1,8-cineol como compostos majoritários, foi relacionado com a fitotoxicidade causada em espécies de pastagens (SILVA et al., 2017).

Melaleuca sp. são cultivadas comercialmente para produção de óleo essencial. Dado o habitat subtropical quente da evolução de *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá), não é surpreendente que um arsenal de metabólitos secundários antimicrobianos, como monoterpenos cíclicos, deva ter sido selecionado. A composição química do óleo de *M. alternifolia* consiste principalmente em monoterpenos cíclicos e exibe atividade antimicrobiana de amplo espectro, que pode ser atribuída principalmente ao terpinen-4-ol. Estudos demonstram a ação do seu óleo contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans* (COX et al., 2000). *Melaleuca armillaris* é a espécie mais amplamente cultivada do gênero *Melaleuca*, cresce em solos rochosos e muito rasos e com baixa capacidade de retenção de

água. Como consequência, esta espécie exibe boa tolerância à seca. Apesar dos poucos relatos sobre a composição química do óleo essencial de *M. armillaris*, pode-se observar que 1,8-cineol corresponde ao componente majoritário, com concentrações variando de 33,7% a 80,2%. (BARBOSA et al., 2013).

Rhodomyrtus tomentosa é uma espécie amplamente distribuída no Leste e Sudeste Asiático, incluindo Japão, Tailândia e sul da China, é um arbusto perene (KESZEI et al., 2008). Os principais componentes ativos são α/β -pineno, β -cariofileno e α -humuleno. Dentre eles, α -pineno e β -cariofileno são os mais abundantes nas folhas. O α -pineno, um monoterpene monocíclico, é uma matéria-prima importante na síntese de especiarias, enquanto o β -cariofileno tem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anticarcinogênicas, propriedades de penetração na pele e também é um aditivo alimentar aprovado.

Das espécies neotropicais o gênero *Pimenta* inclui árvores de pequeno a médio porte ou arbustos que ocorrem no Caribe e América Central, exceto por uma espécie nativa do sudeste do Brasil, *P. pseudocaryophyllus* (LANDRUM, 1986). Em espécies do gênero, os principais quimiotipos encontrados foram eugenol, limoneno, cariofileno, metileugenol, mirceno e 1,8-cineol que conferem odor picante. *Pimenta dioica* e *P. racemosa*, são as espécies mais importantes economicamente. O óleo essencial foliar de *Myrtus communis* (murta-comum), outra Myrtaceae neotropical, apresentou atividade nematicida contra o nematóide das galhas, *Meloidogyne incognita*. Dentre os 38 componentes químicos principais, apresentaram destaque o 1,8-cineol (26,55%), α -pineno (19,40%), linalol (15,97%) e α -terpineol (8,43%) (ARDAKANI et al., 2013).

Psidium guajava ocorre em ambientes neotropicais da América Central com ampla disseminação e adaptação, sendo considerada uma planta invasora em Galápagos (URQUÍA et al., 2019). Em *P. guajava*, três quimiotipos terpênicos com predominância dos sesquiterpenos β -cariofileno, trans-nerolidol e β -bisabolol foram observados no óleo essencial de 22 genótipos de goiabeiras brasileiras (SOUZA et al., 2018; MENDES et al. 2017). Dois quimiotipos semelhantes também estão presentes na espécie relacionada *P. guineense*: limoneno / α -pineno, β -bisaboleno / epi- β -bisabolol e β -cariofileno / óxido de cariofileno (FIGUEIREDO et al., 2018). A presença relevante dos sesquiterpenos β -cariofileno e óxido-cariofileno na folha também foi relatada em 12 espécies nativas de *Psidium* no

Brasil (BERNARDES, 2017). Foi observado efeito inseticida com óleo essencial de *P. guajava* contra a lagarta do cartucho do milho, *Spodotera frugiperda*, com óleo essencial com os compostos majoritários 1,8-cineol (16,73%), α -terpineol (14,85%), β -cariofileno (6,25%) e (E)-nerolidol (4,04%) (LIMA et al., 2009). O óleo essencial de *Psidium myrsinites* mostrou eficácia larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), com os compostos principais: β -cariofileno (26,05%), α -humuleno (23,92%) e óxido de cariofileno (10,09%) (DIAS et al., 2015). Existe uma interação entre o gorgulho, *Conotrachelus dimidiatus* (Coleoptera: Curculionidae) e goiabas imaturas (*Psidium guajava*) para alimentação, sono, acasalamento e oviposição, e a emissão de compostos orgânicos voláteis pelo inseto e frutos imaturos pode ajudar a melhorar a compreensão das interações planta-inseto e inseto intraespecífico entre fêmeas e machos de *C. dimidiatus*. As emissões da goiabeira imatura consistem principalmente de limoneno, cariofileno e aromadendreno. Em relação às emissões do inseto, foram identificados os terpenoides C_{10} : grandlure I, II, III, IV, ácido grandisóico, papaianol (ELIZALDE-GONZÁLEZ et al., 2020). Pesquisas comprovaram o cultivo de *P. guajava* em pomar de citros apresentaram efeito positivo na redução da infestação de psíldeo cítrico asiático (*Diaphorina citri*) e os voláteis emitidos das folhas de goiabeira exibiram atividades repelentes contra os psíldeos adultos. Os compostos principais detectados forma α -pineno, sabineno, mirceno, β -pineno, β -ocimeno, limoneno e α -ocimeno (ZAKA et al., 2015).

Eugenia apresenta ampla distribuição, ocorrendo na Malásia, África, Austrália (*Eugenia reinwardtiana* (Blume) DC, sendo a região neotropical a área de maior diversidade. O Brasil é o centro da diversidade do gênero, abrangendo ca. 380 táxons dos quais 313 são endêmicos (FLORA DO BRASIL, 2020) ocorrendo em todos os domínios fitogeográficos. A maior riqueza de espécies é encontrada na Mata Atlântica e na Amazônia com 250 e 91 táxons respectivamente, mas no Cerrado (vegetação tipo savana) o gênero também possui um alto número de táxons (74 espécies). Algumas espécies são utilizadas para fins alimentares ou medicinais em muitas regiões do país, como *E. dysenterica* (Mart.) DC., *E. pyriformis* Cambess., *E. stipitata* McVaugh e *E. uniflora* L (BÜNGER et al., 2015). Dentro do setor alimentício e medicinal, destaca-se o óleo essencial de *E. caryophyllata*, espécie popularmente conhecida como cravo da Índia, que apresentou majoritariamente o

eugenol (88,6%) e possui propriedades anti-inflamatórias, citotóxicas, repelentes de insetos e anestésicas (CHAIÉB et al., 2007). Os óleos essenciais das folhas de *E. brasiliensis*, obtidos a partir de duas localidades do sudeste brasileiro, apresentaram composição similar com os sesquiterpenos α -selineno, β -selineno e β -cariofileno sendo os principais compostos (FISCHER et al., 2005).

Myrcia é o segundo gênero neotropical com maior diversidade nos neotrópicos incluindo ca. 770 espécies distribuídas de México para o Uruguai (WCSP, 2020). A composição química dos óleos essenciais das folhas de cinco espécies do gênero *Myrcia* foi estudada. A partir desse resultado, verifica-se que as espécies *M. fallax*, *M. glabra* e *M. multiflora* apresentaram majoritariamente sesquiterpenos, com destaque para α -bisabolol, α -selineno, β -cariofileno e valerianol. As espécies *M. acuminatissima* e *M. bombycina* apresentaram maior quantidade de monoterpenos, sendo α -pineno, β -pineno e linalol os principais compostos encontrados (HENRIQUES et al., 1997). O sesquiterpeno hidrogenado β -cariofileno foi o principal composto do óleo essencial das folhas da espécie *Myrcia salzmannii*, que foi obtido e caracterizado sazonalmente em diferentes meses dos anos de 2001 e 2003. Apesar de ter ocorrido variação quantitativa no teor de β -cariofileno encontrado nas coletas realizadas, em todas elas ele se manteve com um composto majoritário. Dessa forma, as potenciais aplicações do β -cariofileno, como anestésico, anti-inflamatório, antiviral, entre outras citadas na Tabela 2 poderiam ser testadas com o óleo essencial da espécie *Myrcia salzmannii* e esta poderia ser indicada para estas finalidades, pois além de possuir majoritariamente o β -cariofileno, apresenta estabilidade na composição demonstrada ao longo dos anos (CERQUEIRA et al., 2009).

Tabela 2. Principais terpenos encontrados nos óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae e funções ecológicas e atividades biológicas relacionadas na literatura.

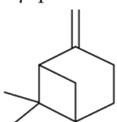
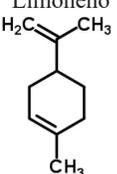
Terpeno, estrutura e classificação	Função ecológica/ Atividade biológica	Referências
MONOTERPENOS		
<p>α-pineno</p>  <p>$C_{10}H_{16}$ MH</p>	Termotolerância e proteção ao ozônio em plantas; Atração de polinizadores e defesa contra patógenos e herbívoros	HOLOPAINEN et al., 2013
	Antimicrobiano	DHAR et al., 2014
	Antifúngico	RIVERA-YÃNEZ et al., 2017
	Anti-inflamatório	KIM et al., 2015
<p>β-pineno</p>  <p>$C_{10}H_{16}$ MH</p>	Termotolerância e proteção ao ozônio em plantas; Atração de polinizadores e defesa contra patógenos e herbívoros	HOLOPAINEN et al., 2013
	Antimicrobiano	SILVA et al., 2012 LOPES et al., 2012
	Antifúngico	MÂCEDO ANDRADE et al., 2018
	Miorrelaxante	COELHO-DE-SOUZA et al., 2005
	Antidepressivo	GUZMÁN-GUTIÉRREZ, 2012
	Antiespasmódico; Anti-inflamatório; Ansiolítico; Anticonvulsivante	ALMEIDA et al., 2003 SANTOS, 2013
	Hipotensor	MENEZES et al., 2010
<p>Limoneno</p>  <p>$C_{10}O_{16}$ MH</p>	Defesa contra herbivoria	LAWLER et al., 1999 BOYLE & MCLEAN, 2004 MOORE et al., 2014
	Repelente de insetos	ALONSO, 2004
	Inseticida, acaricida e ação contra outros micro-organismos	HOLLINGSWORTH, 2005
	Antimicrobiano	KIM et al., 1995
	Antifúngico	BELLETTI et al., 2004
	Antitumoral	AGGARWAL et al. 2006
	Antinocepcivo	AMARAL et al., 2007
	Anti-inflamatório	REHMAN et al., 2014
	Ansiolítico	LEITE et al., 2008
Gastroprotetor	MORAES et al., 2009	

Tabela 2. Principais terpenos encontrados nos óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae e funções ecológicas e atividades biológicas relacionadas na literatura. (continuação)

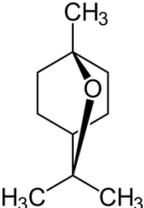
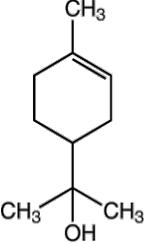
Terpeno, estrutura e classificação	Função ecológica/ Atividade biológica	Referências
MONOTERPENOS		
<p>1,8-cineol (ou Eucaliptol)</p>  <p>$C_{10}H_{18}O$ MO</p>	Inseticida e repelente de insetos	ZANDI-SOHANI et al., 2013 DILLMANN et al., 2020
	Atração de insetos polinizadores; Atração de inimigos naturais de herbívoros	SCHEMSKE & LANDE, 1984 DEGENHARDT et al., 2003 MOORE et al., 2014
	Termotolerância e tolerância ao ozônio em plantas	HOLOPAINEN et al., 2013
	Defesa/Redução de herbivoria	STONE & BACON, 1994 LAWLER et al., 1999 BOYLE & MCLEAN, 2004 MOORE et al., 2014
	Anti-inflamatório; Antioxidante	JUERGENS, 2014
	Antimicrobiano; Antifúngico	PATTNAIK et al., 1997
	Antiviral	YANG et al., 2010
	Mucolítico	BASTOS et al., 2011
	Broncodilatador; Espasmolítico	JUERGENS et al., 1998
<p>α-terpineol</p>  <p>$C_{10}H_{18}O$ MO</p>	Inseticida e repelente	LIU et al., 2013
	Miorrelaxante e antiespasmódico	MAGALHÃES et al., 1998
	Efeitos cardiovasculares; Antioxidante; Antihipertensivo	SABINO et al., 2013
	Anticonvulsivante	SOUSA et al., 2007
	Sedativo	SOUSA et al., 2007
	Antinoceceptivo	QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011
	Gastroprotetor	SOUZA et al., 2011
	Antimicrobiano	RAMAN et al., 1995
	Anticancerígeno	HASSAN et al. 2010

Tabela 2. Principais terpenos encontrados nos óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae e funções ecológicas e atividades biológicas relacionadas na literatura. (continuação)

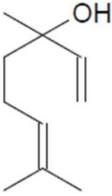
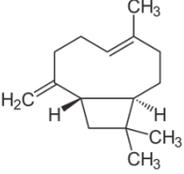
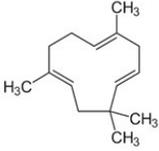
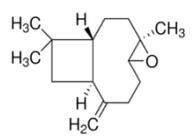
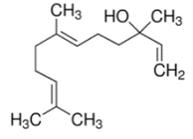
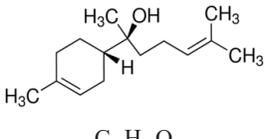
Terpeno, estrutura e classificação	Função ecológica/Atividade biológica	Referências
MONOTERPENOS		
<p>Linalol</p>  <p>$C_{10}H_{18}O$ MO</p>	Inseticida	PEREIRA et al., 2014
	Defesa contra herbivoria	LAWLER et al., 1999 BOYLE, MCLEAN, 2004 MOORE et al., 2014
	Anti-inflamatório; Analgésico; Hipotensor; Vasorrelaxante; Antinociceptivo; Antimicrobiano; Hipnótico, Hipotérmico; Sedativo	CAMARGO & DE VASCONCELOS, 2014
SESQUITERPENOS		
<p>β-cariofileno</p>  <p>$C_{15}H_{24}$ SH</p>	Resistência à herbivoria plantas	SMITH et al., 2012
	Atração de inimigos naturais de herbívoros	DEGENHARDT et al., 2003 MOORE et al., 2014
	Interação planta-planta	BALDWIN et al., 2006
	Anestésico local	GHERLADINI et al., 2001
	Potencializador da atividade anticâncer (do α -humulene)	LEGAULT, PICHETTI, 2007 DAHAM et al., 2015
	Efeito antidiabético	BASHA, SANKARANARAYANAN, 2016
	Anti-inflamatório	FERNANDES et al., 2007
	Anticonvulsivante	DE OLIVEIRA et al., 2016
Antiviral	PÁJARO-CASTRO et al., 2015	
<p>α-humuleno</p>  <p>$C_{15}H_{24}$ SH</p>	Inseticida	BENELLI et al., 2018
	Atração de inimigos naturais de herbívoros	DEGENHARDT et al., 2003 MOORE et al., 2014
	Interação planta-planta	BALDWIN et al., 2006
	Anti-inflamatório	FERNANDES et al., 2007

Tabela 2. Principais terpenos encontrados nos óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae e funções ecológicas e atividades biológicas relacionadas na literatura. (continuação)

Terpeno, estrutura e classificação	Função ecológica/Atividade biológica	Referências
SESQUITERPENOS		
<p>Óxido de cariofileno</p>  <p>$C_{15}H_{24}O$ SO</p>	Atração de inimigos naturais de herbívoros	DEGENHARDT et al., 2003 MOORE et al., 2014
	Interação planta-planta	BALDWIN et al., 2006
	Analgésico; Anti-inflamatória	CHAVAN et al., 2010
	Efeito relaxante	MECKES et al., 1996
<p>Nerolidol</p>  <p>$C_{15}H_{26}O$ SO</p>	Defesa contra inseto e patógeno em plantas	CHEN et al., 2020
	Atração de inimigos naturais de herbívoros	DEGENHARDT et al., 2003 MOORE et al., 2014
	Interação planta-planta	BALDWIN et al., 2006
	Atividade antileishmania	ARRUDA et al., 2005
	Atividade anti-esquistossômica	BREHM-STECHER & JOHNSON, 2003
<p>α-bisabolol</p>  <p>$C_{15}H_{26}O$ SO</p>	Inseticida	ANDRADE et al., 2004
	Ação contra estressores bióticos e abióticos	OTTO et al., 2017
	Analgésico; Antibiótico; Anti-câncer; Anti-inflamatório	KAMATOU & VILJOEN, 2010

MH: monoterpeno hydrogenado; MO: monoterpeno oxigenado; SH: sesquiterpeno hydrogenado; SO: sesquiterpeno oxigenados.

6. MELHORAMENTO PARA ÓLEOS ESSENCIAIS EM MYRTACEAE

A variabilidade na composição dos óleos essenciais nas espécies de Myrtaceae é objeto de interesse para os programas de melhoramento, dada a importância dos compostos presentes nesses óleos, principalmente os terpenos. Nos últimos anos,

a diversidade química dos óleos essenciais das espécies dessa família tem sido revelada, permitindo a obtenção de informações relevantes para a definição de estratégias de uso de genótipos em programas de melhoramento (BARBOSA et al., 2016; MENDES et al., 2017; SCALVENZI et al., 2017; BUSTOS-SEGURA et al., 2017; SOUTHWELL et al., 2017; FILOMENO et al., 2020). Esse conhecimento da diversidade química das espécies de Myrtaceae e dos fatores que afetam essa diversidade é fundamental para a obtenção de óleos essenciais com características desejáveis.

A maioria das espécies de Myrtaceae produtoras de óleo essencial sofreu pouca ou nenhuma seleção e, por isso, demonstra grande variação fenotípica nas características do óleo. A concentração de óleo essencial em *Eucalyptus polybractea*, por exemplo, pode variar de 0,7 a 13% do peso seco da folha (KING et al., 2006), enquanto em *Melaleuca alternifolia* varia de 2,5 a 14,5% do peso seco (HOMER et al., 2000). A espécie *E. polybractea* é a principal espécie cultivada para a produção de óleo na Austrália por apresentar altas concentrações de óleo e proporção de 1,8-cineol. As plantações são estabelecidas a partir de sementes provenientes da polinização aberta de povoamentos nativos, resultando em rendimentos inconsistentes entre anos e linhas (GOODGER & WOODROW, 2012). Devido à grande variação natural, há muito espaço para melhoria nas características que são importantes para a produção em larga escala de terpenos vegetais: concentração de óleo foliar, proporção de 1,8-cineol, acúmulo de biomassa folhosa, crescimento e sobrevivência (KAINER et al., 2018).

Segundo Murray & Reitsema (1954), um programa de melhoramento de plantas voltado para óleos essenciais requer um conhecimento básico da herança de pelo menos os principais compostos do óleo essencial. No caso dos terpenos em Myrtaceae, a herdabilidade tem se apresentado de moderada a alta na maioria das espécies estudadas. Em *E. camaldulensis*, observou-se herdabilidade variando de 0,42 a 0,54% para monoterpenos totais e de 0,53 a 0,61% para 1,8-cineol (DORAN & MATHESON, 1994). Em *E. melliodora*, a herdabilidade para 1,8-cineol foi de 0,72% (ANDREW et al., 2005). Em *E. globulus*, os sete sesquiterpenos estudados apresentaram herdabilidade variando entre 0,37 e 0,83%, enquanto, dos monoterpenos, três tiveram herdabilidade alta (0,60 a 0,79%) e quatro, herdabilidade entre baixa a moderada (0,03% a 0,22%) (O'REILLY-WAPSTRA

et al., 2011). Em *M. cajuputi*, foram observados valores de herdabilidade para 1,8-cineol de 0,21% (HAI et al., 2019) e 0,54% (SUSANTO et al., 2003).

A alta herdabilidade leva a uma maior precisão da seleção, uma vez que grande parte da variação observada se deve a efeitos genéticos e não ambientais. Nessas condições, a seleção fenotípica recorrente tem o poder de gerar grandes ganhos por ciclo de seleção (KAINER et al., 2015). Os ganhos estimados de um ciclo de seleção para concentração de 1,8-cineol em *E. camaldulensis* é de 25% e de 32% para monoterpenos totais (DORAN & MATHESON, 1994). Em *M. cajuputi*, o ganho estimado para 1,8-cineol é de 10% (SUSANTO et al., 2003).

A alta herdabilidade relacionada aos terpenos também tem sido afirmada pelos estudos de QTLs. Em *E. nitens*, foram mapeados 45 QTLs significativamente associados a concentrações de terpenos, explicando de 3,0 a 16,9% da variância, ou seja, a concentração de terpeno em eucaliptos pode ser afetada por relativamente poucos loci de efeito relativamente grande (HENERY et al., 2007). Os autores também detectaram vários locais genômicos com QTLs para muitas características. Especificamente para os monoterpenos α -pineno, 1,8-cineol, limoneno e α -terpineol, foram identificados QTLs adjacentes no mesmo grupo de ligação, explicando de 11,6 e 16,9% da variância, além de forte correlação fenotípica entre os compostos. Os autores acreditam que um único QTL esteja exercendo efeitos pleiotrópicos sobre a concentração de monoterpenos relacionados, dadas suas origens biossintéticas comuns. Também foram identificados 13 QTLs para a concentração de 14 terpenos diferentes em *E. globulus*, explicando entre 8,0 e 70,9% da variância (O'REILLY-WAPSTRA et al., 2011). Assim como relatado para *E. nitens*, esses autores também observaram regiões com um mesmo QTL influenciando várias características, como, por exemplo, um QTL influenciando a concentração de todos os sesquiterpenos.

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento, os estudos genéticos dos óleos essenciais têm ganhado novos recursos, como as análises de associação e seleção genômica, que contribuirão muito para o melhoramento das espécies visando características relacionadas ao rendimento e qualidade dos óleos. Estudos em populações da família Myrtaceae têm focado na análise de associação de genes específicos envolvidos na síntese de terpenos e seu efeito na variação quantitativa do conteúdo e composição do óleo. Em *E. globulus*, o estudo de

associação entre 24 genes candidatos de vias biossintéticas e a concentração de metabólitos secundários revelou 37 associações significativas em 11 genes, sendo 13 associações relacionadas à síntese de terpenos (KÜLHEIM et al., 2011). Outro estudo utilizando dez genes candidatos em *E. loxophleba* encontrou três associações significativas com α -pineno, duas com 1,8-cineol e oito com terpenos totais (PADOVAN et al., 2017). Também usando genes candidatos, Webb et al. (2013) investigaram a correlação entre a abundância de transcritos de genes que codificam para enzimas da via MEP (fosfato de metileritritol cloroplástico) e terpenos foliares em *M. alternifolia*. Os autores relataram que a variação na expressão dos genes da via MEP explicou 87% da variação nas concentrações foliares de monoterpeno.

O estudo de associação genômica para características de terpeno usando marcadores densos obtidos por ressequenciamento do genoma inteiro em *E. polybractea* permitiu encontrar evidências de influência alélica na síntese de terpenos e também em outros fatores importantes, como disponibilidade de precursores, transporte de terpeno, formação de cavidades e armazenamento (KAINER et al., 2018). Além disso, os autores realizaram a validação funcional de dois genes candidatos da terpeno-sintase para a produção de 1,8-cineol.

A seleção para óleos essenciais envolve a seleção para múltiplas características complexas ou um índice de seleção formado a partir dessas características. Por exemplo, na criação de óleo de eucalipto de grau farmacêutico, um índice deveria compreender a concentração total de óleo, biomassa foliar, % 1,8-cineol, % de compostos indesejáveis, taxa de sobrevivência familiar e outras características. Juntamente com técnicas de modelagem avançadas, o ganho por unidade de tempo usando a seleção genômica pode muito bem superar as práticas tradicionais de melhoramento, especialmente em plantas perenes como o eucalipto e a *Melaleuca* (KAINER et al., 2015). Um estudo de predição genômica para características relacionadas ao rendimento foliar de terpeno em *E. polybractea* demonstrou alta capacidade preditiva para a concentração de 1,8-cineol e α -pineno, o que é altamente promissor para produtores que buscam desenvolver linhas de alta produção de 1,8-cineol (KAINER et al., 2018).

O melhoramento para características de óleo essencial em espécies de Myrtaceae tem muito potencial para avançar, considerando a alta diversidade

quimiotípica e alélica presente nas espécies e o estágio inicial em que as pesquisas se encontram. Tanto o melhoramento tradicional, como o genômico tem capacidade para realizar progressos na produção e composição dos óleos.

Além das possibilidades de melhorias das espécies mais cultivadas para a produção do óleo, *Eucalyptus* spp. e *Melaleuca* spp., também existe potencial para o melhoramento e cultivo de outras espécies, como *Corymbia* spp., *Rhodomyrtus tomentosa* e *Psidium* spp., principalmente *Psidium guajava*, que já é cultivada para a produção de frutos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochemical pharmacology*, v. 72, n. 11, p. 1605-1621, 2006.

ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; LEITE, J. R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. *Bol.Latinoam. Caribe Plantas Méd Aromat.*, 2:3-6, 2003.

ALONSO, J. Tratado de fitofármacos y nutracéuticos. Rosário, Argentina: Editorial Corpus, 2004.

AMARAL, J. F.; SILVA, M. I.; NETO, M. R.; NETO, P. F.; MOURA, B. A.; DE MELO, C. T.; DE ARAÚJO, F. L.; DE SOUSA, D. P.; DE VASCONCELOS, P. F.; DE VASCONCELOS, S. M.; DE SOUSA, F. C. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n. 7, p. 1217-1220, 2007.

ANDRADE, I. L.; BEZERRA, J. N. S.; LIMA, M. A. A.; DE FARIA, R. A. P. G.; LIMA, M. A. S.; ANDRADE-NETO, M.; CAVALCANTI, F. S.; MESQUITA, A. L. M. Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from *Vanillosmopsis pohlii* baker against *Bemisia argentifolii*. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, n. 19, p. 5879-5881, 2004.

ANDREW, R. L.; PEAKALL, R.; WALLIS, I. R.; WOOD, J. T.; KNIGHT, E. J.; FOLEY, W. J. Marker-based quantitative genetics in the wild: The heritability and genetic correlation of chemical defenses in *Eucalyptus*. *Genetics*, v. 171, n. 4, p. 1989-1998, 2005.

ARDAKANI, A. S.; HOSYNINEJAD, S. A.; POURSHIRZAD, A. Killing effects of *Myrtus communis* L. essential oil on *Meloidogyne incognita* Research article.

International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS), v. 5, n. 8, p. 806-810, 2013.

ARIMURA, G.; OZAWA, R.; SHIMODA, T.; NISHIOKA, T.; BOLAND, W.; TAKABAYASHI, J. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, v. 406, n. 6795, p. 512-515, 2000.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 49, n. 5, p. 1679-1687, 2005.

ASENSIO, D.; RAPPARINI, F.; PEÑUELAS, J. A. M. Fungi root colonization increases the production of essential isoprenoids vs. nonessential isoprenoids especially under drought stress conditions or after jasmonic acid application. *Phytochemistry*, v. 77, p. 149-161, 2012.

BALDWIN, I. T.; HALITSCHKE, R.; PASCHOLD, A.; DAHL, C. C. V.; PRESTON, C. A. Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. *Science*, v. 311, n. 5762, p. 812-815, 2006.

BARBOSA, L. C. A.; SILVA, C. J.; TEIXEIRA, R. R.; MEIRA, R. M. S. A.; PINHEIRO, A. L. Chemistry and Biological Activities of Essential Oils from *Melaleuca L. Species*. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, v. 78, n. 1, p. 11–23, 2013.

BARBOSA, L.; FILOMENO, C.; TEIXEIRA, R. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. *Molecules*, v. 21, n. 12, p. 1671, 7 dez. 2016.

BARÔNIO, G. J.; MACIEL, A. A.; OLIVEIRA, A. C.; KOBAL, R. O. A. C.; MEIRELES, D. A. L.; BRITO, V. L. G.; RECH, A. R. Plantas, polinizadores e algumas articulações da biologia da polinização com a teoria ecológica. *Rodriguésia*, v. 67, n. 2, p. 275-293, 2016.

BARROSO, G. M. *Sistemática das Angiospermas do Brasil*. v.2. Ed. Univ. Fed. Viçosa, Viçosa, p. 377, 1984.

BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. *Chemico-biological interactions*, v. 245, p. 50-58, 2016.

BASTOS, V. P. D.; GOMES, A. S.; LIMA, F. J.; BRITO, T. S.; SOARES, P. M.; PINHO, J. P.; SILVA, C. S.; SANTOS, A. A.; SOUZA, M. H.; MAGALHÃES, P. J. Inhaled 1, 8-cineole reduces inflammatory parameters in airways of Ovalbumin-challenged Guinea Pigs. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 108, n. 1, p. 34-39, 2011.

BEECH, E.; RIVERS, M.; OLDFIELD, S.; SMITH, P. P. Global Tree Search: The first complete global database of tree species and country distributions. *J. Sustain. For.* v. 36, p. 454-489, 2017.

BELLETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 23, p. 6932-6938, 2004.

BENELLI, G.; GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; VASEEHARAN, B.; ALYAHYA, S. A.; ALHARBI, N. S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J. M.; MAGGI, F. Insecticidal activity of camphene, zerumbone and α -humulene from *Cheilocostus speciosus* rhizome essential oil against the Old-World bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 148, p. 781-786, 2018.

BERNARDES, C.O. Diversidade genética, caracterização e atividade de óleos essenciais em *Psidium* spp. Alegre, 2017. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre, 2017

BOHTE, A.; DRINNAN, A. Ontogeny, anatomy and systematic significance of ovular structures in the 'eucalypt group' (Eucalypteae, Myrtaceae). *Pl. Syst. Evol.* v. 255, p. 17-39, 2005.

BOYLE, R. R.; MCLEAN, S. Constraint of feeding by chronic ingestion of 1, 8-cineole in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of chemical ecology*, v. 30, n. 4, p. 757-775, 2004.

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 10, p. 3357-3360, out. 2003.

BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects—finding the right mix. *Phytochemistry*, v. 72, n. 13, p. 1605-1611, 2011.

BÜNGER, M. DE O.; EINSEHLOR, P.; FIGUEIREDO, M. L. N.; STEHMANN, J. R. Resolving Species Delimitations in the *Eugenia involucrata* Group (*Eugenia* sect. *Phylloclalyx* - Myrtaceae) with Morphometric Analysis. *Systematic Botany*, v. 40(4), p. 995–1002, 2016.

BUSTOS-SEGURA, C.; DILLON, S.; KESZEI, A.; FOLEY, W. J. Intraspecific diversity of terpenes of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae) at a continental scale. *Australian Journal of Botany*, v. 65, n. 3, p. 257-269, 2017.

CAMARGO, S. B.; VASCONCELOS, D. F. S. A. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpene. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 13, n. 3, p. 381-387, 2014.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 78, n. 3, p. 264–269, 1995.

CERQUEIRA, M. D. DE.; MARQUES, E. DE. J.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. DA. S. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1544–1548, 2009.

CHAIIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, v. 21, n. 6, p. 501–506, jun. 2007.

CHAN, W. K.; TAN, L. T.; CHAN, K. G.; LEE, L. H.; GOH, B. H. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. *Molecules*, v. 21, n. 5, p. 1-40, 2016.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, v. 17, n. 2, p. 149-151, 2010.

CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal*, 66, 212-229, 2011.

CHEN, S.; ZHANG, L.; CAI, X.; LI, X.; BIAN, L.; LUO, Z.; LI, Z.; CHEN, Z.; XIN, Z. (E)-Nerolidol is a volatile signal that induces defenses against insects and pathogens in tea plants. *Horticulture research*, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2020.

CHO, K. S.; LIM, Y. R.; LEE, K.; LEE, J.; LEE, J. H.; LEE, I. S. Terpenes from forests and human health. *Toxicological Research*, v. 33, n. 2, p. 97-106, 2017.

COELHO-DE-SOUZA, L. N.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DE ABREU MATOS, F. J.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. Relaxant effects of the essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and its main constituent 1,8-cineole on guinea-pig tracheal smooth muscle. *Planta medica*, v. 71, n. 12, p. 1173-1175, 2005.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York Botanical Garden, Columbia University Press, New York. p. 639-642, 1981.

DAHAM, S. S.; TABANA, Y. M.; IQBAL, M. A.; AHAMED, M. B.; EZZAT, M. O.; MAJID, A. S.; MAJID, A. M. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, v. 20, n. 7, p. 11808-11829, 2015.

DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BALDWIN, I. T.; KESSLER, A. Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. *Current opinion in biotechnology*, v. 14, n. 2, p. 169-176, 2003.

DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; KÖLLNER, T. G.; FREY, M.; GIERL, A.; GERSHENZON, J.; HIBBARD, B. E.; ELLERSIECK, M. R.; TURLINGS, T. C. J. Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 32, p. 13213-13218, 2009.

DHAR, P.; CHAN, P.; COHEN, D. T.; KHAWAM, F.; GIBBONS, S.; SNYDER-LEIBY, T.; DICKSTEIN, E.; RAI, P. K.; WATAL, G. Synthesis, antimicrobial evaluation, and structure–activity relationship of α -pinene derivatives. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 62, n. 16, p. 3548-3552, 2014.

DIAS, C. N.; ALVES, L. P.; RODRIGUES, K. A.; BRITO, M. C.; ROSA, C. DOS. S.; DO AMARAL, F. M.; MONTEIRO, O. DOS S.; ANDRADE, E. H.; MAIA, J. G.; MORAES, D. F. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help’. *Trends in plant science*, v. 15, n. 3, p. 167-175, 2010.

DILLMANN, J. B.; COSSETIN, L. F.; DE GIACOMETI, M.; OLIVEIRA, D.; DE MATOS, A. F. I. M.; AVRELLA, P. D.; GARLET, Q. I.; HEINZMANN, B. M.; MONTEIRO, S. G. Adulticidal Activity of *Melaleuca alternifolia* (Myrtales: Myrtaceae) Essential Oil With High 1, 8-Cineole Content Against Stable Flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 2020.

DORAN, J. C.; MATHESON, A. C. Genetic parameters and expected gains from selection for monoterpene yields in Petford *Eucalyptus camaldulensis*. *New Forests*, v. 8, n. 2, p. 155-167, 1994.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, v. 198, n. 1, p. 16-32, 2013.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D. A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical reviews in plant sciences*, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.

EBADOLLAHI, A.; SENDI, J. J.; MAROUFPOOR, M.; RAHIMI-NASRABADI, M. Acaricidal potentials of the terpene-rich essential oils of two Iranian *Eucalyptus* species against *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Oleo Science*, v. 66, n. 3, p. 307-314, 2017.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, v. 18, p. 586-608, 1964.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

FARAG, R. S.; DAW, Z. Y.; MAHASSEN, M. A.; SAFAA, H. M. Biochemical and biological studies on some tea trees (*Melaleuca* spp.) essential oil. *Adv Food Sci*, v. 20, p. 153-162, 1998.

FARAG, R. S.; SHALABY, A. S.; EL-BAROTY, G. A.; IBRAHIM, N. A.; ALI, M. A.; HASSAN, E. M. Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 1, p. 30-35, jan. 2004.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European journal of pharmacology*, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FILOMENO, C. A.; BARBOSA, L. C. A.; TEIXEIRA, R. R.; PINHEIRO, A. L.; FARIAS, E. DE S.; FERREIRA, J. S.; PICANÇO, M. C. Chemical diversity of essential oils of Myrtaceae species and their insecticidal activity against *Rhyzopertha dominica*. *Crop Protection*, v. 137, p. 105309, 2020.

FISCHER, D. C. H.; LIMBERGER, R. R.; HENRIQUES, A. T.; MORENO, P. R. H. Essential oils from Leaves of Two *Eugenia brasiliensis* Specimens from Southeastern Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, v. 17, n. 5, p. 499–500, set. 2005.

FLORA DO BRASIL. 2020, under construction. JardimBotânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. (Accessed 4 oCTOBER 2020).

FROST, C. J.; APPEL, H. M.; CARLSON, J. E.; DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C.; SCHULTZ, J. C. Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores. *Ecology Letters*, v. 10, n. 6, p. 490-498, 2007.

GARCÍA-DÍAZ, E.; TREJO, R.; TAFOYA, F.; ARAGÓN-GARCÍA, A.; ELIZALDE-GONZÁLEZ, M. P. Profile of terpenoid compounds mediating a plant-herbivore interaction: screening by Static Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography/QToF-Mass Spectrometry. *Chemistry & Biodiversity*, 2020.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MANNELLI, L. D. C.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Il Farmaco*, v. 56, n. 5-7, p. 387-389, 2001.

GOODGER, J. Q.; WOODROW, I. E. Genetic determinants of oil yield in *Eucalyptus polybractea* RT Baker. *Trees*, v. 26, n. 6, p. 1951-1956, 2012.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F. R. World checklist of Myrtaceae. *Royal Botanic Gardens*, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R. E.; MYBURG, A. A. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. v. 8, p. 463–508, 2012.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. 3(2005), 509–530, 2006.

GUIMARÃES, A. C.; MEIRELES, L. M.; LEMOS, M. F.; GUIMARÃES, M. C. C.; ENDRINGER, D. C.; FRONZA, M.; SCHERER, R. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*, v. 24, n. 13, p. 2471, 2019.

GUTIÉRREZ R. M. P., MITCHELL S., SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, n. 1, p. 1-27, 2008.

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L.; GOMEZ-CANSINO, R.; GARCÍA-ZEBADÚA, J. C.; JIMÉNEZ-PÉREZ, N. C.; REYES-CHILPA, R. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, n. 2, p. 673-679, 2012.

HAI, H. N. T.; RIMBAWANTO, A.; PRASTYONO; KARTIKAWATI, N. K.; WU, H. Genetic improvement for essential oil yield and quality in *Melaleuca cajuputi*. *Industrial Crops and Products*, v. 137, p. 681-686, 2019.

HART, P. H.; BRAND, C.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; PRAGER, R. H.; FINLAY-JONES, J. J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*, v. 49, n. 11, p. 619–626, 2000.

HASSAN, H. B.; GALI-MUHTASIB, H.; GÖRANSSON, H.; LARSSON, R. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappaB signalling, *Anticancer Res.*, v. 30, n. 6, p. 1911-1919, 2010.

HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. *New Phytologist*, v. 204, n. 2, p. 297-306, 2014.

HEIL, M.; KARBAN, R. Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends in ecology & evolution*, v. 25, n. 3, p. 137-144, 2010.

HENERY, M. L.; MORAN, G. F.; WALLIS, I. R.; FOLEY, W. J. Identification of quantitative trait loci influencing foliar concentrations of terpenes and formylated phloroglucinol compounds in *Eucalyptus nitens*. *New phytologist*, v. 176, n. 1, p. 82-95, 2007.

HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M.; BRIDI, R.; VÉRIN, P.; MENUT, C.; LAMATY, G.; BESSIÈRE, J. M. Essential Oils from Five Southern Brazilian Species of *Myrcia* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 9, n. 1, p. 13–18, jan. 1997.

HOLLINGSWORTH, R. G. Limonene, a citrus extract, for control of mealybugs and scale insects. *Journal of economic entomology*, v. 98, n. 3, p. 772-779, 2005.

HOLOPAINEN, J. K.; HIMANEN, S. J.; YUAN, J.; CHEN, F.; NEAL, C.; CONTENTS, S. Ecological functions of terpenoids in changing climates. *Natural Products*, p. 2913-2940, 2013.

HOMER, L. E.; LEACH, D. N.; LEA, D.; SLADE LEE, L.; HENRY, R. J.; BAVERSTOCK, P. R. Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 28, n. 4, p. 367-382, 2000.

HUANG, M.; SANCHEZ-MOREIRAS, A. M.; ABEL, C.; SOHRABI, R.; LEE, S.; GERSHENZON, J.; THOLL, D. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytologist*, v. 193, n. 4, p. 997-1008, 2012.

IQBAL, Z.; HUSSAIN, A. I.; HUSSAIN, A.; ASHRAF, M. Y. Genetic variability to essential oil contents and composition in five species of *Eucalyptus*. *Park. J. Bot.*, v. 35, n. 5, p. 843–852, 2003.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology - Gold Book: Version 2.3.3 2014-02-24. Disponível em: <https://goldbook.iupac.org/src/src_PAC1995671307.html>. Acesso em 27 set. 2020.

JUERGENS, U. R. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug Research*, v. 64, n. 12, p. 638-646, 2014.

JUERGENS, U. R.; STÖBER, M.; SCHMIDT-SCHILLING, L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1.8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. *European journal of medical research*, v. 3, p. 407-412, 1998.

JUNKER, R. R.; BLÜTHGEN, N. Floral scents repel facultative flower visitors, but attract obligate ones. *Annals of botany*, v. 105, n. 5, p. 777-782, 2010.

JUNKER, R. R.; BLÜTHGEN, N. Floral scents repel potentially nectar-thieving ants. *Evolutionary Ecology Research*, v. 10, n. 2, p. 295-308, 2008.

KAINER, D.; LANFEAR, R.; FOLEY, W. J.; KÜLHEIM, C. Genomic approaches to selection in outcrossing perennials: focus on essential oil crops. *Theoretical and applied genetics*, v. 128, n. 12, p. 2351-2365, 2015.

KAINER, D.; PADOVAN, A.; DEGENHARDT, J.; KRAUSE, S.; MONDAL, P.; FOLEY, W. J., KÜLHEIM, C. High marker density GWAS provides novel insights into the genomic architecture of terpene oil yield in *Eucalyptus*. *New Phytologist*, v. 223, n. 3, p. 1489-1504, 2019.

KAINER, D.; STONE, E. A.; PADOVAN, A.; FOLEY, W. J.; KÜLHEIM, C. Accuracy of genomic prediction for foliar terpene traits in *Eucalyptus polybractea*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v. 8, n. 8, p. 2573-2583, 2018.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *Journal of the American oil chemists' society*, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.

KESSLER, A.; HEIL, M. The multiple faces of indirect defences and their agents of natural selection. *Functional Ecology*, v. 25, n. 2, p. 348-357, 2011.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; CARTER, R.; KÖLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. *Phytochemistry*, v. 71, n. 8, p. 844-852, 2010.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; FOLEY, W. J. A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. *Australian Journal of Botany*, v. 56, n. 3, p. 197-213, 2008.

KIM, D. S.; LEE, H. J.; JEON, Y. D.; HAN, Y. H.; KEE, J. Y.; KIM, H. J.; SHIN, H. J.; KANG, J.; LEE, B. S.; KIM, S. H.; KIM, S. J.; PARK, S. H.; CHOI, B. M.; PARK, S. J.; UM, J. Y.; HONG, S. H. Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *The American journal of Chinese medicine*, v. 43, n. 04, p. 731-742, 2015.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 43, n. 11, p. 2839-2845, 1995.

KING, D. J.; GLEADOW, R. M.; WOODROW, I. E. The accumulation of terpenoid oils does not incur a growth cost in *Eucalyptus polybractea* seedlings. *Functional Plant Biology*, v. 33, n. 5, p. 497-505, 2006.

KNUDSEN, J. T.; ERIKSSON, R.; GERSHENZON, J.; STAHL, B. Diversity and distribution of floral scent. *The botanical review*, v. 72, n. 1, p. 1, 2006.

KOCHUMMEN, K. M.; LAFRANKIE, J. J. V.; MANOKARAN, N. Floristic composition of Pasoh Forest Reserve, a lowland rain forest in Peninsular Malaysia. *J. Trop. For. Sci.* v. 3, p. 1–13.1990.

KÜLHEIM, C.; PADOVAN, A.; HEFER, C.; KRAUSE, S. T.; KÖLLNER, T. G.; MYBURG, A. A.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. The Eucalyptus terpene synthase gene family. *BMC Genomics*, v. 16, n. 1, p. 450, dez. 2015.

KÜLHEIM, C.; YEOH, S. H.; WALLIS, I. R.; LAFFAN, S.; MORAN, G. F.; FOLEY, W. J. The molecular basis of quantitative variation in foliar secondary metabolites in *Eucalyptus globulus*. *New Phytologist*, v. 191, n. 4, p. 1041-1053, 2011.

KULSAR, T. A.; DEXTER, K. G.; LOKVAM, J.; PENNINGTON, R. T.; RICHARDSON, J. E.; WEBER, M. G.; MURAKAMI, E. T.; DRAKE, C.; RUTH MCGREGOR, R.; COLEY, P.D. The evolution of antiherbivore defenses and their contribution to species coexistence in the tropical tree genus *Inga*. *PNAS*, v. 106, n. 43 p. 18073–18078, 2009.

LANDRUM, L. R. Flora Neotropica *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium*, and *Luma* (Myrtaceae). The New York Botanical Garden New York, 1986. 179p.

LAWLER, I. R.; STAPLEY, J.; FOLEY, W. J.; ESCHLER, B. M. Ecological example of conditioned flavor aversion in plant–herbivore interactions: Effect of terpenes of *Eucalyptus* leaves on feeding by common ringtail and brushtail possums. *Journal of Chemical Ecology*, v. 25, n. 2, p. 401-415, 1999.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 59, n. 12, p. 1643-1647, 2007.

LEITE, M. P.; FASSIN JR.; J., BAZILONI, E. M. F.; ALMEIDA, R. N.; MATTEI, R.; LEITE, J. R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v. 18, supl. p. 661-666, 2008.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, C. D.; MORAES, J. C.; NÉRI, D. K. P.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência e Agrotecnologia*. V.33, p.1777-1781, 2009.

LIU, X. C.; LI, Y. P.; LI, H. Q.; DENG, Z. W.; ZHOU, L.; LIU, Z. L.; DU, S. S. Identification of repellent and insecticidal constituents of the essential oil of *Artemisia rupestris* L. aerial parts against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. *Molecules*, v. 18, n. 9, p. 10733-10746, 2013.

LOPES, P. M.; SILVA, A. C. R.; AZEVEDO, M. M. B.; COSTA, D. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Biological Activities of α -Pinene and [β]-Pinene Enantiomers. *Molecules*, v. 17, n. 6, p. 6305, 2012.

LORETO, F.; DICKE, M.; SCHNITZLER, J. P.; TURLINGS, T. C. J. Plant volatiles and the environment. *Plant, cell & environment*, v. 37, n. 8, p. 1905-1908, 2014.

LORETO, F.; SCHNITZLER, J. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in plant science*, v. 15, n. 3, p. 154-166, 2010.

LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, p. 480-503, 1996.

MACÊDO ANDRADE, A. C.; ROSALEN, P.; FREIRES, I. A.; SCOTTI, L. Antifungal activity, mode of action, docking prediction and anti-biofilm effects of (+)- β -pinene enantiomers against *Candida* spp. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 18, n. 29, p. 2481-2490, 2018.

MAGALHÃES, P. J. C., CRIDDLE, D. N., TAVARES, R. A., MELO, E. M., MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 12, n. 3, p. 172-177, 1998.

MCCALL, A. C.; IRWIN, R. E. Florivory: the intersection of pollination and herbivory. *Ecology letters*, v. 9, n. 12, p. 1351-1365, 2006.

MCCORMICK, A. C.; GERSHENZON, J.; UNSICKER, S. B. Little peaks with big effects: establishing the role of minor plant volatiles in plant–insect interactions. *Plant, cell & environment*, v. 37, n. 8, p. 1836-1844, 2014.

MCCORMICK, A. C.; UNSICKER, S. B.; GERSHENZON, J. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends in plant science*, v. 17, n. 5, p. 303-310, 2012.

MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, v. 7, n. 7, p. 1015, 1995.

MECKES, M., CALZADA, F., TORTORIELLO, J., GONZÁLEZ, J.L. AND MARTÍNEZ, M. Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system. *Phytotherapy Research*, v. 10, n. 7, p. 600-603, 1996.

MENDES, L. A.; MARTINS, G. F.; VALBON, W. R.; SOUZA, T. S.; MENINI, L.; FERREIRA, A. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. *Industrial Crops and Products*, v. 108, p. 684–689, dez. 2017.

MENDES, L. A.; NOIA, L. R.; TULER, A. C.; PEIXOTO, A. L.; FERREIRA, M. F. S. Óleos essenciais em Myrtaceae. In.: *Tópicos Especiais em Produção Vegetal VI*. 1ed. Alegre: CAUFES, 2016, p. 110-144

MENDES, L. A.; SOUZA, T. S.; MENINI L.; GUILHEN, J. H. S.; BERNARDES, C. O.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S. Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil. *SCIENTIA HORTICULTURAE*, v. 238, p. 295-302, 2018.

MENEZES, I. A. C.; MOREIRA, I. J.; DE PAULA, J. W.; BLANK, A. F.; ANTONIOLLI, A. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTOS, M. R. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, n. 2, p. 215-221, 2010.

METCALF, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of the Dicotyledons Vol. II*. Clarendon Press, Oxford, 1067-1074, 1950.

MOORE, B. D.; ANDREW, R. L.; KÜLHEIM, C; FOLEY, W. J. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*, v. 201, n. 3, p. 733-750, 2014.

MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F. C.; SANTOS, R. C.; ROCHA, L. R. M.; MARQUES, M. O.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, v. 180, n. 3, p. 499-505, 2009.

MURRAY, M. J.; REITSEMA, R. H. The genetic basis of the ketones, carvone, and menthone in *Mentha crispata* L. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, v. 43, n. 10, p. 612-613, 1954.

NASCIMENTO, K. F.; MOREIRA, F. M. F.; SANTOS, J. A.; KASSUYA, C. A. L.; CRODA, J. H. R.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. D. C.; GÓIS RUIZ, A. L. T.; ANN FOGGIO, M.; DE CARVALHO, J. E.; FORMAGIO, A. S. N. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 210, p. 351-358, 2018.

O'REILLY-WAPSTRA, J. M.; FREEMAN J. S.; DAVIES, N. W.; VAILLANCOURT, R. E.; FITZGERALD, H.; POTTS, B. M. Quantitative trait loci for foliar terpenes in a global eucalypt species. *Tree Genetics & Genomes*, v. 7, n. 3, p. 485-498, 2011.

OLIVEIRA, C. C.; DE OLIVEIRA, C. V.; GRIGOLETTO, J.; RIBEIRO, L. R.; FUNCK, V. R.; GRAUNCKE, A. C.; DE SOUZA, T. L.; SOUTO, N. S.; FURIAN, A. F.; MENEZES, I. R.; OLIVEIRA, M. S. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy & Behavior*, v. 56, p. 26-31, 2016.

OLIVEIRA-FILHO, A. T., FONTES, M. A. L. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. *Biotropica* v. 32, p. 793-810, 2000.

OTTO, L. G.; MONDAL, P.; BRASSAC, J.; PREISS, S.; DEGENHARDT, J.; HE, S.; REIF, J. C.; SHARBEL, T. F. Use of genotyping-by-sequencing to determine the genetic structure in the medicinal plant chamomile, and to identify flowering time and alpha-bisabolol associated SNP-loci by genome-wide association mapping. *BMC genomics*, v. 18, n. 1, p. 599, 2017.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W. J. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. *Phytochemistry Reviews*, v. 13, n. 3, p. 695-716, 2014.

PADOVAN, A.; WEBB, H.; MAZANEC, R.; GRAYLING, P.; BARTLE, J.; FOLEY, W. J.; KÜLHEIM, C. Association genetics of essential oil traits in *Eucalyptus loxophleba*: explaining variation in oil yield. *Molecular Breeding*, v. 37, n. 6, p. 73, 2017.

PÁJARO-CASTRO, N.; FLECHAS, M. C.; OCAZIONEZ, R.; STASHENKO, E.; OLIVERO-VERBEL, J. Potential interaction of components from essential oils with dengue virus proteins. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 14, n. 3, p. 141-155, 2015.

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant physiology*, v. 114, n. 4, p. 1161-1167, 1997.

PARK, M. J.; GWAK, K. S.; YANG, I.; KIM, K. W.; JEUNG, E. B.; CHANG, J. W.; CHOI, I. G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, v. 80, n. 5, p. 290-296, jul. 2009.

PATNAIK S.; SUBRAMANYAM V. R.; BAPAJI M.; KOLE C. R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, v. 89, n. 358, p. 39, 1997.

PEREIRA, A. I. S.; PEREIRA, A. G. S.; LOPES SOBRINHO, O. P.; CANTANHEDE, E. K. P.; SIQUEIRA, L. F. D. Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. *Educación química*, v. 25, n. 4, p. 446-449, 2014.

PICHERSKY, E.; RAGUSO, R. A. Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytologist*, v. 220, n. 3, p. 692-702, 2018.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; OLIVEIRA, M. G. B.; SANTANA, M. F.; SANTANA, M. T.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, J. S.; DE SOUZA, D. P.; ALMEIDA, R. N. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. *Pharmaceutical Biology*, v. 49, n. 6, p. 583-586, 2011.

RAMAN, A.; WEIR, U.; BLOOMFIELD, S. F. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 21, n. 4, p. 242-245, 1995.

RASMANN, S.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSSHENZON, J.; TURLINGS, T. C. J. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, v. 434, n. 7034, p. 732-737, 2005.

REHMAN, M. U.; TAHIR, M.; KHAN, A. Q.; KHAN, R.; ODAY-O-HAMIZA; LATEEF, A.; HASSAN, S. K.; RASHID, S.; ALI, N.; ZEESHAN, M.; SULTANA, S. D-limonene suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation via repression of COX-2, iNOS, and NF κ B in kidneys of Wistar rats. *Experimental biology and medicine*, v. 239, n. 4, p. 465-476, 2014.

RIVERA-YAÑEZ, C. R.; TERRAZAS, L. I.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; CAMPOS, J. E.; FLORES-ORTIZ, C. M.; HERNANDEZ, L. B.; CRUZ-SANCHEZ, T.; GARRIDO-FARIÑA, G. I.; RODRIGUEZ-MONROY, M. A.; CANALES-MARTINEZ, M. M. Anti-Candida activity of *Bursera morelensis* Ramirez essential oil and two compounds, α -pinene and γ -terpinene—an in vitro study. *Molecules*, v. 22, n. 12, p. 2095, 2017.

ROBERT, C. A. M.; ERB, M.; HILTPOLD, I.; HIBBARD, B. E.; GAILLARD, M. D. P.; BILAT, J.; DEGENHARDT, J.; CAMBET-PETIT-JEAN, X.; TURLINGS, T. C. J.; ZWAHLEN, C. Genetically engineered maize plants reveal distinct costs and benefits of constitutive volatile emissions in the field. *Plant Biotechnology Journal*, v. 11, n. 5, p. 628-639, 2013.

RUNYON, J. B.; MESCHER, M. C.; DE MORAES, C. M. Volatile chemical cues guide host location and host selection by parasitic plants. *Science*, v. 313, n. 5795, p. 1964-1967, 2006.

SABINO, C. K. B.; FERREIRA-FILHO, E. S.; MENDES, M. B.; DA SILVA-FILHO, J. C.; PONTE, M. P. T. R.; MOURA, L. H. P.; OLIVEIRA, E. C. A.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; DOS SANTOS, M. R. V.; OLIVEIRA, R. C. M.; OLIVEIRA, A. P. Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 28, n. 5, p. 333-339, 2013.

SANTOS, M. Prospecção tecnológica da utilização do Beta-pineno. *Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias*, v. 3, n. 2, p. 186-194, 2013.

SCALVENZI, L. *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.) (Myrtaceae) essential oil from Amazonian Ecuador: A chemical characterization and bioactivity profile. *Molecules*, v. 22, n. 7, p. 1163-1175, 2017.

SCHEMSKE, D. W.; LANDE, R. Fragrance collection and territorial display by male orchid bees. *Animal Behaviour*, 1984.

SILVA, A. C. R.; LOPES, P. M.; AZEVEDO, M. M. B. A.; COSTA, D. C. M. C.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, v. 17, n. 6, p. 6305-6316, 2012.

SILVA, E. R. Efeitos fitotóxicos do extrato e do óleo essencial da serapilheira de *Eucalyptus saligna* (Myrtaceae) em espécies de campo. *Australian Journal of Botany*, v. 65, n. 2, p. 172-182, 2017.

SMITH, W. E. C.; SHIVAJI, R.; WILLIAMS, W. P.; LUTHE, D. S.; SANDOYA, G. V.; SMITH, C. L.; SPARKS, D. L.; BROWN, A. E. A maize line resistant to herbivory constitutively releases (E)- β -caryophyllene. *Journal of economic entomology*, v. 105, n. 1, p. 120-128, 2012.

SOLER, R.; HARVEY, J. A.; KAMP, A. F. D.; VET, L. E. M.; VAN DER PUTTEN, W. H.; VAN DAM, N. M.; STUEFER, J. F.; GOLDS, R.; HORDIJK, C. A.; MARTIJN BEZEMER, T. Root herbivores influence the behaviour of an aboveground parasitoid through changes in plant-volatile signals. *Oikos*, v. 116, n. 3, p. 367-376, 2007.

SOUSA, D. P.; QUINTANS JR, L.; DE ALMEIDA, R. N. Evolution of the anticonvulsant activity of α -terpineol. *Pharmaceutical Biology*, v. 45, n. 1, p. 69-70, 2007.

SOUSA, D. P.; RAPHAEL, E.; BROCKSOM, U.; BROCKSOM, T. J. Sedative effect of monoterpene alcohols in mice: a preliminary screening. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 62, n. 7-8, p. 563-566, 2007.

SOUTHWELL, I.; DOWELL, A.; MORROW, S.; ALLEN, G.; SAVINS, D.; SHEPERD, M. Monoterpene chiral ratios: Chemotype diversity and interspecific commonality in *Melaleuca alternifolia* and *M. linariifolia*. *Industrial Crops and Products*, v. 109, n. 15, p. 850-856, 2017.

SOUZA, C. F.; LIMA, T.; BALDISSERA, M. D.; GEIHS, M. A.; MACIEL, F. E.; NERY, L. E. M.; SANTOS, R. C. V.; RAFFIN, R. P.; HEINZMANN, B. M.; CARON, B. O.; BALDISSEROTTO, B. Nanoencapsulated *Melaleuca alternifolia* essential oil exerts anesthetic effects in the brachyuran crab using *Neohelice granulata*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 3, p. 2855-2864, 2018.

SOUZA, R. H. L.; CARDOSO, M. S. P.; MENEZES, C. T.; SILVA, J. P.; DE SOUSA, D. P.; BATISTA, J. P. Gastroprotective activity of α -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. *DARU: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, v. 19, n. 4, p. 277, 2011.

STAGGEMEIER, V. G.; CAZETTA, E.; MORELLATO, L. P. C. Hyperdominance in fruit production in the Brazilian Atlantic rain forest: The functional role of plants in sustaining frugivores. *Biotropica*, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2016.

STEFFEN, R. B., ANTONIOLLI, Z. I., STEFFEN, G. P. K.; DA SILVA, R. F. Essential oil of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden in stimulating mycorrhizal *Sibipiruna* seedlings (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.). *Ciencia Florestal*, v. 22, n. 1, p. 69-78, 2012.

STONE, C.; BACON, P. E. Relationships among moisture stress, insect herbivory, foliar cineole content and the growth of river red gum *Eucalyptus camaldulensis*. *Journal of Applied Ecology*, p. 604-612, 1994.

SUSANTO, M.; DORAN, J.; ARNOLD, R.; RIMBAWANTO, A. Genetic variation in growth and oil characteristics of *Melaleuca cajuputi* subsp. *cajuputi* and potential for genetic improvement. *Journal of Tropical Forest Science*, p. 469-482, 2003.

THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In: *Biotechnology of isoprenoids*. Springer, Cham, p. 63-106, 2015.

THORNHILL, A. H., HO, S. Y., KÜLHEIM, C., CRISP, M. D. Interpreting the modern distribution of Myrtaceae using a dated molecular phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 93, p. 29-43, 2015.

TURLINGS, T. C. J.; HILTPOLD, I.; RASMANN, S. The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. *Plant and Soil*, v. 358, n. 1-2, p. 51-60, 2012.

URQUÍA, D.; GUTIÉRREZ, B.; POZO, G.; POZO, M. J.; ESPÍN, A.; TORRES, M. L. *Psidium guajava* in the Galapagos Islands: population genetics and history of an invasive species. *PloS one*, v. 14, n. 3, p. e0203737, 2019.

VASCONCELOS, T. N. C.; PRENNER, G.; LUCAS, E. J. A systematic overview of the floral diversity in Myrteae (Myrtaceae). *Systematic Botany*, v. 44, n. 3, p. 570-591, 2019.

VASCONCELOS, T. N. C.; PROENÇA, C. E. B.; AHMAD, B.; AGUILAR, D. S.; AGUILAR, R.; AMORIM, B. S.; CAMPBELL, K.; COSTA, I. R.; DE-CARVALHO, P. S.; FARIA, J. E. Q.; GIARETTA, A.; KOIJ, P. W.; LIMA, D. F.; MAZINE, F. F.; PEGUERO, B.; PRENNER, G.; SANTOS, M. F.; SOEWARTO, J.; WINGLER, A.; LUCAS, E. J. Myrteae phylogeny, calibration, biogeography

and diversification patterns: Increased understanding in the most species rich tribe of Myrtaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 109, p. 113–137, 2017.

VISSER, J. H. Host odor perception in phytophagous insect. *Ann. Rev. Entmol.*, v. 31, p. 121-144, 1986.

WCSP. 2020. World checklist of selected plant families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://apps.kew.org/wcsp/>.

WEBB, H.; LANFEAR, R.; HAMILL, J.; FOLEY, W. J.; KÜLHEIM, C. The yield of essential oils in *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) is regulated through transcript abundance of genes in the MEP pathway. *PLoS One*, v. 8, n. 3, 2013.

WILLMER, P. G.; NUTTMAN, C. V.; RAINE, N. E.; STONE, G. N.; PATTRICK, J. G.; HENSON, K.; STILLMAN, P.; MCILROY, L.; POTTS, S. G.; KNUDSEN, J. T. Floral volatiles controlling ant behaviour. *Functional Ecology*, v. 23, n. 5, p. 888-900, 2009.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. Myrtaceae revisited: A reassessment of infra familial groups. *Am J Bot* v. 88: p. 2013–2025, 2001.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

YANG, Z.; WU, N.; FU, Y.; YANG, G.; WANG, W.; ZU, Y.; EFFERTH, T. Anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of 1, 8-cineole: Effect on nucleocapsid (N) protein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 28, n. 3, p. 323-330, 2010.

ZAKA, S. M.; ZENG, X.; WANG, H. Chemotaxis of adults of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, to volatile terpenes detected from guava leaves. *Pakistan Journal of Zoology*, v. 47, n. 1, p. 153-159, 2015.

ZANDI-SOHANI, N.; HOJJATI, M.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Insecticidal and repellent activities of the essential oil of *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Neotropical entomology*, v. 42, n. 1, p. 89-94, 2013.

ZAPPI, D. C. & BFG - THE BRAZIL FLORA GROUP et al. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZULAK, K. G.; BOHLMANN, J. Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 52, n. 1, p. 86-97, 2010.

Capítulo 07

ASPECTOS EPIGENÉTICOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PLANTAS

Cristiana Torres Leite

Elias Terra Werner

João Paulo de Moraes Oliveira

Aline dos Santos Bergamin

Milene Miranda Praça Fontes

1. INTRODUÇÃO

A Cultura de Tecidos Vegetais (CTV) é um conjunto de técnicas biotecnológicas para estabelecer, manter e multiplicar células, tecidos, órgãos e até plantas inteiras sob controle e condições assépticas para gerar mais plantas em um período mais curto do que os métodos convencionais (SHAHZAD et al., 2017). A CTV tem sido utilizada com grande sucesso na agroindústria para a produção de frutas, plantas ornamentais e medicinais, e até espécies florestais. Os dois métodos mais comumente utilizados na CTV para a regeneração de plantas *in vitro* são a Organogênese e a Embriogênese Somática (ES).

Na ES o embrião surge assexuadamente a partir de um explante vegetativo (somático), em que células somáticas, adequadamente induzidas, tem a capacidade de desenvolver-se em plantas sem a fusão de gametas, num processo morfogênético que se aproxima da sequência de eventos representativos da embriogênese zigótica (VON ARNOLD et al., 2002), apresentando, inclusive, estádios de desenvolvimento embrionário similares. A ES é uma via de regeneração vegetal que envolve uma série de mecanismos multifatoriais complexos, influenciada por hormônios endógenos, mas principalmente induzida por Reguladores de Crescimento Vegetal (*PGR*) exógenos (JIMÉNEZ, 2005).

Portanto, na ES uma célula somática pode se desenvolver em uma célula totipotente, indiferenciada e embriogênica, e a célula embriogênica pode gerar todas as células, formando um embrião somático, que mais tarde se torna uma

planta completa e funcional. As diferentes condições (endógena ou exógena) podem influenciar os padrões metabólicos, a expressão gênica e os mecanismos epigenéticos do explante, estimulando uma célula (ou um grupo de células) a mudar sua natureza (Figura 1) (OSORIO-MONTALVO et al., 2018).

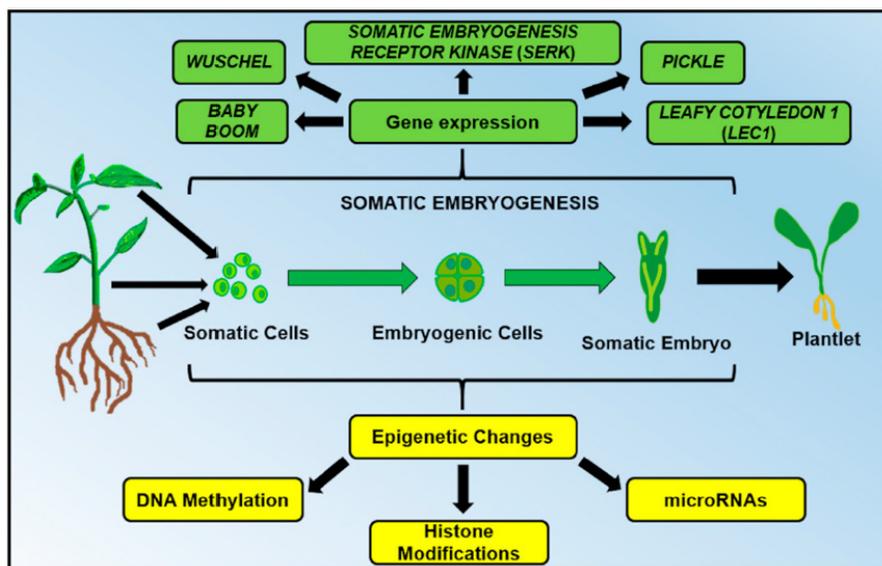


Figura 1. Na embriogênese somática de plantas, mecanismos genéticos (verde) e epigenéticos (amarelo) induzem o desenvolvimento de células embriogênicas a partir de qualquer explante (células isoladas de folhas, brotos ou raízes). Devido às propriedades de totipotencialidade das células vegetais, um grupo de células embriogênicas pode se desenvolver em uma plântula completa e funcional. Fonte: OSORIO-MONTALVO et al., 2018.

Para obtenção do embrião somático um número limitado de genes é expresso. Na Figura 1 são citados os genes que são ativados especificamente ou diferencialmente expressos durante a ES, como os genes *BABY BOOM1* (*BBM1*) e *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*), cruciais para a indução da ES e diferenciação celular. Os genes *LEC* são expressos após a célula atingir o potencial de desdiferenciação, e aumentam o nível de auxina endógena, que consequentemente regula positivamente a expressão dos genes *WUSCHEL* (*WUS*) e *SOMATIC*

EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK), que também estimulam o desenvolvimento de embriões somáticos quando expressos. O gene regulador *PICKLE (PKL)* induz a expressão dos genes *LEC* durante a ES controlando vários processos fisiológicos que promovem a competência embrionária (KUMAR & VAN STADEN, 2017).

Por outro lado, a ES também é controlada pela reprogramação da expressão gênica, onde genes específicos desta via são ativados ou desativados (FEHÉR et al., 2003; KARAMI et al., 2009; TANG et al., 2020). A reprogramação gênica é modulada de acordo com os diferentes níveis de compactação da cromatina, como a heterocromatina (mais compactada) e a eucromatina (menos compactada) (CHEUNG & LAU, 2005; FINNEGAN et al., 1998; NOWAK et al., 2020). A cromatina pode ser remodelada devido aos mecanismos epigenéticos, entre eles a metilação do DNA, a modificação de histonas e os miRNAs (BIRD, 2007; CHEN et al., 2010; FEIL, 2009; ROTTACH et al., 2009). O termo epigenética refere-se a alterações genéticas que ocorrem durante a expressão gênica e que são independentes da sequência de DNA (BERGER et al., 2009; HAIG, 2004; ZHANG & HSIEH, 2013). Para regular a expressão gênica no desenvolvimento de plantas, diferentes modificações epigenéticas interagem extensivamente após complexas interações mútuas (WÓJCIKOWSKA et al., 2020).

Em virtude do genoma das plantas apresentarem pouca ou nenhuma alteração durante o seu desenvolvimento, os mecanismos epigenéticos, por serem suscetíveis às condições ambientais, podem manter o silenciamento de genes expressos ou a ativação de genes que foram silenciados anteriormente (CHEUNG & LAU, 2005; PASZKOWSKI & WHITHAM, 2001; WOLFFE & MATZKE, 1999; WÓJCIKOWSKA et al., 2020). A atuação dos diferentes mecanismos epigenéticos tem sido estudado durante o desenvolvimento de plantas *in vitro* (DELA-PENA et al., 2012; KAEPLER & PHILLIPS, 1993; MIGUEL & MARUM, 2011; SMYKAL et al., 2007; VALLEDOR et al., 2007; WANG et al., 2020; YANG et al., 2013). Este capítulo tratará da metilação do DNA, das modificações de histonas e dos miRNAs por desempenharem papéis fundamentais na regulação do desenvolvimento de plantas (NOCEDA et al., 2009).

2. METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético essencial envolvido em diferentes processos biológicos, sendo um fator crucial que regula e mantém programas de expressão gênica (MILUTINOVIC et al., 2003). Além disso, desempenha um papel significativo de regulação da diferenciação e crescimento em plantas (KUMAR & VAN STADEN, 2017). A metilação do DNA é mediada pela adição de um grupo metil (CH_3) da S-adenosilmetionina (SAM) na posição 5' do anel pirimidina da citosina via ligação covalente, formando a 5-mC. A metilação pode ocorrer nas bases da citosina no CG, CNG ou CNN (onde N pode ser os nucleotídeos: C, A ou T) (GRIFFITHS et al., 2015). Nas plantas, as sequências CG são altamente metiladas, as sequências CHG moderadamente metiladas e sequências CHH são metiladas no menor nível (FENG et al., 2010). Para *Arabidopsis thaliana*, os níveis de metilação de DNA variam entre as sequências, sendo 24% CG, 6,7% CHG e 1,7% CHH (COKUS et al., 2008). A metilação nas sequências CG está concentrada na região dos genes codificadores de proteínas, tanto em eudicotiledôneas, quanto em monocotiledôneas (WATSON et al., 2014; YANG et al., 2014; HU et al., 2014; YAMAUCHI et al., 2014). A metilação do DNA é catalisada por diferentes enzimas denominadas: DNA citosina metiltransferase (*DCMT*), domínios reorganizados por metiltransferase (*DRM*), metiltransferase (*MET*) e cromometilase (*CMT*). As enzimas *DRM1* e *DRM2* são responsáveis pela metilação *de novo* pela via de metilação direcionada ao miRNA e as *MET1* e *CMT1* são responsáveis pela manutenção da metilação através da replicação do DNA (CAO & JACOBSEN 2002; FEHÉR, 2015). A desmetilação ativa de metilcitosinas é catalisada por enzimas da família das DNA glicosilases DEMETER (*DME*) (FEHÉR, 2015).

Durante o desenvolvimento de plantas *in vitro*, a metilação do DNA desempenha um papel fundamental na desdiferenciação celular, na rediferenciação, na formação de embriões somáticos e no crescimento das plântulas (HE et al., 2011; ELMEEER, 2013; JOSHI et al., 2013; NIC-CAN et al., 2013; FEHÉR, 2015). Durante a embriogênese somática, tanto um alto nível de metilação (hipermetilação) quanto um baixo nível de metilação (hipometilação) influenciam no desenvolvimento embrionário somático (CHAKRABARTY et al., 2003; LELJAK-LEVANIĆ et

al., 2004; NIC-CAN et al., 2013; KWIATKOWSKA et al., 2014). Alguns estudos mostraram que a hipermetilação está associada com as maiores taxas de embriogênese somática e que a hipometilação está associada com a repressão, porém alguns autores relatam o contrário. Estudos apontam que o tempo em cultivo e os componentes do meio de cultura *in vitro*, como os reguladores de crescimento, especialmente auxinas, compostos nitrogenados como L-prolina, glutamina e antibióticos também afetam o nível de metilação do DNA durante a embriogênese somática, alterando a expressão gênica (LOSCHIAVO et al., 1989; FRAGA et al., 2012). Abaixo serão apresentados alguns estudos que mostram a variação na metilação do DNA durante a embriogênese somática.

Um dos primeiros estudos que elucidaram a importância da metilação do DNA na embriogênese somática foi realizado por LoSchiavo et al. (1989). Os autores relataram hipermetilação em culturas de células de *Daucus carota* quando tratadas com auxinas e hipometilação quando a auxina era removida. Com a remoção da auxina no processo de embriogênese somática, o embrião se desenvolvia, no entanto, a metilação voltava a aumentar em estágios posteriores de embriogênese. Isto mostra uma correlação positiva entre a concentração da auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) e os níveis de metilação da citosina (LOSCHIAVO et al., 1989; MUNKSGAARD et al., 1995). Em *Cucurbita pepo* os autores observaram uma hipermetilação nas etapas iniciais do desenvolvimento embrionário e uma hipometilação durante a maturação dos embriões em meio tratado com agente hipometilante, 5-azacitidina (AzaC), sugerindo que a embriogênese pode ser induzida por fatores estressantes e por alterações nos níveis de metilação (LELJAK-LEVANIĆ et al., 2004). Em culturas celulares de *Acca sellowiana*, Fraga et al. (2012) também observaram que a hipermetilação do DNA estava associada à ES, visto que células cultivadas em meio com a adição de AzaC resultaram em hipometilação, porém a combinação de AzaC e 2,4-D elevaram o nível de metilação, resultando em indução de embriogênese somática. Em *Medicago truncatula*, a adição de AzaC também reduziu o nível de metilação do DNA nas células embriogênicas (SANTOS & FEVEREIRO, 2002). Em culturas de *Arabidopsis thaliana*, a metilação do DNA se manteve na presença de AzaC, porém a metilação também aumentou ao longo do tempo em culturas sem a adição de AzaC (TOKUJI et al. 2011). Ainda para *A. thaliana*, Kwiatkowska et al. (2014),

relataram a hipermetilação do DNA sendo associada com a formação de células embriogênicas. Da mesma forma, Nic-Can et al. (2013) também relatam que altos níveis de metilação do DNA aumentavam a indução da ES e o desenvolvimento de embriões somáticos em *Coffea canephora*. No estudo realizado por Luan et al. (2020), o uso de AzaC inibiu significativamente a diferenciação de gemas adventícias e aumentou o número de embriões globulares, aumentando a ES em *Ananas comosus*.

Resultados contrários no nível de metilação do DNA durante a ES foram observados, mostrando que uma diminuição nos níveis parece ser fundamental para o desenvolvimento embrionário em algumas espécies. Charkrabarty et al. (2003), estudando *Eleuterococcus senticosus*, observaram hipometilação nos calos embriogênicos em comparação com calos não embriogênicos, mostrando a necessidade de baixos níveis de metilação do DNA para a expressão de genes do desenvolvimento. Para *Castanea sativa*, foi necessário a desmetilação do DNA para a indução da ES e para o desenvolvimento de embriões somáticos (VIEJO et al., 2010). O mesmo foi observado para *Rosa hybrida*, em que eventos de desmetilação do DNA são frequentes nas fases de desdiferenciação celular ou na formação de calos embriogênicos (XU & KORBAN, 2004). Em *Pinus nigra*, as células com características embriogênicas também apresentaram níveis baixos de metilação do DNA (NOCEDA et al., 2009). O estudo de Rival et al. (2013) para *Elaeis guineenses*, demonstrou um efeito negativo da baixa metilação do DNA durante a ES, visto que não foi possível gerar embriões somáticos. Em genótipos de *Gossypium hirsutum*, o genótipo que apresentou uma alta capacidade de regenerar embriões apresentou hipometilação durante o seu processo de rediferenciação embriogênica (GUO et al., 2020). Outro exemplo, encontrado por Ji et al. (2019), é a hipermetilação de todo o genoma, incluindo regiões anteriormente silenciadas, durante a fase inicial de embriões no estágio globular da ES em *Glycine max*.

Além do papel da metilação do DNA durante a desdiferenciação e diferenciação celular, os níveis de metilação também contribuem para a regulação de genes relacionados à embriogênese somática. Níveis reduzidos de metilação dos mutantes *MET1* de *A. thaliana* foram associados com uma maior expressão do gene *WUS*, resultando em uma melhor regeneração de embriões (LI et al. 2011). Além disso, ainda para *A. thaliana*, os genes *LEC1*, *LEC2* e *BBM* foram

regulados positivamente nos mutantes *DRM1DRM2* e *DRM1DRM2CMT3*, sendo possível observar uma melhoria na ES (GRZYBKOWSKA et al., 2018). Em *C. canephora*, os autores também observaram uma modulação da expressão dos genes *WUS* e *LEC1* via metilação do DNA durante a fase inicial da embriogênese somática (NIC-CAN et al., 2013). No início da cultura, a metilação do DNA foi de 23,8% na fase de diferenciação, no dia 14, a metilação aumentou para 25,4%. Esses dados sugerem que a metilação do DNA estaria regulando a expressão desses genes e assim permitindo a diferenciação celular e o desenvolvimento embrionário (NIC-CAN et al., 2013). Portanto, os diferentes estudos apresentados acerca dos mecanismos epigenéticos, indicam que a metilação do DNA é dinâmica e confirma a sua importância durante todo o processo de embriogênese somática, geralmente através do silenciamento ou ativação de genes.

3. MODIFICAÇÃO DAS HISTONAS

Para entender como as modificações das histonas influenciam na expressão ou repressão de genes, primeiro é necessário entender a estrutura da cromatina. A cromatina é constituída por um complexo de proteínas e DNA (VAN HOLDE, 1998). As proteínas que se ligam ao DNA são divididas em histonas e proteínas cromossômicas não-histonas. As histonas estão presentes em proporções similares ao DNA e são responsáveis por empacotar e organizar o DNA em unidades estruturais denominadas nucleossomos, complexo de DNA – proteína (ALBERTS et al., 2010; NELSON & COX, 2014; GRIFFITHS et al., 2015).

Quatro histonas formam o cerne do nucleossomo, são elas: H2A, H2B, H3 e H4. Durante a formação do nucleossomo, as histonas ligam-se umas às outras para formar os dímeros: H3-H4 e H2A-H2B. Os dímeros H3-H4 combinam-se para formar um tetrâmero, que combinam a dois dímeros de H2A-H2B para formar o octâmero do cerne. O DNA fita dupla de aproximadamente 147 nucleotídeos é então enrolado ao redor do cerne de histonas, formando assim o nucleossomo (KORNBERG & LORCH, 1999). Cada partícula do cerne do nucleossomo é separada da outra por um segmento de DNA de ligação. O caminho do DNA ao redor do cerne de histonas é irregular, ou seja, são observadas várias dobras no DNA. Além do dobramento, cada histona do cerne apresenta uma “cauda” N-terminal

de aminoácidos que fica para fora do cerne de histona e do DNA e está sujeita a modificações pós-traducionais (ALBERTS et al., 2010). Uma histona adicional, a histona H1, conhecida como histona de ligação, liga-se a cada nucleossomo, compactando ainda mais o DNA nucleossômico. As histonas têm peso molecular entre 11.000 e 21.000 e são muito ricas nos aminoácidos básicos arginina e lisina. As histonas H3 e H4 apresentam sequências de aminoácidos praticamente idênticas em todos os eucariotos. As histonas H1, H2A e H2B apresentam menor similaridade de sequência entre as espécies de eucariotos (ALBERTS et al., 2010; NELSON & COX, 2014; GRIFFITHS et al., 2015).

As histonas estão entre as proteínas mais conservadas nos eucariotos, devido ao seu papel fundamental no controle da estrutura da cromatina. Essa conservação evolutiva sugere que a função das histonas está envolvida com praticamente todos os aminoácidos, de modo que a alteração em qualquer posição seria prejudicial para a célula. Mesmo com o elevado grau de conservação das histonas, alguns eucariotos apresentam variantes das histonas que diferem na sequência de aminoácidos. Além das variantes de histonas, diversas modificações podem ocorrer nas histonas principais, e isso permite controlar os aspectos críticos da estrutura e função da cromatina que desempenham papel regulador na expressão gênica (ALBERTS et al., 2010; FELSENFELD & GROUDINE, 2003). Essas modificações são reversíveis, porém podem afetar a carga elétrica líquida, a forma e outras propriedades das histonas, bem como as propriedades estruturais e funcionais da cromatina, participando na regulação da transcrição (ALBERTS et al., 2010).

As diversas possibilidades de modificações que ocorrem em vários locais das histonas, resultam em distintas funções reguladas pela cromatina (CHEUNG & LAU, 2005). Devido a isso, foi criado o código de histonas, onde as informações são armazenadas nos padrões de modificação de histonas e não na sequência de nucleotídeos (ALBERTS et al., 2010; NELSON & COX, 2014; GRIFFITHS et al., 2015). As modificações ocorrem nas cadeias laterais dos aminoácidos das quatro histonas do cerne, sendo a maioria nas “caudas” N-terminais, que são ricas em resíduos de aminoácidos como arginina, lisina e serina. Entre essas modificações, as mais estudadas são a acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação (ALBERTS et al., 2010; NELSON & COX, 2014; GRIFFITHS et al., 2015).

Abaixo serão tratadas as principais modificações de histonas.

3.1. Acetilação

A acetilação é uma das modificações de histonas mais bem caracterizadas, sendo altamente dinâmica e podendo ser reversível. Ela é regulada pela ação oposta de duas enzimas, a histona acetiltransferase (HATs) e a histona desacetilase (HDACs) (GRAESSLE et al., 2001). As HATs utilizam acetil-CoA como cofator e catalisam a transferência de um grupo acetil para o grupo amino das cadeias laterais da lisina (K). Ao fazer isso, ocorre a neutralização da carga positiva da lisina e isso promove o enfraquecimento das interações entre histonas e DNA (BANNISTER & KOUZARIDES, 2011). O que significa que as regiões da cromatina que estão superacetiladas costumam apresentar maior atividade de transcrição (GRIFFTHIS, 2015). Existem duas classes principais de HATs, as do tipo A e as do tipo B. As HATs do tipo A são enzimas mais diversas do que os do tipo Bs. Elas podem ser classificadas em três grupos, dependendo da homologia da sequência de aminoácidos e da sua estrutura conformacional, são elas GNAT, MYST e CBP/p300 (HODAWADEKAR & MARMORSTEIN, 2007; BANNISTER & KOUZARIDES, 2011). Já as HATs do tipo B são altamente conservadas e predominantemente histonas citoplasmáticas. Elas acetilam a histona H4 sintetizada recentemente na K5 e K12 e em alguns locais dentro da H3. De modo geral, cada uma dessas enzimas modifica vários locais dentro das caudas N-terminais da histona e em alguns locais no núcleo da histona globular (BANNISTER & KOUZARIDES, 2011).

A acetilação de histonas pode ser revertida pela ação das HDAC que atuam de forma oposta à HAT, restaurando a carga positiva da lisina. As HDACs criam uma conformação de cromatina condensada que reprime a transcrição (BANNISTER & KOUZARIDES, 2011; GRIFFTHIS, 2015). Existem quatro classes de HDAC: I, II, III e IV (YANG & SETO, 2007). Cada uma delas têm uma especificidade de substrato relativamente baixa, sendo que uma única enzima é capaz de desacetilar vários locais dentro das histonas (BANNISTER & KOUZARIDES, 2011). Em um estudo realizado por Zhang et al. (2020), os autores demonstraram que a inibição de HDAC afeta diminuindo a proliferação celular durante a formação de calos

a partir de embriões maduros de *Oryza sativa*, indicando que a desacetilação de histona é uma via de regulação durante a desdiferenciação celular.

3.2. Fosforilação

A fosforilação das histonas também é altamente dinâmica e ocorre principalmente nas caudas N-terminais dos aminoácidos serinas, treoninas e tirosinas (XHEMALCE et al., 2011). Os níveis das modificações são regulados por quinases que adicionam a modificação e por fosfatases que removem (OKI et al., 2007). As histonas quinases transferem um grupo fosfato de ATP para o grupo hidroxila da cadeia lateral do aminoácido alvo, adicionando uma carga negativa à histona. Assim como na acetilação, a redução da carga positiva tem o potencial de interromper as interações eletrostáticas entre histonas e DNA, facilitando a transcrição. A maioria dos locais de fosforilação de histonas está dentro das caudas N-terminais, porém também ocorre em alguns locais no núcleo da histona globular (BANNISTER & KOUZARIDES, 2011). A fosforilação da histona tende a ser muito específica para o local e existem poucos locais em comparação com os locais acetilados. A respeito do papel das histonas fosfatases, ainda pouco se sabe, devido a rotatividade extremamente rápida de fosforilações específicas de histonas (BANNISTER & KOUZARIDES, 2011).

3.3. Metilação

As histonas H3 e H4 podem sofrer modificações pela adição de um grupo metil nas cadeias laterais dos resíduos de lisina e arginina. Diferente da acetilação e da fosforilação, a metilação não altera a carga da histona. As metilações podem ser encontradas nas regiões ativas (eucromatina) e inativas da cromatina (heterocromatina), sendo que as cadeias laterais da lisina podem ser mono, di ou trimetiladas, enquanto as argininas podem ser mono e simetricamente ou assimetricamente dimetiladas (XHEMALCE et al., 2011; NG, 2009; BEDFORD & CLARKE, 2009; LAN & SHI, 2009). Essa metilação diferencial fornece uma diversidade funcional adicional a cada local da metilação (CHEUNG & LAU, 2005).

A primeira histona lisina metiltransferase (HKMT) a ser identificada foi o SUV39H1 que tem como alvo a histona 3 e a lisina 9 (H3K9) (REA et al., 2000). Após isso, novas HKMT foram identificadas e a maioria delas metilam lisinas N-terminais que apresentam um domínio chamado SET. As HKMTs catalisam a transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o grupo ϵ -amino da lisina. (BANNISTER & KOUZARIDES, 2011). Os principais locais de metilação de lisina na histona H3 são K4, K9, K27, K36, K79 e na H4 a K20 (LEE et al., 2004; SIMS et al., 2003). Entre elas, a metilação da lisina 4 (H3K4me) e da lisina 36 (H3K36me) na histona 3 ocorrem nas regiões promotoras dos genes ativos por membros do Grupo Tritórax - TrxG, enquanto a metilação da lisina 9 (H3K9me) e lisina 27 (H3K27me) na histona H3 são encontradas nas regiões heterocromáticas que estão relacionado à repressão transcricional por meio de membros do POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 - PRC2) (LACHNER & JENUWEIN, 2002; SHILATIFARD, 2006; LI et al., 2007).

Duas classes de arginina metiltransferase atuam na metilação da arginina, as enzimas tipo I e tipo II. Todas as enzimas transferem um grupo metil do SAM para o grupo ω -guanidino da arginina em uma variedade de substratos (BEDFORD & CLARKE, 2009; WOLF, 2009). A metilação de histonas nos resíduos de arginina está ligada à ativação gênica, no qual ocorre o recrutamento de metiltransferases, como CARM1 (arginina metiltransferase associada a coativador) e PRMT1 (proteína arginina N-metil transferase) (STALLCUP, 2001; DAVIE & DENT, 2002). As metiltransferases, tanto para a arginina quanto para a lisina, possuem um local ativo catalítico distinto que diferencia esse amplo grupo de metiltransferases de outras enzimas dependentes do SAM (COPELAND et al., 2009).

A metilação da histona era considerada uma modificação estática e estável. Porém, novos estudos foram realizados e foram descobertos alguns mecanismos de desmetilação da lisina e da arginina (BANNISTER et al., 2002). Entre esses mecanismos, a proteína jumonji JMJD6 que é capaz de realizar uma reação de desmetilação nas histonas H3R2 e H4R3 (CHANG et al., 2007). A primeira lisina desmetilase foi identificada utilizando o FAD como co-fator e foi denominada como desmetilase 1 específica da lisina (LSD1). Porém, esta enzima é compatível apenas com substratos de lisina mono e di-metilados (SHI et al., 2004). A primeira enzima identificada como uma tri-metil lisina desmetilase foi a JMJD2

que desmetila H3K9me3 e H3K36me3 (WHETSTINE et al., 2006). Assim como as metiltransferases, as desmetilases possuem um nível de especificidade de substrato elevado em relação à sua lisina alvo, ou seja, algumas enzimas são capazes de desmetilar apenas substratos mono e di-metilícos, enquanto outras enzimas podem desmetilar todos os três estados da lisina metilada (BANNISTER & KOUZARIDES, 2011).

3.4. Ubiquitinação

A ubiquitinação resulta em uma grande modificação covalente, diferente das demais modificações, que apresentam alterações moleculares nas cadeias laterais de aminoácidos relativamente menores. A ubiquitina é um polipeptídeo de 76 aminoácidos que faz ligação com às lisinas de histonas por meio da ação sequencial de três enzimas, enzimas ativadoras de E1, conjugadoras de E2 e ligantes de E3 (HERSHKO & CIECHANOVER, 1998). Os complexos enzimáticos determinam qual é a lisina alvo e o grau de ubiquitinação, se é mono ou poli-ubiquitinado. As histonas H2A e H2B podem ser ubiquitinadas e dependendo do grau de ubiquitinação, cada uma delas pode estar envolvida com funções diferentes. Por exemplo, a H2AK119ub1 está envolvida no silenciamento de genes (WANG et al., 2004) enquanto H2BK123ub1 desempenha um papel importante na transcrição (LEE et al., 2007; KIM et al., 2009). A ubiquitinação é altamente dinâmica e pode ser reversível através da ação das isopeptidases chamadas enzima de-ubiquitina. Esta atividade apresenta grande importância tanto para a atividade gênica quanto para o silenciamento (XHEMALCE et al., 2011).

3.5. Modificação das histonas na Embriogênese Somática

Na ES, a totipotência é uma etapa fundamental, na qual as células somáticas mudam seu destino para células embriogênicas (HABERLANDT, 1902). A ES é induzida por hormônios estressantes ou reguladores de crescimento exógenos que variam entre as plantas, porém, a resposta celular a esses indutores é comum entre as plantas. Tanto na embriogênese somática direta, como na embriogênese somática indireta, os padrões de expressão gênica alteram à medida que alguns

genes que eram ativos nas células somáticas são reprimidos e genes embriogênicos que estavam inativos são expressos (MAHDAVI-DARVARI et al., 2015). Alguns mecanismos epigenéticos influenciam na reprogramação genética, como as modificações de histonas, que estão relacionadas com a embriogênese somática em plantas. Alguns exemplos de modificação de histonas na ES serão tratados nesta questão.

Analisando a metilação de histonas em estudos com *Arabidopsis thaliana* L., os autores constataram que a redução no nível de metilação do DNA associado à diminuição dos níveis de H3K9me2 e H3K27me3 permitem o desencadeamento da desdiferenciação celular ou para a reentrada no ciclo celular (GRAFI et al., 2007; LAFOS et al., 2011). Da mesma forma, Nic-Can et al. (2013) observaram uma diminuição no nível de metilação do DNA e diminuição de H3K4me3, H3K9me2 e H3K27me3 após 7 dias da indução da ES em *Coffea canephora* L., que também permitiram a expressão de genes relacionados ao início da desdiferenciação celular. Por outro lado, houve um aumento nas marcas repressivas H3K9me2 e H3K27me3 e aumento da metilação do DNA durante a transição do estágio globular para o cordiforme (NIC-CAN et al., 2013). Mostrando que a metilação global da histona muda juntamente com a metilação do DNA, contribuindo para a transição de células somáticas para embriões somáticos. Em culturas de protoplastos de *Nicotiana tabacum* L., a aquisição da competência embriogênica foi correlacionada com a remodelação da cromatina e com modificações da metiltransferase na H3K9 e na H3K14 (WILLIAMS et al., 2003). Proteínas do grupo PRC2 impedem a expressão de genes da pluripotência durante a diferenciação celular (BOUYER et al., 2011; GENTRY & HENNIG, 2014). Mutações que afetam PRC2 resultam na transição incompleta de embriões para plântulas, levando a formação de tecidos semelhantes a calos com características embrionárias (BOUYER et al., 2011).

A expressão de alguns genes cruciais para a diferenciação celular e indução da ES em plantas são regulados epigeneticamente por modificações de histonas. Como por exemplo, os genes dos fatores de transcrição, (*BBMI*) e (*LEC1*) são regulados por H3K27me3, enquanto *WUSCHEL - HOMEBOX4 RELACIONADO (WOX4)* é regulado por H3K9me2 (LAFOS et al., 2011; NIC-CAN et al., 2013). O *BBMI* é essencial para a proliferação e morfogênese celular durante a embriogênese (BOUTILIER et al., 2002; KULINSKA-LUKASZEK

et al., 2012). *LECI* é um mestre regulador da embriogênese e sua expressão é necessária para induzir a ES (LOTAN et al., 1998). *WOX4* é essencial para estimular a regeneração de brotos (JI et al., 2010; SUER et al., 2011). A diminuição da H3K27me3 na sequência que codifica para o *LEC* é importante para a ativação do gene, mostrando que *LECI* está envolvido no alongamento do hipocótilo durante o desenvolvimento do embrião (JUNKER et al., 2012). A região alvo do *BBMI* contém níveis moderados de H3K27me3 e baixos níveis de H3K4me3, o que sugere que as presenças dessas marcas antagônicas poderiam manter a transcrição do gene reprimida, mas durante o processo de diferenciação o equilíbrio dessas marcas poderia permitir a reativação rápida da transcrição (BOUYER et al., 2011). A repressão de *WOX4* pela marca H3K9me2 foi observada na transição do estágio torpedo para o cordiforme, permitindo o alongamento do eixo embrionário (JI et al., 2010; SUER et al., 2011).

A acetilação e desacetilação de histonas também desempenham um papel importante durante a ES (MAHDAVI-DARVARI et al., 2015). Em culturas embriogênicas de *N. tabacum*, não foram observadas alterações na metilação das histonas durante o ciclo celular, porém foi observada a desacetilação nas histonas H3 e H4 durante a mitose (LI et al., 2005). Durante o processo de desdiferenciação de protoplastos de tabaco, a acetilação das histonas H3K9 e H3K14 foram associadas com a liberação da PROTEÍNA DE HETEROCROMATINA 1 (HP1), que está associada com a descompactação da cromatina (WILLIAMS et al., 2003). A formação de calos a partir de explantes radiculares de *A. thaliana* também mostrou ser dependente da acetilação de histonas (SUGIMOTO et al., 2010). Também foi demonstrado que o PRZ1 (membro da multiproteína GCN5 – histona acetiltransferase) se liga diretamente a promotores de genes e aumentam a acetilação das histonas H3K9 e H3K14, modificando estrutura da cromatina durante a transição da proliferação celular para o estado diferenciado (ANZOLA et al., 2010). Uddenberg et al. (2011) relataram que utilizando tratamentos com o inibidor da histona desacetilase tricostatina A (TSA) foi restaurada a diferenciação, a competência embriogênica e germinação de embriões. Eles sugerem que existe uma conexão entre o padrão de acetilação da histona e os níveis de expressão de genes relacionados a embriogênese. Portanto, a acetilação de histonas está correlacionada com a cromatina ativa, induzindo o afrouxamento da cromatina e

finalmente a transcrição gênica, indicando o efeito positivo da acetilação geral de histonas durante a competência embriogênica (TSE et al., 1998; EBERHARTER & BECKER, 2002; UDDENBERG et al., 2011). Já a desacetilação de histonas, está relacionada com a inativação transcricional (STRUHL, 1998).

Além da metilação e da acetilação / desacetilação, a ubiquitinação de histonas também está relacionada com a embriogênese somática em plantas. A monoubiquitinação de H2A se mostrou necessária para a metilação da H3K27me3, que atuam na regulação de genes que atuam na ES (YANG et al., 2013). Esses resultados sugerem fortemente que a H2Aub pela PCR1 (H2AK119ub) inibi diretamente a maquinaria transcricional, causando a compactação da cromatina (YANG et al., 2013). Outro grupo de proteínas, como a VAL participam do mecanismo de recrutamento da PRC1 para reprimir os genes envolvidos na transição da fase vegetativa para fase embrionária. Também foi observado que a VAL1 interage com a histona HDA19 desacetilase reprimindo os mesmos genes. Isso mostra que a proteína VAL atua como um elo entre a desacetilação de histonas e a repressão mediada por PCR1 de genes reguladores da maturação de embriões (FEHÉR, 2015; ZHOU et al., 2013).

4. MICRORNAS (MIRNAS)

Os miRNAs são pequenas moléculas reguladoras de RNAs não codificante, de 19 a 24 nucleotídeos (nt) de comprimento, que reconhecem principalmente os locais de ligação complementares de seus mRNAs alvo, controlando um grande número de processos biológicos (SIDDIQUI et al., 2019). Os miRNAs podem mediar a clivagem de mRNA e inibir a tradução no nível transcricional ou pós-transcricional em eucariotos (RHOADES et al., 2002; CHEN, 2008; SIDDIQUI et al., 2019). Segundo Wójcik (2020), apenas uma fita guia do miRNA/miRNA *duplex é carregada seletivamente no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) por meio da ligação com a proteína ARGONAUTE (AGO), enquanto a fita passageira (miRNA *) é degradada. A seleção da fita guia é dependente do nucleotídeo da extremidade 5', que também é importante na etapa de ligação do AGO, e o modo de ação do miRNA-RISC depende do grau de complementaridade da sequência entre o miRNA e seu alvo, sendo que miR168 está presente em

todas as plantas e atua como um regulador de AGO1 (IKI et al., 2018). A via de biogênese dos miRNAs (Figura 2) está sob uma regulamentação estrita e muito abrangente (GRABOWSKA et al., 2020) e um dos fatores que afetam a maquinaria de biogênese do miRNA são as próprias moléculas de miRNA (SZWEYKOWSKA-KULINSKA & JARMOLOWSKI, 2018).

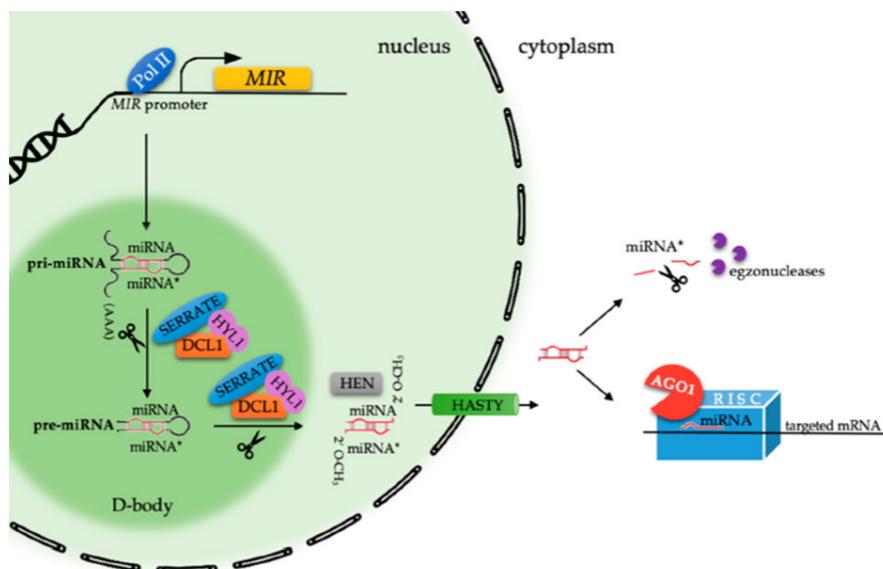


Figura 2. Esquema de uma visão geral da via de biogênese do microRNA (miRNA) nas plantas. Pol II: RNA polimerase II dependente de DNA; MIR: gene MIRNA; pri-miRNA: miRNA primário; pré-miRNA: Precursor-miRNA; DCL1: semelhante a DICER1; HYL: FOLHAS DE HIPONASTIA1; SERRATE; HEN1: HUA ENHANCER1; 2’O-CH₃: grupo 2 ‘hidroxilo metilado; Apressado; AGO: ARGONAUTE; RISC: Complexo Induzido por RNA; D-body: Dicing-body. Fonte: WÓJCIK, 2020.

Pesquisas realizadas na última década têm demonstrado que os miRNAs desempenham papéis cruciais durante a organogênese e embriogênese vegetal (SIDDIQUI et al., 2019; WÓJCIK, 2020). Os miRNAs tendem a ter como alvo os genes que codificam os principais reguladores de desenvolvimento, entre os quais estão muitos fatores de transcrição como BABY BOOM (BBM),

AGAMOUS-LIKE15 (AGL15), LEC2 e SERK, que são descritos como extremamente importantes na via organogênica e embriogênica (WILLMAN et al., 2011; YANG & ZHANG, 2010). Embora os miRNAs estejam envolvidos em uma ampla gama de processos metabólicos e fisiológicos em plantas, como crescimento, desenvolvimento, regulação hormonal, diferenciação de órgãos, *splicing* alternativo, acúmulo de metabólitos secundários e tolerância a estresses bióticos e abióticos, os papéis específicos dos miRNAs na organogênese e ES ainda permanecem obscuros (SIDDIQUI et al., 2019; WÓJCIK, 2020).

A detecção de miRNAs pode ser realizada através de várias técnicas, como *microarray*, *northern blot*, *real-time quantitative reverse transcription PCR* (qRT-PCR), *high - throughput sequencing technology* e *degradome sequencing* (ZHANG et al., 2017). Entre estas técnicas, o qRT-PCR se destaca por ser mais confiável para a detecção de miRNAs em virtude da sua precisão, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade com custo relativamente baixo (LI et al., 2015; CANDAR-CAKIR et al., 2016). Durante a última década, vários relatórios foram publicados elucidando o papel dos miRNAs na ES. Esses relatórios nos fornecem e proporcionam uma visão sobre o papel de vários miRNAs que medeiam a regulação da ES entre diferentes tipos de plantas, bem como a especificidade dos miRNAs em termos de sua função e genes alvo, como pode ser observado na Tabela 1 (SIDDIQUI et al., 2019). Por exemplo, a indução de embriões somáticos é controlada por miR171c (LI et al., 2016), miR393 (WÓJCIK & GAJ, 2016) e miR397 (LI et al., 2016), enquanto miR171a/b (LI et al., 2016) e miR398 (LI et al., 2013; LIN et al., 2015c; LI et al., 2016) regulam a proliferação pré-embriônica. O papel do miR156 varia desde a diferenciação do calo embriogênico em *Zea mays* até o desenvolvimento do embrião globular e cotiledonar em *Gossypium hirsutum* e *Larix leptolepis*, respectivamente (SIDDIQUI, 2019; ZHANG et al., 2012; YANG et al., 2013; SHEN et al., 2013; LIN et al., 2015c). Além disso, miR167 (WU et al., 2011; LI et al., 2013; YANG et al., 2013; LIN et al., 2015c) e miR398 (LI et al., 2013; LIN et al., 2015c; LI et al., 2016) também regulam a formação de embriões cotiledonares. Enquanto a superexpressão de miR166a inibe a formação de cotilédones (LI et al., 2016).

Tabela 1. Papel do miRNA na ES revisado por Siddiqui et al. (2019).

miRNA	Estágio do embrião	Espécie	Referência
miR156	Desenvolvimento do embrião cotiledonar.	<i>Dimocarpus longan</i> <i>Gossypium hirsutum</i> <i>Larix leptolepis</i> <i>Zea mays</i>	Lin et al. (2015c)
	Desenvolvimento do embrião cotiledonar.		Yang et al. (2013)
	Desenvolvimento do embrião cotiledonar.		Zhang et al. (2012)
	Diferenciação de calos embriogênicos.		Shen et al. (2013)
miR162	Regula todo o processo da ES.	<i>Larix leptolepis</i>	Li et al. (2013)
miR166a	Inibe a formação de cotilédones.	<i>Larix leptolepis</i>	Li et al. (2016)
miR167	Desenvolvimento do embrião cotiledonar.	<i>Dimocarpus longan</i> <i>Gossypium hirsutum</i> <i>Citrus sinensis</i> <i>Larix leptolepis</i>	Lin et al. (2015c)
	Desenvolvimento do embrião cotiledonar.		Yang et al. (2013)
	Desenvolvimento do embrião cotiledonar.		Wu et al. (2011)
	Desenvolvimento do embrião cotiledonar.		Li et al. (2013)
miR168	Regula todo o processo da ES.	<i>Larix leptolepis</i>	Li et al. (2016)
miR171a/b	Exerce função em massas pró-embriogênicas.	<i>Larix leptolepis</i>	Li et al. (2016)
miR171c	Atua no processo de indução da ES.	<i>Larix leptolepis</i>	Li et al. (2016)
miR393	Induz a transição das células somáticas para embriogênicas.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Wójcik & Gaj (2016)
miR397	Modulação da propagação de massas pró-embriogênicas e transição para a formação de embrião único.	<i>Larix leptolepis</i>	Li et al. (2016)
miR398	Formação do embrião cotiledonar.	<i>Dimocarpus longan</i> <i>Larix leptolepis</i> <i>Larix leptolepis</i>	Lin et al. (2015)c
	Proliferação de pré-embrião.		Li et al. (2013)
	Modulação da propagação de massas pró-embriogênicas e transição para a formação de embrião único.		Li et al. (2016)

Além desses miRNAs mencionados anteriormente, outros miRNAs são importantes na via embriogênica, por exemplo a expressão do miR171, miR159, miR169 e miR172 afeta a resposta embriogênica de *Larix gmelini*, uma vez que esses miRNAs são específicos e direcionados a fatores de transcrição multifuncionais, nos quais participa do processo de transdução do sinal do ácido abscísico, no crescimento e desenvolvimento celular e na resposta adaptativa ao estresse (ZHANG et al., 2010). Em *Citrus sinensis* (L.), Wu et al. (2011) mostraram que miR156, miR168 e miR171 regulam os processos de desenvolvimento inicial da ES e que os miR159, miR164, miR390 e miR397 regulam cooperativamente a formação do embrião globular. Além disso, os miR164, miR166 e miR397 podem regular as células que são incapazes de adquirir competência embriogênica. A presença de miRNAs já foi reportado em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário em *Dimocarpus longan* (LIN & LAI, 2013; XU et al., 2020), *Picea abies* (YAKOVLEV et al., 2010), *Oryza sativa* (CHEN et al., 2011), *Vitis vinifera* (MICA et al., 2009), *Gossypium hirsutum* (JIN et al., 2014), *Triticum aestivum* (CHU et al., 2016) e *Lilium pumilum* (ZHANG et al., 2017). Em *D. longan*, Lin & Lai (2013) revelaram que alguns miRNAs foram expressos de maneira estável durante o desenvolvimento da ES e, posteriormente, a função dos miR398, miR393, miR160 e miR390 foram verificados e analisados durante o estágio de maturação da ES (LIN et al., 2015a; LIN et al., 2015b; LAI et al., 2016). Estes autores revelaram que a rede reguladora de miRNAs desempenha um papel importante na ES em *D. longan*, e o desenvolvimento inicial do embrião somático está intimamente associado à totipotência de calos embriogênicos diferenciados. Este achado foi essencial para esclarecer os mecanismos moleculares em *D. longan*.

Em geral e conforme relatado anteriormente, os miRNAs previnem a expressão precoce de fatores de transcrição que promovem a diferenciação durante a embriogênese inicial (NODINE & BARTEL, 2010). Existem vários genes de miRNA que alteram vários processos biológicos e moleculares, tornando alvos de miRNA específicos, incluindo fatores de transcrição importantes, conforme já foi relatado por Wang et al. (2018). O papel dos miRNAs no desenvolvimento das plantas oferece várias implicações potenciais na regulação da sinalização celular e nas vias fisiológicas e metabólicas (SIDDIQUI et al., 2019). As descobertas recentes melhoram nossa compreensão do intrincado mecanismo de regulação da

ES mediada por miRNA. Os miRNAs são indispensáveis na regulação de diversos processos biológicos e metabólicos (WÓJCIK, 2020). Embora haja uma grande variedade de miRNAs em diferentes famílias de plantas, muitos deles são comuns e servem a uma causa comum no sistema vegetal. No entanto, considerando um único processo como a ES, os miRNAs medeiam a regulação dessa via morfogênica em vários grupos de plantas e a filiação, função e genes alvo dos miRNAs podem apresentar especificidade distintas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A embriogênese somática é uma importante via de desenvolvimento e regeneração de plantas, com considerável interesse e aplicação biotecnológica. E como relatado, durante este complexo desenvolvimento, as células têm que se desdiferenciar e reprogramar seus padrões de expressão gênica em diferentes níveis (YANG & ZHANG, 2010). Durante a embriogênese somática em plantas, regulação de mecanismos epigenéticos (metilação de DNA, modificação das histonas e microRNAs) regulam a expressão gênica. As condições embriogênicas podem ser reprogramadas por meio do silenciamento ou ativação de genes envolvidos na ES por mecanismos epigenéticos, entre eles a metilação do DNA, as modificações de histonas e os miRNAs. A maioria dos genes que estão ativados durante o estágio vegetativo das plantas, passam a ser suprimidos no estágio de desdiferenciação celular e alguns dos genes específicos da indução da ES passam a serem expressos neste estágio de desdiferenciação celular, permitindo o desenvolvimento de plantas via ES (FEHÉR, 2015; MAHDAVI-DARVARI et al., 2015).

Portanto estudos neste sentido são extremamente válidos e necessários, pois podem ser utilizados no desenvolvimento de marcadores para diferenciar células não-embriogênicas de embriogênicas. E num futuro próximo, a metilação regulada do DNA e/ou a modificação regulada de histonas e/ou os miRNAs servirão como uma ferramenta biotecnológica essencial para aumentar a quantidade e melhorar a qualidade das plantas regeneradas via ES. Sendo estas descobertas muito úteis na tecnologia de biofábricas de plantas para produção em massa de proteínas, vacinas e outros peptídeos biologicamente ativos a partir da produção de calos embriogênicos e embriões somáticos.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed. 5ª ed. 2010. 1396 p.

ANZOLA, J. M.; SIEBERER, T.; ORTBAUER, M.; BUTT, H.; KORBEI, B.; WEINHOFER, I.; MÜLLNER, A. E.; LUSCHNIG, C. Putative Arabidopsis transcriptional adaptor protein (PROPORZ1) is required to modulate histone acetylation in response to auxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 22, p. 10308-10313, 2010.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011.

BANNISTER, A. J.; SCHNEIDER, R.; KOUZARIDES, T. Histone methylation: dynamic or static. *Cell*, v. 109, n. 7, p. 801-806, 2002.

BEDFORD, M. T.; CLARKE, S.; G. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Molecular cell*, v. 33, n. 1, p. 1-13, 2009.

BERGER, S. L.; KOUZARIDES, T.; SHIEKHATTAR, R.; SHILATIFARD, A. An operational definition of epigenetics. *Genes & development*, v. 23, n. 7, p. 781-783, 2009.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, v. 447, n. 7143, p. 396, 2007.

BOUTILIER, K.; OFFRINGA, R.; SHARMA, V. K.; KIEFT, H.; OUELLET, T.; ZHANG, L.; HATTORI, J.; LIU, C.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; MIKI, B. L. A.; CUSTERS, J. B. M.; VAN, M. M. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, v. 14, n. 8, p. 1737-1749, 2002.

BOUYER, D.; ROUDIER, F.; HEESE, M.; ANDERSEN, E. D.; GEY, D.; NOWACK, M. K.; GOODRICH, J.; RENO, J-P.; GRINI, P. E.; COLOT, V.; SCHNITTGER, A. Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. *PLoS Genet*, v. 7, n. 3, p. 1-19, 2011.

CANDAR-CAKIR, B.; ARICAN, E.; ZHANG, B. Small RNA and degradome deep sequencing reveals drought-and tissue-specific micrnas and their important roles in drought-sensitive and drought-tolerant tomato genotypes. *Plant biotechnology journal*, v. 14, n. 8, p. 1727-1746, 2016.

CAO, X.; JACOBSEN, S. E. Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Current Biology*, v. 12, n. 13, p. 1138-1144, 2002.

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

CHANG, B.; CHEN, Y.; ZHAO, Y.; BRUICK, R. K. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*, v. 318, n. 5849, p. 444-447, 2007.

CHEN, C. J.; LIU, Q.; ZHANG, Y. C.; QU, L. H.; CHEN, Y. Q.; GAUTHERET, D. Genome-wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus. *RNA biology*, v. 8, n. 3, p. 538-547, 2011.

CHEN, M.; LV, S.; MENG, Y. Epigenetic performers in plants. *Development, growth & differentiation*, v. 52, n. 6, p. 555-566, 2010.

CHEN, X. M. MicroRNA metabolism in plants. In: *Rna Interference*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 117-136, 2008.

CHEUNG, P.; LAU, P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Molecular Endocrinology*, v. 19, n. 3, p. 563-573, 2005.

CHU, Z. L.; CHEN, J.; XU, H.; DONG, Z.; CHEN, F.; CUI, D. Identification and comparative analysis of microRNA in wheat (*Triticum aestivum* L.) callus derived from mature and immature embryos during in vitro culture. *Frontiers in plant science*, v. 7, p. 1302, 2016.

COKUS, S. J.; FENG, S.; ZHANG, X.; CHEN, Z.; MERRIMAN, B.; HAUDENSCHILD, C. D.; PRADHAN, S.; NELSON, S. F.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S. E. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, v. 452, n. 7184, p. 215-219, 2008.

COPELAND, R. A.; SOLOMON, M. E.; RICHON, V. M. Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, v. 8, n. 9, p. 724-732, 2009.

DAVIE, J. K.; DENT, S. Y. Transcriptional control: an activating role for arginine methylation. *Current Biology*, v. 12, n. 2, p. 59-61, 2002.

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. 1-11, 2012.

EBERHARTER, A.; BECKER, P. B. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO reports*, v. 3, n. 3, p. 224-229, 2002.

ELMEER, K. E. S. Factors regulating somatic embryogenesis in plants. *Somatic embryogenesis and gene expression*. New Delhi: Narosa Publishing House, p. 56-81, 2013.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant cell, tissue and organ culture*, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.

FEIL, R. 2009. Ready for the marks. *Nature*, v. 461, n. 7262, p. 359-360, 2009.

FELSENFELD, G.; GROUDINE, M. Controlling the double helix. *Nature*, v. 421, n. 6921, p. 448-453, 2003.

FENG, S. et al. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 19, p. 8689-8694, 2010.

FINNEGAN, E. J.; GENGER, R. K.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. DNA methylation in plants. *Annual review of plant biology*, v. 49, n. 1, p. 223-247, 1998.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; MICKE, G. A. 5-Azacytidine combined with 2, 4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant cell reports*, v. 31, n. 12, p. 2165-2176, 2012.

GENTRY, M. & HENNIG, L. Remodelling chromatin to shape development of plants. *Experimental cell research*, v. 321, n. 1, p. 40-46, 2014.

GRABOWSKA, A.; BHAT, S. S.; SMOCZYNSKA, A.; BIELEWICZ, D.; JARMOŁOWSKI, A.; KULINSKA, Z. S. Regulation of Plant microRNA Biogenesis. In: *Plant microRNAs*. Springer, Cham, p. 3-24, 2020.

GRAESSLE, S.; LOIDL, P.; BROSCHE, G. Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 58, n. 5-6, p. 704-720, 2001.

GRAFI, G.; BEN-MEIR, H.; AVIVI, Y.; MOSHE, M.; DAHAN, Y.; ZEMACH, A. Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. *Developmental biology*, v. 306, n. 2, p. 838-846, 2007.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, J. *Introdução à Genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 9ª ed. 2015. 780 p.

GRZYBKOWSKA, D.; MOROSCZYK, 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, n. 2, p. 243-256, 2018. doi: 10.1007/s10725-018-0389-1.

GUO, H.; FAN, Y.; GUO, H.; WU, J.; YU, X.; WEI, J.; ZENG, F. Somatic embryogenesis critical initiation stage-specific mCHH hypomethylation reveals epigenetic basis underlying embryogenic redifferentiation in cotton. *Plant Biotechnology Journal*, p. 1648–1650, 2020.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien* v. 111, p.69-92, 1902.

HAIG, D. The (dual) origin of epigenetics. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 67-70, 2004.

HE, X.; CHEN, T.; ZHU, J. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell research*, v. 21, n. 3, p. 442-465, 2011.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, v. 67, n. 1, p. 425-479, 1998.

HODAWADEKAR, S. C.; MARMORSTEIN, R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene*, v. 26, n. 37, p. 5528-5540, 2007.

HU, L.; LI, N.; XU, C.; ZHONG, S.; LIN, X.; YANG, J.; ZHOU, T.; YULIANG, A. Mutation of a major CG methylase in rice causes genome-wide hypomethylation, dysregulated genome expression, and seedling lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 29, p. 10642-10647, 2014.

IKI, T.; CLÉRY, A.; BOLOGNA, N. G.; SARAZIN, A.; BROSNAN, C. A.; PUMPLIN, N.; VOINNET, O. Structural flexibility enables alternative maturation, ARGONAUTE sorting and activities of miR168, a global gene silencing regulator in plants. *Molecular plant*, v. 11, n. 8, p. 1008-1023, 2018.

JI, J.; STRABLE, J.; SHIMIZU, R.; KOENING, D.; SINHA, N.; SCANLON, M. J. WOXP4 promotes procambial development. *Plant physiology*, v. 152, n. 3, p. 1346-1356, 2010.

JI, L.; MATHIONI, S. M.; JOHNSON, S.; TUCKER, D.; BEWICK, A. J.; DO KIM, K.; MEYERS, B. C. Genome-wide reinforcement of DNA methylation occurs during somatic embryogenesis in soybean. *The Plant Cell*, v. 31, n. 10, p. 2315-2331, 2019.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, v. 47, n. 2-3, p. 91-110, 2005.

JIN, F. Y.; HU, L.; YUAN, D.; XU, J.; GAO, W.; HE, L.; YANG, X.; ZHANG, X. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnology Journal*, v. 12, n. 2, p. 161-173, 2014.

JOSHI, R.; JOSHI, P. R.; ARAMOD KUMAR, P. K. Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review. *Agricultural Reviews*, v. 34, n. 1, p. 1-20, 2013.

JUNKER, A.; MONKE, G.; RUTTEN, T.; KEILWAGEN, J.; SEIFERT, M.; THI, T. M. N.; RENOU, J. P.; BALZERGUE, S.; VIEHOVER, P.; HAHNEL, U.; LUDWIG-MULLER, J.; ALTSCHMIED, L.; CONRAD, U.; WEISSHAAR, B.; BAUMLEIN, H. Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, v. 71, n. 3, p. 427-442, 2012.

KAEPLER, S. M.; PHILLIPS, R. L. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 19, p. 8773-8776, 1993.

KARAMI, O.; AGHAVAISI, B.; MAHMOUDI, A. Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of chemical biology*, v. 2, n. 4, p. 177-190, 2009.

KIM, J.; GUERMAH, M.; MCGINTY, R. K.; LEE, J. S.; TANG, Z.; MILNE, T. A.; ROEDER, R. G. RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell*, v. 137, n. 3, p. 459-471, 2009.

KORNBERG, R. D. & LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, v. 98, n. 3, p. 285-294, 1999.

KULINSKA-LUKASZEK, K.; TOBOJKA, M.; ADAMIOK, A.; KURCZYNSKA, E. Expression of the BBM gene during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia plantarum*, v. 56, n. 2, p. 389-394, 2012.

KUMAR, V. & VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 39, n. 9, p. 194, 2017.

KWIATKOWSKA, A.; ZEBROWSKI, J.; OKLEJEWICZ, B.; CZARNIK, J.; HALIBART-PUZIO, J.; WNUK M. The age-dependent epigenetic and physiological changes in an *Arabidopsis* T87 cell suspension culture during long-term cultivation. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 447, n. 2, p. 285-291, 2014.

LACHNER, M. & JENUWEIN, T. The many faces of histone lysine methylation. *Current opinion in cell biology*, v. 14, n. 3, p. 286-298, 2002.

LAFOS, M.; KROLL, P.; HOHENSTATT, M. L.; THORPE, F. L.; CLARENZ, O.; SCHUBERT, D. Dynamic regulation of H3K27 trimethylation during *Arabidopsis* differentiation. *PLoS Genet*, v. 7, n. 4, p. 1-20, 2011.

LAI, R. L.; LIN, Y.; LAI, Z. Cloning of auxin receptor gene TIR1 and its interaction with miR393 in *Dimocarpus longan* Lour. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, v. 22, p. 95-102, 2016.

LAN, F. & SHI, Y. Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Science in China Series C: Life Sciences*, v. 52, n. 4, p. 311-322, 2009.

LEE, D. Y.; TEYSSIER, C.; STRAHL, B. D.; STALLCUP, M. R. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocrine reviews*, v. 26, n. 2, p. 147-170, 2004.

LEE, J. S.; SHUKLA, A.; SCHNEIDER, J.; SWANSON, S. K.; WASHBURN, M. P.; FLORENS, L.; SHILATIFARD, A. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell*, v. 131, n. 6, p. 1084-1096, 2007.

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.

LI, X.; CHENG, J.; ZHANG, J.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; WANG, C.; SUN, H. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression in *Lilium davidii* var. unicolor for real time quantitative PCR. *PLoS one*, v. 10, n. 10, p. 1-17, 2015.

LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. *Cell*, v. 128, n. 4, p. 707-719, 2007.

LI, W.; LIU, H.; CHENG, Z. J.; SU, Y. H.; HAN, H. N.; ZHANG, Y.; ZHANG, X. S. DNA methylation and histone modifications regulate de novo shoot regeneration in *Arabidopsis* by modulating WUSCHEL expression and auxin signaling. *PLoS Genet*, v. 7, n. 8, p. 1-12, 2011.

LI, Y.; BUTENKO, Y.; GRAFI, G. Histone deacetylation is required for progression through mitosis in tobacco cells. *The Plant Journal*, v. 41, n. 3, p. 346-352, 2005.

LI, S. G.; LI, W. F.; HAN, S. Y.; YANG, W. H., QI, L. W. Stage-specific regulation of four HDZIP III transcription factors during polar pattern formation in *Larix leptolepis* somatic embryos. *Gene*, v. 522, n. 2, p 177–183. 2013.

LIN, Y. L.; LAI, Z. X. Evaluation of suitable reference genes for normalization of microRNA expression by real-time reverse transcription PCR analysis during longan somatic embryogenesis. *Plant physiology and biochemistry*, v. 66, p. 20-25, 2013.

LIN, Y. L.; LAI, Z.; TIAN, Q.; LIN, L.; LAI, R.; YANG, M.; ZHANG, D.; CHEN, Y.; ZHANG, Z. Endogenous target mimics down-regulate miR160 mediation of ARF10-16, and-17 cleavage during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Frontiers in plant science*, v. 6, p. 956, 2015a.

LIN Y, LAI Z, LIN L, LAI R, TIAN Q, YE W, ZHANG D, YANG M, CHEN Y, ZHANG Z. Endogenous target mimics, microRNA167, and its targets ARF6 and ARF8 during somatic embryo development in *Dimocarpus longan* Lour. Mol Breed 35:227, 2015c.

LIN, Y. L.; LIN, L.; LAI, R.; LIU, W.; CHEN, Y.; ZHANG, Z.; XUHAN, X.; LAI, Z. MicroRNA390-directed TAS3 cleavage leads to the production of tasiRNA-ARF3/4 during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. Frontiers in plant science, v. 6, p. 1119, 2015b.

Li, Z. X., et al. Over-expression of miR166a inhibits cotyledon formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis*, Plant Cell Tissue Organ Cult v. 127, n. 2, p 461-473, 2016.

LOSCHIAVO, F.; PITTO, L.; GIULIANO, G.; TORTI, G.; NUTI-RONCHI, V.; MARAZZITI D. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theoretical and Applied Genetics, v. 77, n. 3, p. 325-331, 1989.

LOTAN, T.; OHTO, M.; MATSUDAIRA, Y. K.; WEST, M. A. L.; LO, R.; KWONG, R. W.; YAMAGISHI, K.; FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; HARADA, J. J. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. Cell, v. 93, n. 7, p. 1195-1205, 1998.

LUAN, A.; CHEN, C.; XIE, T.; HE, J.; HE, Y. Methylation Analysis of CpG Islands in Pineapple SERK1 Promoter. Genes, v. 11, n. 4, p. 425, 2020.

MAHDAVI-DARVARI, F.; NOOR, N. M.; ISMANIZAN, I. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 120, n. 2, p. 407-422, 2015.

MICA, E.; PICCOLO, V.; DELLEDONNE, M.; FERRARINI, A.; PEZZOTTI, M.; CASATI, C.; FABBRO, C. D.; VALLE, G.; POLICRITI, A.; MORGANTE, M.; PESOLE, G.; PÈ, M. E.; HORNER, D. S. High throughput approaches reveal splicing of primary microRNA transcripts and tissue specific expression of mature microRNAs in *Vitis vinifera*. BMC genomics, v. 10, n. 1, p. 558, 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.

MILUTINOVIC, S.; ZHUANG, Q.; NIVELEAU, A.; SZYF, M. Epigenomic stress response knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 17, p. 14985-14995, 2003.

MUNKSGAARD, D.; MATTSSON, O.; OKKLES, F. T. Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. *Physiologia Plantarum*, v. 93, n. 1, p. 5-10, 1995.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed. 6^a ed. 2014.

NG, S.S.; YUE, W. W.; OPPERMANN, U.; KLOSE, R. J. Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 3, p. 407, 2009.

NIC-CAN, G. I.; LOPEZ-TORRES, A.; BARREDO-POOL, F. A.; WROBEL, K.; LOYOLAVARGAS, V. M.; 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, p. 1-14, 2013.

NOCEDA, C.; SALAJ, T.; PEREZ, M.; VIEJO, M.; CANAL, A. J.; SALAJ, J.; RODRIGUEZ, R. DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees*, v. 23, n. 6, p. 1285, 2009.

NODINE, M. D.; BARTEL, D. P. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes & development*, v. 24, n. 23, p. 2678-2692, 2010.

NOWAK, K.; MOROŃCZYK, J.; WÓJCIK, A.; GAJ, M. D. AGL15 Controls the Embryogenic Reprogramming of Somatic Cells in Arabidopsis through the Histone Acetylation-Mediated Repression of the miRNA Biogenesis Genes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 18, p. 6733, 2020.

OKI, M.; AIHARA, H.; ITO, T. Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. In: *Chromatin and Disease*. Springer, Dordrecht, p. 323-340. 2007.

OSORIO-MONTALVO, P.; SÁENZ-CARBONELL, L.; DE-LA-PEÑA, C. 5-azacytidine: a promoter of epigenetic changes in the quest to improve plant

somatic embryogenesis. International journal of molecular sciences, v. 19, n. 10, p. 3182, 2018.

PASZKOWSKI, J.; WHITHAM, S. A. Gene silencing and DNA methylation processes. Current opinion in plant biology, v. 4, n. 2, p. 123-129, 2001.

REA, S.; EISENHABER, F.; O'CARROLL, D.; STRAHL, B. D.; SUN, Z. W.; SCHMID, M.; JENUWEIN, T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. Nature, v. 406, n. 6796, p. 593-599, 2000.

RHOADES, M. W.; REINHART, B. J.; LIM, L. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P. Prediction of plant microRNA targets. cell, v. 110, n. 4, p. 513-520, 2002.

RIVAL, A.; ILBERT, P.; LABEYRIE, A.; TORRES, E.; DOULBEAU, S.; PERSONNE, A. Variations in genomic DNA methylation during the long-term in vitro proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. Plant cell reports, v. 32, n. 3, p. 359-368, 2013.

ROTTACH, A.; LEONHARDT, H.; SPADA, F. DNA methylation-mediated epigenetic control. Journal of cellular biochemistry, v. 108, n. 1, p. 43-51, 2009.

SANTOS, D. & FEVEREIRO, P. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 70, n. 2, p. 155-161, 2002.

SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; PARVEEN, S.; SAEED, T.; SHAHEEN, A.; AKHTAR, R.; YADAV, V.; UPADHYAY, A.; AHMAD, Z. Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. In: Plant biotechnology: principles and applications. Springer, Singapore, p. 1-36, 2017.

SHEN, Y.; JIANG, Z.; LU, S.; LIN, H.; GAO, S.; PENG, H.; YUAN, G.; LIU, L.; ZHANG, Z.; ZHAO, M.; RONG, T.; PAN, G. Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. Biochemical and biophysical research communications, v. 441, n. 2, p. 425-430, 2013.

SHI, Y.; LAN, F.; MATSON, C.; MULLIGAN, P.; WHETSTINE, J. R.; COLE, P. A.; CASERO, R. A.; SHI, Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell, v. 119, n. 7, p. 941-953, 2004.

SHILATIFARD, A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual Review of Biochemistry*, v. 75, p. 243-269, 2006.

SIDDIQUI, Z. H.; ABBAS, Z. K.; ANSARI, M. W.; & KHAN, M. N. The role of miRNA in somatic embryogenesis. *Genomics*, v. 111, n. 5, p. 1026-1033, 2019.

SIMS, R. J.; NISHIOKA, K.; REINBERG, D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *TRENDS in Genetics*, v. 19, n. 11, p. 629-639, 2003.

SMYKAL, P.; VALLEDOR, L.; RODRIGUEZ, R.; GRIGA, M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant cell reports*, v. 26, n. 11, p. 1985-1998, 2007.

STALLCUP, M. R. Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene*, v. 20, n. 24, p. 3014-3020, 2001.

STRUHL, K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & development*, v. 12, n. 5, p. 599-606, 1998.

SUER, S.; AGUSTI, J.; SANCHEZ, P.; SCHWARZ, M.; GREB, T. WOXA4 imparts auxin responsiveness to cambium cells in Arabidopsis. *The Plant Cell*, v. 23, n. 9, p. 3247-3259, 2011.

SUGIMOTO, K.; JIAO, Y.; MEYEROWITZ, E. M. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental cell*, v. 18, n. 3, p. 463-471, 2010.

SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z.; JARMOLOWSKI, A. Post-transcriptional regulation of MicroRNA accumulation and function: New insights from plants. *Molecular plant*, v. 11, n. 8, p. 1006-1007, 2018.

TANG, L. P.; ZHANG, X. S.; SU, Y. H. Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis. *aBIOTECH*, p. 1-9, 2020.

TOKUJI, Y.; TAKANO, S.; TONOMURA, M.; TANAKA, S.; IGARI, T.; WATANABE, T. Influence of 5'-azacitidine on promoting recovery of cell competence for shoot organogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 106, n. 2, p. 289-297, 2011.

TSE, C.; SERA, T.; WOLFFE, A. P.; HANSEN, J. C. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of

nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Molecular and cellular biology*, v. 18, n. 8, p. 4629-4638, 1998.

UDDENBERG, D.; VALLADARES, S.; ABRAHAMSSON, M.; SUNDSTRÖM, J. F.; SUNDÅS, A.; LARSSON, S.; VON ARNOLD. Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor. *Planta*, v. 234, n. 3, p. 527-539, 2011.

VALLEDOR, L.; HASBUN, R.; MEIJON, M.; RODRIGUEZ, J.; SANTAMARIA, E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 91, n. 2, p. 75-86, 2007.

VAN HOLDE, K. *Chromatin*. New York: Springer Verlag, p. 497, 1998.

VIEJO, M.; RODRIGUEZ, R.; VALLEDOR, L.; PEREZ, M.; CANAL, M.; HASBUN, R. DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller. *Sexual plant reproduction*, v. 23, n. 4, 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, n. 3, p. 233-249, 2002.

WANG L, LIUN, WANG T, LI J, WEN T, YANG X, LINDSEY K, ZHANG X. The GhmiR157a–GhSPL10 regulatory module controls initial cellular dedifferentiation and callus proliferation in cotton by modulating ethylene-mediated flavonoid biosynthesis. *Journal of experimental botany*, v. 69, n. 5, p. 1081-1093, 2018.

WANG, F. X.; SHANG, G. D.; WU, L. Y.; XU, Z. G.; ZHAO, X. Y.; WANG, J. W. Chromatin accessibility dynamics and a hierarchical transcriptional regulatory network structure for plant somatic embryogenesis. *Developmental Cell*, v. 54, n. 6, p. 742-757, 2020.

WATSON, M.; HAWKES, E.; MEYER, P. Transmission of epi-alleles with MET1-dependent dense methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, v. 9, n. 8, p. 1-9, 2014.

WHETSTINE, J. R.; NOTTKE, A.; LAN, F.; HUARTE, M.; SMOLIKOV, S.; CHEN, Z.; SHI, Y. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*, v. 125, n. 3, p. 467-481, 2006.

WILLIAMS, L.; ZHAO, J.; MOROZOVA, N.; LI, Y.; AVIV, Y.; GRAFI, G. Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1, and activation of E2F-target genes. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, v. 228, n. 1, p. 113-120, 2003.

WILLMANN, M. R.; MEHALICK, A. J.; PACKER, R. L.; JENIK, P. D. MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in Arabidopsis. *Plant physiology*, v. 155, n. 4, p. 1871-1884, 2011.

WÓJCIK, A. M. & GAJ, M. D. miR393 contributes to the embryogenic transition induced in vitro in Arabidopsis via the modification of the tissue sensitivity to auxin treatment. *Planta*, v. 244, n. 1, p. 231-243, 2016.

WÓJCIK, A. M. Research Tools for the Functional Genomics of Plant miRNAs During Zygotic and Somatic Embryogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 14, p. 4969, 2020.

WÓJCIKOWSKA, B.; WÓJCIK, A. M.; GAJ, M. D. Epigenetic Regulation of Auxin-Induced Somatic Embryogenesis in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 7, p. 2307, 2020.

WOLF, S. S. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cellular and molecular life sciences*, v. 66, n. 13, p. 2109-2121, 2009.

WOLFFE, A. P., MATZKE, M. A. Epigenetics: regulation through repression. *science*, v. 286, n. 5439, p. 481-486, 1999.

WU, X. M.; LIU, M.Y.; GE, X. X.; XU, Q.; GUO, W. W. Stage and tissue-specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. *Planta*, v. 233, n. 3, p. 495-505, 2011.

XHEMALCE, B.; DAWSON, M. A.; BANNISTER, A. J. Histone Modifications. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. Wiley, Hoboken, NJ, 2011.

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

XU, X.; CHEN, X.; CHEN, Y.; ZHANG, Q.; SU, L.; CHEN, X.; CHEN, Y.; ZHANG, Z.; LIN, Y.; LAI, Z. Genome-wide identification of miRNAs and their targets during early somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. Scientific reports, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.

YAKOVLEV, I. A.; FOSSDAL, C. G.; JOHNSEN, O. MicroRNAs, the epigenetic memory and climatic adaptation in Norway spruce. New Phytologist, v. 187, n. 4, p. 1154-1169, 2010.

YAMAUCHI, T.; JOHZUKA-HISATOMI, Y.; TERADA, R.; NAKAMURA, I.; IIDA, S. YAMAUCHI, Takaki et al. The MET1b gene encoding a maintenance DNA methyltransferase is indispensable for normal development in rice. Plant molecular biology, v. 85, n. 3, p. 219-232, 2014.

YANG, C.; BRATZEL, F.; HOHMANN, N.; KOCH, M.; TURCK, F.; CALONJE, M. VAL-and AtBMI1-mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to postgerminative growth in Arabidopsis. Current Biology, v. 23, n. 14, p. 1324-1329, 2013.

YANG, H.; CHANG, F.; YOU, C.; CUI, J.; ZHU, G.; WANG, L.; ZHENG, Y.; QI, J.; MA, H. Whole-genome DNA methylation patterns and complex associations with gene structure and expression during flower development in Arabidopsis. The Plant Journal, v. 81, n. 2, p. 268-281, 2014.

YANG, X.-J.; SETO, EHAT. HATs e HDACs: da estrutura, função e regulação a novas estratégias de terapia e prevenção. Oncogene, v. 26, n. 37, pág. 5310-5310, 2007.

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. Critical Reviews in Plant Science, v. 29, n. 1, p. 36-57, 2010.

YANG, X.; WANG, L.; YUAN, D.; LINDSEY, K.; ZHANG, X. Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. Journal of experimental botany, v. 64, n. 6, p. 1521-1536, 2013.

ZHANG, J.; ZHANG, S.; HAN, S.; WU, T.; LI, X.; LI, W.; QI, L. Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. Planta, v. 236, n. 2, p. 647-657, 2012.

ZHANG, C. & HSIEH, T. F. Heritable epigenetic variation and its potential applications for crop improvement. Plant Breeding and Biotechnology, v. 1, n. 4, p. 307-319, 2013.

ZHANG, H.; GUO, F.; QI, P.; HUANG, Y.; XIE, Y.; XU, L.; BIAN, H. OsHDA710-Mediated Histone Deacetylation Regulates Callus Formation of Rice Mature Embryo. *Plant and Cell Physiology*, v. 61, n. 9, p. 1646-1660, 2020.

ZHANG, J.; XUE, B.; GAI, M.; SONG, S.; JIA, N.; SUN, H. Small RNA and Transcriptome Sequencing Reveal a Potential miRNA-Mediated Interaction Network That Functions during Somatic Embryogenesis in *Lilium pumilum* DC. *Fisch. Frontiers in plant science*, v. 8, p. 566, 2017.

ZHANG, S. G.; ZHOU, J.; HANC, S.; YANG, W.; LI, W.; WEI, H.; LI, X.; QI, L. Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis*. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 398, n. 3, p. 355-360, 2010.

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA: ASPECTOS GERAIS E REGULAÇÃO

Adeilson Frias Dornela

Luana Walquíria dos Santos

Mariana Cansian Sattler

Wellington Ronildo Clarindo

1. INTRODUÇÃO

A Embriogênese Somática (ES) é o processo pelo qual células somáticas, sob determinadas condições de indução, desenvolvem-se em embriões somáticos, por meio de uma série de mudanças fisiológicas e morfológicas (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). A via morfogênica da ES pode ser influenciada por diversos fatores, como as condições *in vitro* e os aspectos genéticos e epigenéticos das células do explante (FEHÉR, 2015). Os reguladores de crescimento, em especial, são essenciais para o controle do desenvolvimento e crescimento da planta, participando da sinalização e indução de respostas fisiológicas (VONDRÁKOVÁ et al., 2016). Auxinas, citocininas e ácido abscísico são os principais reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultura durante a ES. Em virtude do seu papel na regulação do ciclo celular e diferenciação celular, as auxinas são amplamente utilizadas para induzir a ES (FEHÉR et al., 2003; ESTRELLA-MALDONADO et al., 2018). Dentre as auxinas, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é o regulador de crescimento sintético mais utilizado, resultando no aumento dos níveis de auxina endógena e, com isso, desencadeando um gradiente hormonal adequado para induzir a ES (SHARMA et al., 2007; NIC-CAN & LOYOLA-VARGAS, 2016). As citocininas, na maioria das vezes, atuam em conjunto com as auxinas para estimular a divisão celular (FRANCIS & SORRELL, 2001). Estudos apontam que para algumas espécies somente a aplicação exógena de citocininas ao meio de cultura é suficiente para induzir o processo embriogênico (CUEVA-AGILA et al., 2016; SIVANESAN & JEONG, 2016). O ácido abscísico é outro regulador

de crescimento crucial para o processo de ES, atuando principalmente durante a fase de maturação do embrião e aumentando a tolerância da planta a diferentes condições adversas (KERMODE, 2005; RAI et al., 2011; VONDRÁKOVÁ et al., 2016).

Além dos reguladores de crescimento, diversas proteínas extracelulares podem atuar na regulação da ES (GAVISH et al., 1992; VON ARNOLD et al., 2002; JOSHI & KUMAR, 2013; VIKRANT, 2018) como por exemplo as proteínas arabinogalactanas (AGPs) e as proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA). As AGPs são essenciais para promover a ES em diversas espécies (STACEY et al., 1990; LETARTE et al., 2006). As proteínas LEA atuam fortemente nas fases finais da ES, promovendo a maturação do embrião somático, além de auxiliarem na proteção celular contra diferentes situações de estresse (KUMARAVEL et al., 2020).

Neste capítulo será realizada uma breve abordagem teórica acerca dos aspectos gerais da ES, relacionado principalmente com a atividade de alguns genes que participam desse processo, assim como o efeito dos reguladores de crescimento e a influência de proteínas extracelulares que podem atuar como potencial biomarcador dessa via de desenvolvimento vegetal *in vitro*.

2. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

ES é o processo pelo qual células somáticas se desenvolvem em estruturas bipolares, semelhantes à embriões zigóticos, com a presença dos estágios embrionários característicos, porém, sem fusão dos núcleos reprodutivos masculino e feminino e sem conexão vascular com o tecido original (WILLIANS & MAHESWARAN, 1986; JIMENEZ, 2001). Ela ocorre naturalmente em uma ampla diversidade de espécies ou pode ser induzida *in vitro* (WILLIANS & MAHESWARAN, 1986).

A capacidade de uma única célula somática vegetal, ou um conjunto destas, de formar embriões somáticos com capacidade de regenerar plantas inteiras é denominada totipotência e foi inicialmente hipotetizada e estudada *in vitro* por Haberlandt em 1902 (FEHÉR, 2019). Haberlandt se baseou na teoria celular dos pesquisadores Schleiden (1838) e Schwann (1839), que afirmava que os organismos

eram formados por células individuais com capacidade para crescer e se dividir de forma independente (SCHLEIDEN, 1838; SCHWANN, 1839; HORSTMAN et al., 2017). E em 1958, Steward et al. e Reinert, trabalhando com *Daucus carota*, conseguiram pela primeira vez obter embriões somáticos (STEWART et al., 1958; REINERT, 1958). A partir de então, a ES *in vitro* tem sido realizada em diversas espécies e para diferentes finalidades (HORSTMAN et al., 2017).

As condições para indução da ES decorrem, inicialmente, da desdiferenciação das células somáticas, seguida ou concomitante com a obtenção da capacidade totipotente. Na fase totipotente, as células conseguem identificar sinais que levam à embriogênese, e, envolvidas com o processo, prosseguem o seu desenvolvimento conforme condições *in vitro* (FEHÉR, 2015). Desta forma, a ES pode ser dividida em duas fases: indução e expressão. A primeira fase de indução é marcada por mudanças na expressão gênica, e, por conseguinte, no metabolismo celular (CAMPOS et al., 2017). Na fase de indução, as células somáticas diferenciadas do explante adquirem características embriogênicas e se proliferam de maneira semelhante em relação às células dos meristemas vegetativos da planta. Já a segunda fase, fase de expressão, está associada à própria expressão do embrião somático (JIMENEZ, 2001; ALMEIDA et al., 2008).

A ES pode ser conduzida por duas vias. Na via indireta há a formação de uma fase intermediária de calo, uma massa celular em estado de desdiferenciação. Na via direta, os embriões se originam diretamente do explante, que pode ser fragmento de folha, inflorescência, hipocótilo, ápice caulinar e embriões zigóticos (IKEUCHI et al., 2013; HORSTMAN et al., 2017).

O conhecimento acerca de como a ES se desenvolve e a razão de estar limitada à determinados genótipos, explantes e células, ainda não está bem elucidado (FEHÉR, 2015). Entretanto, sabe-se que vários fatores podem levar à indução da ES *in vitro*, como o estresse (calor, frio, pH, radiação ultravioleta, deficiência hídrica, choque osmótico, DE-LA-PEÑA et al., 2015; LOYOLA-VARGAS, 2016) e elevadas concentrações de reguladores de crescimento principalmente auxinas e citocininas (FEHÉR, 2015; CAMPOS et al., 2017), cuja proporção/relação determinam qual via morfogênica o tecido cultivado irá seguir (FEHÉR, 2019). Todavia, outros reguladores de crescimento também vêm sendo reportados, como o ácido abscísico (ABA) (JIMÉNEZ, 2005).

Esses reguladores de crescimento modulam a expressão gênica das células somáticas e induzem a expressão de um conjunto distinto de genes, que por sua vez, irão regular as mudanças de um estágio de desenvolvimento para o outro, levando à formação e o desenvolvimento dos embriões somáticos (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019; GULZAR et al., 2020).

3. REGULADORES DE CRESCIMENTO E FAMÍLIAS DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

3.1. Reguladores de Crescimento

Os reguladores de crescimento vegetais desempenham papel fundamental no controle do desenvolvimento e crescimento das plantas. Esses compostos participam da transdução de sinal entre células, tecidos e órgãos da planta, reconhecendo receptores específicos e induzindo respostas fisiológicas (VONDRÁKOVÁ et al., 2016). Nesse item, apresentaremos uma breve abordagem sobre três grupos de reguladores de crescimento que são fundamentais no processo de ES: auxinas, citocininas e ácido abscísico.

As auxinas são os principais reguladores de crescimento que atuam na indução da ES em virtude do seu papel crucial na regulação do ciclo celular e na diferenciação celular (FEHÉR et al., 2003; ESTRELLA-MALDONADO et al., 2018). Assim, os explantes são comumente inoculados em meio de cultura contendo auxinas para induzir a formação de massas pró-embriogênicas e, posteriormente, a concentração deste regulador de crescimento no meio de cultura é reduzida ou removida para estimular o desenvolvimento dos embriões somáticos (JIMÉNEZ, 2005). Dentre as auxinas mais usadas na cultura de tecidos vegetais destacam-se o ácido indol-3-acético (AIA) de origem natural, e as auxinas sintéticas como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o ácido 1-naftalenoacético (ANA) e o ácido 3-indolbutírico (AIB) (KAMADA & HARADA, 1979; BECWAR et al., 1989; MICHALCZUK et al., 1992; FILIPPOV et al., 2006; TANG et al., 2020). O emprego do 2,4-D no meio de cultura proporciona o melhor desempenho na indução da ES em diferentes espécies vegetais (NIC-CAN & LOYOLA-VARGAS, 2016). Conforme Michalczuk et al. (1992) e Sharma et al. (2007), o 2,4-D promove

o aumento do nível de auxina endógena nos explantes, estimulando a divisão celular e proporcionando o estabelecimento de um gradiente hormonal adequado para a indução da ES. Embora o 2,4-D atue na formação dos embriões somáticos, ele também é um indutor de estresse e por este motivo a sua remoção é necessária para que as etapas seguintes do desenvolvimento do embrião possam acontecer (HORSTMAN et al., 2017; GARCIA et al., 2019).

Nas plantas, a auxina pode ser transportada para locais distantes dos tecidos de origem por meio do floema, e pode ser distribuída de célula a célula por meio do transporte polar de auxinas (PETRÁSEK & FRIML, 2009; GOUVEA et al., 2019). Petrásek & Friml (2009) sugeriram que em *Arabidopsis thaliana* o transporte de auxinas para os tecidos absorventes é mediado por transportadores de influxo de auxinas, identificados como AUX1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) que são proteínas transmembrana e por transportadores de efluxo de auxinas identificados como proteínas PINs. Além disso, essas famílias de proteínas participam da formação do gradiente de auxinas (TVOROGOVA et al., 2015). Em *Carica papaya*, Estrella-Maldonado et al. (2018) mostraram que houve um aumento na expressão dos genes que participam do transporte de influxo de auxinas (*CpAUX1*, *CpLAX*, *CpLAX2* e *CpLAX3*) conforme o processo de ES se dá. Entretanto, dentre os genes do transporte de efluxo de auxinas, apenas *CpPIN1*, *CpPIN3* e *CpPIN4* exibiram aumento na expressão à medida que o embrião somático se desenvolve. Portanto, o aumento do nível de auxina endógena e o transporte polar de auxinas são extremamente importantes para o sucesso do processo de indução de embriões somáticos (TANG et al., 2020).

Além das auxinas, as citocininas têm grande impacto na determinação do processo de ES, uma vez que quando adicionadas ao meio de cultura estimulam a divisão celular (FRANCIS & SORRELL, 2001). Porém, o efeito desse regulador de crescimento na ES é variável (BERNULA et al., 2020). Em diversos sistemas, a indução de embriões somáticos é mediada pela combinação de auxinas e citocininas no meio de indução (GAJ, 2004). No entanto, para algumas espécies vegetais apenas a adição de citocininas como regulador de crescimento no meio de cultura é suficiente para estimular a formação de embriões somáticos (CUEVA-AGILA et al., 2016; SIVANESAN & JEONG, 2016). Dentre as citocininas mais utilizadas nos protocolos de indução de ES destacam-se: 6-benzilaminopurina

(BAP), tidiazuron (TDZ) e 2-isopenteniladenina (2-iP) (SIVANESAN & JEONG, 2016).

Jones et al. (2010) apontaram que as citocininas são fundamentais para elevar os níveis de auxina endógena durante o desenvolvimento dos tecidos da raiz e da parte aérea em *A. thaliana*, sugerindo que existe um mecanismo de sinalização que regula os níveis de auxina e citocininas no desenvolvimento da planta. Em virtude disso, Méndez-Hernández et al. (2019) indicaram que um mecanismo de sinalização semelhante pode estar atuando durante a indução da ES.

Além das auxinas e citocininas, o ácido abscísico é um importante regulador de crescimento que atua em vários processos de desenvolvimento da planta, assim como em resposta a alguma condição de estresse (VONDRÁKOVÁ et al., 2016). A fase de maturação é um dos estágios cruciais da ES. O ácido abscísico e a sacarose são fundamentais nesse momento, promovendo o acúmulo de compostos de reserva, como proteínas, lipídeos e carboidratos (MISRA, 1994; VON ADERKAS et al., 2002; KERMODE, 2005; HAZUBSKA-PRZYBYL et al., 2016). Além disso, esse regulador de crescimento aumenta a tolerância à dessecação e inibe a germinação precoce (KERMODE, 2005; RAI et al., 2011). Em diversas espécies vegetais o ácido abscísico pode inibir a indução da ES (RAI et al., 2011). Todavia, Nishiwaki et al. (2000) relataram a formação de embriões somáticos de *Daucus carota* L. em meio de cultura composto apenas com ácido abscísico como regulador de crescimento. De acordo com Rai et al. (2011) a explicação para esse fato é que a aplicação exógena de ácido abscísico no meio de cultura pode aumentar os níveis de auxina endógena do explante e, conseqüentemente, induzir a formação de embriões somáticos.

3.2. Proteínas da Matriz Extracelular

O processo de ES é complexo e dependente de vários compostos e/ou macromoléculas orgânicas reguladores que são secretados no meio de cultura (VIKRANT, 2018). Estudos têm apontado que proteínas podem influenciar no desenvolvimento da ES, induzindo ou inibindo a resposta embriogênica (GAVISH et al., 1992; VON ARNOLD et al., 2002; JOSHI & KUMAR, 2013; VIKRANT, 2018). Aqui, reportaremos duas famílias de proteínas extracelulares

que são potenciais marcadores da ES: proteínas arabinogalactanas (AGPs – *Arabinogalactan proteins*) e proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA – *late embryogenesis abundant*).

As proteínas arabinogalactanas consistem em um grupo de macromoléculas importantes para o desenvolvimento do embrião somático (VON ARNOLD et al., 2002). Esses polipeptídeos são comumente encontrados em diferentes locais da célula, como matriz celular e parede celular (MAJEWSKA-SAWKA & NOTHNAGEL, 2000). As AGPs são constituídas por cerca de 90% de carboidratos, principalmente arabinose e galactose, e por um esqueleto de proteína rico em hidroxiprolina, prolina, treonina, serina e alanina (DU et al., 1996; MAJEWSKA-SAWKA & NOTHNAGEL, 2000). Uma das grandes características dessa família de proteínas é a capacidade de promover a ES em diversas espécies vegetais, como *Daucus carota* L. (STACEY et al., 1990) e *Triticum aestivum* L. (LETARTE et al., 2006). Além disso, alguns trabalhos mostraram que a adição de AGPs ao meio de cultura favorece o aumento da resposta embriogênica em diversas espécies, enquanto a remoção dessa substância pode promover a diminuição da capacidade de formação de embriões (KREUGER & VAN HOLST, 1993; VAN HENGEL et al., 2001).

Outro grupo de proteínas que são expressas no processo de ES são as proteínas abundantes na embriogênese tardia. As proteínas LEA são amplamente encontradas nas fases finais da ES e quando a planta está sob condições de estresse hídrico (HUNDERTMARK & HINCHA, 2008; MAGWANGA et al., 2018). Esses polipeptídeos pertencem a um grupo de proteínas hidrofílicas ricas em glicina amplamente presentes em diferentes espécies vegetais (AMARA et al., 2014). As proteínas LEA, em conjunto com outros polipeptídeos, auxiliam na proteção celular contra diferentes estresses abióticos, promovendo a maturação do embrião somático (KUMARAVEL et al., 2020). Estudos apontam que os genes que codificam essas proteínas podem ser expressos em resposta a diversos fatores, como o aumento dos níveis de ácido abscísico, condições de frio, seca e altas concentrações salinas (SKRIVER & MUNDY, 1990; BRAY, 1994; WANG et al., 2003). Liang et al. (2013) mostraram que a proteína LEA apresentou resultados positivos na tolerância à seca e ao estresse salino em plantas transgênicas de *A. thaliana*.

4. FATORES DE TRANSCRIÇÃO ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A reprogramação das células diferenciadas de um explante para aquisição de competência embriogênica requer a ação coordenada de diferentes vias de sinalização. Tais vias integram a regulação ao nível genético, epigenético e hormonal, desencadeando o “gatilho” que inicia o processo embriogênico (GULZAR et al., 2020). De modo geral, a exposição dos explantes às auxinas exógenas, como o 2,4-D, ou outros tipos de estresse, é necessária para induzir a expressão de diferentes genes que regulam a transição de cada etapa da ES (FEHÉR, 2015; HORTSMAN et al., 2017). Em virtude do seu caráter multifatorial, a identificação dos genes envolvidos na ES e o entendimento de como as vias de sinalização se convergem é um dos maiores desafios da biologia vegetal. No entanto, a combinação de análises experimentais e comparativas entre transcriptomas, principalmente os provenientes de estudos com embriões zigóticos, tem possibilitado identificar diferentes genes candidatos associados a ES (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

Embora os mecanismos envolvidos na reprogramação da expressão gênica ainda não sejam totalmente compreendidos, vários genes candidatos foram associados à expressão da totipotência celular, incluindo genes envolvidos na transcrição, transdução de sinal, modificação pós-tradução, fosforilação de proteínas, resposta a PGR, reparo de DNA e metilação. O comprometimento das células com a embriogênese, por sua vez, é dependente de genes envolvidos na transdução de sinal, sinalização mediada por hormônios, organização de microtúbulos, metilação de DNA, regulação da transcrição e apoptose (WINKELMAN, 2016). Dentre os fatores de transcrição encontrados durante a indução de ES, destacam-se: *BABY BOOM (BBM)* (FLOREZ et al., 2015), *LEAFY COTYLEDON (LEC)* (IWASE et al., 2015), *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR LIKE KINASE (SERK)* (PÉREZ-PASCUAL et al., 2018) e *WUSCHEL (WUS)* (XIAO et al., 2018).

4.1. *SERK* – *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*

O gene *SERK* codifica um fator de transcrição envolvido na aquisição de competência embriogênica. Inicialmente, o gene *SERK* foi isolado a partir

de suspensões celulares de *Daucus carota* L. estabelecidas *in vitro* a partir de hipocótilos, sendo chamado *DcSERK*. O aumento na expressão do gene *SERK* foi detectado em uma subpopulação de células com vacúolos aumentados nos primeiros dias de cultivo das suspensões celulares na presença de 2,4-D, cessando após o estágio globular do embrião somático (SCHMIDT et al., 1997). Esse padrão de expressão também já foi observado nos embriões zigóticos de *D. carota*, enfatizando a similaridade molecular entre as vias de ES e zigótica (KARAMI et al., 2009).

O produto da expressão do gene *SERK* é uma proteína transmembrana da superfamília dos receptores quinase ricos em leucina (*leucine-rich repeat receptor like kinase* – *LRR-RLK*). A estrutura da proteína inclui um peptídeo sinal, um zíper de leucina, um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR), um domínio Serina-Prolina-Prolina (SPP), um domínio transmembrana (TM), um domínio quinase intracelular e a porção C-terminal (PÉREZ-NÚÑEZ, et al., 2009). Sua ativação ocorre pela interação com um ligante por meio do domínio LRR, desencadeando uma cascata de sinalização que altera a expressão gênica por remodelamento da cromatina (ZHANG et al., 2016). Em *A. thaliana*, o produto do gene *AtSERK1* tem atividade quinase intrínseca, e sua ativação envolve autofosforilação do resíduo de treonina 468. A proteína *SERK* traduz o sinal da superfície da membrana para o seu centro ativo, e regula as proteínas subsequentes por meio de fosforilações (SHAH et al., 2001).

O aumento da expressão do gene *SERK* durante o processo embriogênico tem sido detectado em diversas espécies de plantas, incluindo *Zea mays* L. (BAUDINO et al., 2001), *Triticum aestivum* L. (SINGH & KHURANA, 2017) e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (PÉREZ-PASCUAL et al., 2018). Evidências da participação do gene *SERK* na indução da ES têm sido observadas principalmente em análises de expressão gênica. Em *A. thaliana*, por exemplo, *SERK1* é altamente expresso durante a formação das células embriogênicas *in vitro* até o estágio cordiforme do embrião somático. A partir desse momento, sua expressão não é mais detectada no embrião somático. Embora a superexpressão do gene *AtSERK1* não tenha resultado em nenhuma alteração no fenótipo das plantas transformadas, um aumento de 3 a 4 vezes na eficiência de iniciação da ES foi observado. Isso indica que o gene *SERK1* atua conferindo competência

embriogênica para células somáticas em cultivo *in vitro* (HECHT et al., 2001). Na espécie *T. aestivum*, os genes da família *SERK* também são superexpressos e também exibem expressão diferencial em resposta a diferentes reguladores de crescimento. *SERK2* e *SERK3*, por exemplo, desencadeiam cascatas de sinalização em resposta a auxinas, enquanto *SERK1* e *SERK5* provavelmente estão envolvidos na sinalização em resposta a brassinosteroides (SINGH & KHURANA, 2017).

4.2. *LEC – Leafy Cotyledon*

Outros membros importantes das vias de regulação da ES e do desenvolvimento de embriões somáticos e zigóticos são os fatores de transcrição da família *LEC*. Na embriogênese zigótica, o gene *LEC1* tem um papel central, atuando no controle de diversos processos durante o desenvolvimento da semente, incluindo a morfogênese, maturação e germinação do embrião (TVOROGOVA & LUTOVA, 2018). Além disso, o gene *LEC1* também está envolvido na fotossíntese, biogênese de cloroplastos (PELLETIER et al., 2017) e na biossíntese de giberelinas (CURABA et al., 2004) durante o desenvolvimento da semente. A rede de genes regulados pelo *LEC1* mostrou ser altamente conservada em duas espécies de dicotiledôneas que divergiram a cerca de 92 milhões de anos, *A. thaliana* e *Glycine max* (L.) Merr. (PELLETIER et al., 2017).

O grupo de genes *LEC* inclui os fatores de transcrição *LEC1*, *LEC2* e *FUSCA3* (*FUS3*). Uma característica marcante desses genes é que eles atuam tanto durante os estágios iniciais quanto nos estágios tardios da embriogênese (HARADA, 2001). O gene *LEC1* codifica a subunidade *HAP3* (*heme-activated proteins 3*) de um fator de transcrição nuclear de ligação à CCAAT box chamado NF-Y (*nuclear factor of the Y 9 box/CCAAT binding factor*). Por outro lado, os genes *LEC2* e *FUS3* codificam fatores de transcrição que possuem um domínio B3 de ligação ao DNA que é encontrado apenas em plantas (NOWAK & GAJ, 2016). Esses fatores de transcrição, em conjunto, fazem parte de uma rede maior de interações entre proteínas chamada *LAF1 – LEC1*, ácido abscísico, *FUS3* e *LEC2* – que regulam a identidade e maturação do embrião, sendo *LEC2* o mais bem estudado (HORSTMAN et al., 2017).

Em *A. thaliana*, mutações de perda de função para qualquer um dos três

genes *LEC* resultam em pouca ou nenhuma resposta embriogênica durante a indução da ES, afetando a manutenção do estado embriogênico e também a especificação da identidade dos cotilédones (GAJ et al., 2005). Por outro lado, a expressão ectópica de *LEC1* e *LEC2* induz a formação espontânea de embriões somáticos em cotilédones e folhas de plântulas da mesma espécie, sugerindo que tais genes desempenham papel central na atribuição de competência embriogênica às células somáticas (LOTAN et al., 1998; STONE et al., 2001). Stone et al. (2001) demonstraram também que diversos genes de enzimas envolvidas na biossíntese de auxinas durante a ES de *A. thaliana* são ativadas dentro de uma hora após a indução da atividade de *LEC2*. Desse modo, sua capacidade de induzir a ES em tecidos vegetativos está associada, em parte, ao aumento na indução da biossíntese de auxinas endógenas (STONE et al., 2001).

A superexpressão de *LEC2* em *A. thaliana* é capaz de induzir a ES em meio de cultura livre de auxinas, o que foi evidenciado pelo aumento significativo no conteúdo endógeno de AIA. (WÓJCIKOWSKA et al., 2013). Um dos grupos de genes cuja expressão é estimulada por *LEC2* durante a ES é o dos genes *YUCCA* (*YUC*), que codificam enzimas flavina monooxigenase com participação central na via de biossíntese de auxinas (STONE et al., 2008). Acredita-se que os genes *YUC* possam ser alvos diretos da ação de *LEC2*, porém análises experimentais ainda são necessárias para esclarecer o mecanismo de interação entre *LEC2* e *YUC* durante o processo da ES (NOWAK & GAJ, 2016).

Além de regular a biossíntese, *LEC2* regula a sinalização mediada por auxinas. A expressão ectópica do mesmo em plântulas de *A. thaliana* induz a ativação de componentes chave da via de resposta a auxina. Dentre eles estão os genes da família *Aux/IAA* (*IAA1*, *IAA17*, *IAA30* e *IAA31*), que codificam proteínas nucleares que atuam nos estágios iniciais da via (STONE et al., 2008). Além do aumento no nível de auxinas, a superexpressão de *LEC2* também promove mudanças consideráveis no acúmulo de citocinina, ácidos abscísico e salicílico, etileno e giberelinas, por meio da indução da expressão de genes que codificam proteínas como: *MES9* (*methylsterase9*) e *MES12* (WÓJCIKOWSKA & GAJ, 2015), *ERF022* (*ethylene-responsive transcription factor* – NOWAK; WÓJCIKOWSKA; GAJ, 2015) e *AGL15* (*agamous-like MADS-box protein AGL15* – WANG et al., 2004). *LEC1* também está associado ao metabolismo de

auxinas, interagindo com genes *YUC*, *Aux/IAA* e outros associados ao metabolismo de hormônios, como ácidos abscísico e jasmônico, e de carboidratos (JUNKER & BÄUMLEIN, 2012). Em contraste com *LEC1* e *LEC2*, a superexpressão de *FUS3* não é capaz de induzir a ES e *A. thaliana*, embora também ative a expressão de vários dos genes mencionados acima (NOWAK & GAJ, 2016).

4.3. *BBM – Baby Boom*

Outro regulador chave da totipotência celular em plantas é o *BBM*. O gene *BBM* foi isolado inicialmente a partir de culturas de micrósporos de *Brassica napus L.* e codifica um fator de transcrição da família *APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF)*, o qual se liga a uma sequência de DNA envolvida na resposta ao etileno, o GCC box (KIM et al., 2006). A família *AP2/ERF* é uma das maiores famílias de fatores de transcrição em *A. thaliana*, com cerca de 150 genes diferencialmente expressos. Existem 5 subfamílias que diferem em relação ao número de domínios *AP2/ERF* e ao nível de similaridade de suas sequências (SAKUMA et al., 2002).

Dentre os genes alvo de *BBM* durante a indução da ES em *A. thaliana* estão aqueles relacionados às vias de biossíntese (*YUC3,8*, *TAA1*), transporte (*PIN1,4*) e sinalização (*ARF2, 10*, *IAA2, 7, 28*) de auxinas (NOWAK & GAJ, 2016). Além disso, ensaios de imunoprecipitação da cromatina associados ao sequenciamento de nova geração (*ChIP-seq*) evidenciaram que *BBM* se liga diretamente aos promotores dos genes *LAF1*, mencionados no item 4.2, os quais possuem papel importante no desenvolvimento dos embriões somáticos, conectando as vias de regulação mediadas por *BBM* e *LEC*. Além disso, *BBM* também se liga ao promotor do fator de transcrição tipo MADS-box *AGL15*, envolvido no aumento da resposta embriogênica in vitro (HORSTMAN, 2015).

A característica particular das proteínas *BBM* é a presença de um motivo *bbm-1* conservado (GLSMIKTW), que está ausente nas outras proteínas da família (BILICHAK et al., 2018). A superexpressão de *BBM* também possibilita induzir a ES mesmo sem reguladores de crescimento, por meio da ativação de uma complexa rede de desenvolvimento associada ao crescimento e proliferação celular (PASSARINHO et al., 2008). Nas espécies *A. thaliana* e *B. napus*, a expressão

espaço-temporal de *BBM* muda ao longo dos estágios iniciais da embriogênese (KULINSKA-LUKASZEK et al., 2012) e sua expressão ectópica potencializa a proliferação de embriões somáticos, sendo suficiente para induzir a ES espontânea (FLOREZ et al., 2015). Durante o processo de ES, a expressão de *BBM* pode ser variável mesmo entre espécies próximas. No gênero *Coffea*, por exemplo, a expressão de genes *BBM* ocorre desde o estágio de calos embriogênicos, exibindo um aumento em suspensões celulares embriogênicas de *C. arabica* (SILVA et al., 2015). No entanto, para *C. canephora*, a expressão de *BBMI* só foi observada após a indução dos embriões somáticos (NIC-CAN et al., 2013; MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

4.4. *WUS* – *Wuschel*

Os genes *WOX* são uma família de genes que codificam polipeptídeos que consistem em um dos maiores grupos de fatores de transcrição, sendo únicos das plantas e pertencentes à superfamília dos genes homeobox. Genes homeobox codificam proteínas capazes de formar um homeodomínio altamente conservado de ligação ao DNA, com atividade central na regulação do desenvolvimento embrionário eucariótico. Nas plantas, as proteínas *WOX* estão envolvidas na regulação promoção da divisão celular e/ou prevenção da diferenciação celular prematura. Uma vez que são fatores de transcrição, elas regulam esses processos reprimindo ou ativando seus alvos, dependendo do tipo celular e estágio de desenvolvimento. Quinze membros da família de genes *WOX* já foram identificados no genoma de *A. thaliana* (*WUS* e *WOX1-14*). No entanto, poucos foram caracterizados em detalhe, sendo o gene *WUS* o mais estudado entre eles (NOWAK & GAJ, 2016). Esse gene, que codifica a proteína *WUSCHEL*, foi identificado inicialmente como um regulador da formação e manutenção do meristema apical caulinar (*SAM* – *shoot apical meristem*). Além do domínio homeobox conservado, *WUS* contém uma região C-terminal, também conservada, com três domínios funcionais: um domínio ácido, um *WUS*-box (TLPLFPMH), e um motivo EAR (*ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif*) (IKEDA et al., 2009).

A atuação de *WUS* na regulação do crescimento do meristema apical do

caule (*SAM – shoot apical meristem*) é bem conhecida. Uma das características marcantes da proteína *WUS* é sua capacidade de se mover de um tecido para o outro. O sítio de biossíntese de *WUS* é a zona central do *SAM*. Posteriormente, *WUS* migra para as camadas de células-filhas presentes na zona periférica, onde se liga ao promotor do gene *CLAVATA3 (CVL3)* e ativa a expressão da proteína *CVL3* que, por sua vez, é um regulador negativo de *WUS* (YADAV et al., 2011). Desse modo, *WUS* não apenas especifica o destino das células-tronco da zona central, mas também ativa seu próprio regulador negativo, gerando um sistema de retroalimentação *WUS-CVL* que possibilita a manutenção do número constante de células-tronco na zona central e, conseqüentemente, do tamanho do *SAM* (ZHANG et al., 2017). Como resultado deste controle da expressão gênica, o gene *WUS* é considerado essencial tanto para a embriogênese zigótica, como para a indução da ES *in vitro* (XIAO et al., 2018).

O papel do *WUS* na promoção da embriogênese foi descoberto durante a indução da ES de *A. thaliana*, onde a superexpressão de *WUS* foi suficiente para induzir o aumento na formação dos embriões sem a adição de reguladores de crescimento (ZUO et al., 2002). Além disso, o aumento na transcrição do gene *WUS* endógeno já foi observado durante a indução da ES em diferentes espécies, como *C. canephora* (ARROYO-HERRERA et al., 2008) e *G. hirsutum* (ZHENG et al., 2014). Na espécie *C. canephora*, a superexpressão do *WUS* resultou em um aumento de 400% na produção de embriões somáticos (ARROYO-HERRERA et al., 2008). A expressão ectópica de *AtWUS* em calos de *G. hirsutum*, uma espécie conhecida como recalcitrante para a regeneração *in vitro* por ES, promoveu um aumento significativo na taxa de diferenciação dos calos embriogênicos, embora os embriões somáticos tenham exibido anormalidades morfológicas. Ao nível molecular, a expressão do *AtWUS* induziu a transcrição de genes essenciais para a resposta embriogênica, como os fatores de transcrição *LECI*, *LEC2* e *FUS3*, além dos genes *PIN7* e *SHY2* que atuam nas vias de transporte e sinalização relacionadas às auxinas (ZHENG et al., 2014).

Além do *WUS*, o aumento da expressão dos genes *WOX4*, *WOX5*, *WOX8* e *WOX9* também foi observado ao longo da indução da ES *in vitro* (NOWAK & GAJ, 2016). De modo similar ao que ocorre para o gene *WUS*, a regulação do meristema apical da raiz (*RAM – root apical meristem*) e do meristema do

câmbio vascular é dependente da expressão dos genes *WOX5* (SARKAR et al., 2007) e *WOX4* (HIRAKAWA et al., 2010), respectivamente. Em *A. thaliana*, os transcritos dos genes *WOX2*, *WOX8* e *WOX9* se acumulam nos estágios iniciais da embriogênese zigótica, com papel fundamental no controle da polaridade das divisões celulares (UEDA et al., 2011). De modo similar, a transcrição dos genes *WOX2*, *WOX8* e *WOX9* em culturas embriogênicas de *Picea abies* (L.) Karsten também iniciou logo os primeiros estágios da ES e ao longo do desenvolvimento dos embriões (PALOVAARA et al., 2010).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ES vem sendo descrita e aplicada em diversas espécies e em algumas delas até já se tornou um procedimento de rotina (GUAN et al., 2016). Contudo, o estabelecimento da ES ainda é limitado para outras tantas espécies, pois o sucesso da resposta *in vitro* depende de vários fatores, tais como o genótipo, o estado fisiológico da planta, a composição do meio de cultivo, o tempo de exposição aos reguladores de crescimento e as condições ambientais submetidas (FUENTES-CERDA et al., 2001; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006; LOYOLA-VARGAS et al., 2008; NIC-CAN et al., 2016). Além disso, muitos dos processos envolvendo a ES ainda não são totalmente conhecidos, como por exemplo como as vias de sinalização da ES convergem e o papel de alguns genes reguladores ainda é um enigma (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019; GULZAR et al., 2020).

Contudo, a ES tem se revelado uma estratégia biotecnológica essencial para os cientistas e tem sido desenvolvida no mundo todo (LOYOLA-VARGAS & OCHOA-ALEJO, 2016). E nesse sentido, a ES, dentro da cultura de tecidos, tem sido um método importante usado como um sistema modelo para investigações de eventos genéticos, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário em plantas superiores, (QUEIROZ-FIGUEROA et al., 2006; CAMPOS et al., 2017), com o intuito de compreender os mecanismos genéticos e epigenéticos presentes em cada estágio (NEUMANN et al., 2009; LOYOLA-VARGAS, 2016). O entendimento de como esses processos são regulados permite conhecer os aspectos biológicos básicos do desenvolvimento da planta, e contribui para a melhoria dos protocolos de propagação *in vitro*

(LOYOLA-VARGAS & OCHOA-ALEJO, 2016).

Além do mais, a ES tem sido utilizada para a propagação massal de plantas nas mais diversas finalidades, como amplificação de material para testes na silvicultura (LELU-WALTER et al., 2013), regeneração de plantas com genótipos de interesse agrônômico e/ou ecológico, formação de sementes sintéticas (GUAN et al., 2016) e formação de bancos de germoplasma (LOYOLA-VARGAS, 2016; HORSTMAN et al., 2017). Em virtude da sua aplicabilidade, a ES vem sendo uma das estratégias mais adotada nos programas de melhoramento vegetal (HORSTMAN et al., 2017).

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e aos Programas de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo e da Universidade Federal de Viçosa pela infraestrutura e apoio acadêmico e profissional.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. A. S.; SILVAROLLA, M. B.; FAZUOLI, L. C.; STANCATOS, G. C. Embriogênese somática em genótipos de *Coffea arabica* L. *Coffee Science*. Lavras, v. 3, n. 2, p. 143-151, 2008.

AMARA, I.; ZAIDI, I.; MASMOUDI, K.; LUDEVID, M. D.; PAGÈS, M.; GODAY, A.; BRINI, F. Insights into late embryogenesis abundant (*LEA*) proteins in plants: from structure to the functions. *American Journal of Plant Sciences*, v. 5, n. 22, p. 3440-3455, 2014.

ARROYO-HERRERA, A.; GONZALEZ, A. K.; MOO, R. C.; QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; RODRIGUEZ-ZAPATA, L. C.; D'HONDT, C. B.; SUÁREZ-SOLÍS, V. M.; CASTAÑO, E. Expression of *WUSCHEL* in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 94, n. 2, p. 171-180, 2008.

BAUDINO, S.; HANSEN, S.; BRETTSCHEIDER, R.; HECHT, V. F.; DRESSELHAUS, T.; LÖRZ, H.; DUMAS, C.; ROGOWSKY, P. M. Molecular

characterisation of two novel maize *LRR* receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. *Planta*, v. 213, n. 1, p. 1-10, 2001.

BECWAR, M. R.; NOLAND, T. L.; WYCKOFF. Maturation, germination, and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, v. 25, n. 6, p. 575-580, 1989.

BERNULA, D.; BENKŐ, P.; KASZLER, N.; DOMONKOS, I.; VALKAI, I.; SZÖLLŐSI, R.; FERENC, G.; AYAYDIN, F.; FEHÉR, A.; GÉMES, K. Timely removal of exogenous cytokinin and the prevention of auxin transport from the shoot to the root affect the regeneration potential of Arabidopsis roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 140, n. 2, p. 327-339, 2020.

BILICHAK, A.; LUU, J.; JIANG, F.; EUDES, F. Identification of *BABY BOOM* homolog in bread wheat. *Agri Gene*, v. 7, p. 43-51, 2018.

BRAY, E. A. Alterations in gene expression in response to water deficit. *Stress-Induced Gene Expression in Plants* (Basra, AS, ed.). Harwood Academic, p. 1-23, 1994.

CAMPOS, N. A.; PANIS, B.; CARPENTIER, S. C. Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, n. 1460, august 2017.

CETZ-CHEL, J. E.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Transcriptome profile of somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications. Springer, 2016. p.39-52.

CUEVA-AGILA, A. Y.; MEDINA, J.; CONCIA, L.; CELLA, R. Effects of plant growth regulator, auxin polar transport inhibitors on somatic embryogenesis and *CmSERK* gene expression in *Cattleya maxima* (Lindl.). In: MUJIB, A. (Ed.). Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications. Springer, 2016. p. 255-267.

CURABA, J.; MORITZ, T.; BLERVAQUE, R.; PARCY, F.; RAZ, V.; HERZOG, M.; VACHON, G. *AtGA3ox2*, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by *LEAFY COTYLEDON2* and *FUSCA3* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 136, n. 3, p. 3660-3669, 2004.

DE-LA-PEÑA, C.; NIC-CAN, G. I.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; AVILEZ-MONTALVO, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. *Frontiers in Plant Science*. v. 6, p. 635, august 2015.

DU, H.; CLARKE, A. E.; BACIC, A. Arabinogalactan-proteins: a class of extracellular matrix proteoglycans involved in plant growth and development. *Trends in Cell Biology*, v. 6, n. 11, p. 411-414, 1996.

ESTRELLA-MALDONADO, H; POSADA-PÉREZ, L.; TALAVERA, M. C.; BARREDO, P. F.; GÓMEZ-KOSKY, R.; SANTAMARÍA, J. M. The expression of *CpAUX1/LAXs* and most of the long-distance *CpPINs* genes increases as the somatic embryogenesis process develops in *C. papaya* cv.“Red Maradol”. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 37, n. 2, p. 502-516, 2018.

FEHÉR, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, v.10, n. 536, april 2019.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 74, p. 201-228, september 2003.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. v. 1849, n. 4, p. 385-402, april 2015.

FILIPPOV, M.; MIROSHNICHENKO, D.; VERNIKOVSKAYA, D.; DOLGOV, S. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 84, n. 2, p. 213-222, 2006.

FLOREZ, S. L.; ERWIN, R. L.; MAXIMOVA, S. N.; GUILTINAN, M. J.; CURTIS, W. R. Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous *BABY BOOM* transcription factor. *BMC plant biology*, v. 15, n. 1, p. 121, 2015.

FRANCIS, D.; SORRELL, D. A. The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regulation*, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2001.

FUENTES-CERDA, C. F. J.; MONFORTE-GONZÁLEZ, M.; MÉNDEZ-ZEEL, M.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by nitrogen source. *Biotechnol Letters*, v. 23, p. 1341–1343, august 2001.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, v. 43, p. 27-47, may 2004.

GAJ, M. D.; ZHANG, S.; HARADA, J. J.; LEMAUX, P. G. *Leafy cotyledon* genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, v. 222, n. 6, p. 977-988, 2005.

GARCIA, C.; FURTADO DE ALMEIDA, A. A.; COSTA, M.; BRITTO, D.; VALLE, R.; ROYAERT, S.; MARELLI, J. P. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 137, p. 193-212, 2019.

GAVISH, H.; VARDI, A.; FLUHR, R. Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. *Planta*, v. 186, n. 4, p. 511-517, 1992.

GOUVEA, D. S.; CHAGAS, K.; CIPRIANO, J. L. D.; LOPES, J. C.; SCHMILDT, E. R.; OTONI, W. C.; SCHMILDT, O.; ARAÚJO, C. P.; ALEXANDRE, R. S. Somatic embryogenesis in the commercial papaya hybrid UENF/Caliman 01 relying on plantlet production from sexed adult hermaphrodite donor plants. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 91, n. 3, p. 1-14, 2019.

GUAN, Y.; LI, S. G.; FAN, X. F.; SU, Z. H. application of somatic embryogenesis in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. 938, 2016.

GULZAR, B.; MUJIB, A.; MALIK, M. Q.; SAYEED, R.; MAMGAIN, J.; EJAZ, B. Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2020.

HARADA, J. J. Role of *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON* genes in seed development. *Journal of Plant Physiology*, v. 158, n. 4, p. 405-409, 2001.

HAZUBSKA-PRZYBYL, T.; KALEMBA, E. M.; RATAJCZAK, E.; BOJARCZUR, K. Effects of abscisic acid and an osmoticum on the maturation, starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 38, n. 2, p. 59, 2016.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J. P.; HARTOG, M. V.; SCHMIDT, E. D.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S. C. The *Arabidopsis* *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, v. 127, n. 3, p. 803-816, 2001.

HIRAKAWA, Y.; KONDO, Y.; FUKUDA, H. TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *WOX4* homeobox gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, v. 22, n. 8, p. 2618-2629, 2010.

HORSTMAN, A. *BABY BOOM*-induced somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. Wageningen, 2015. 234 p. Tese – Wageningen University, Wageningen, 2015.

HORSTMAN, A.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*. v. 4, n. 4, p. 201-206, 2017.

HUNDERTMARK, M.; HINCHA, D. K. *LEA* (*late embryogenesis abundant*) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, v. 9, n. 1, p. 1-22, 2008.

IKEDA, M.; MITSUDA, N.; OHME-TAKAGI, M. *Arabidopsis WUSCHEL* is a bifunctional transcription factor that acts as a repressor in stem cell regulation and as an activator in floral patterning. *The Plant Cell*, v. 21, n. 11, p. 3493-3505, 2009.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell*. v. 25, n. 9, p. 3159-3173, september 2013.

IWASE, A.; MITA, K.; NONAKA, S.; IKEUCHI, M.; KOIZUKA, C.; OHNUMA, M.; EZURA, H.; IMAMURA, J.; SUGIMOTO, K. *WIND1*-based acquisition of regeneration competency in *Arabidopsis* and rapeseed. *Journal of Plant Research*, v. 128, n. 3, p. 389-397, 2015.

JIMÉNES, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*. v. 47, p. 91-110, november 2005.

JIMENEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. Lavras, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

JONES, B.; GUNNERÅS, S. A.; PETERSSON, S. V.; TARKOWSKI, P.; GRAHAM, N.; MAY, S.; DOLEZAL, K.; SANDBERG, G.; LJUNG, K. Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *The Plant Cell*, v. 22, n. 9, p. 2956-2969, 2010.

JOSHI, R.; KUMAR, P. Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review. *Agricultural Reviews*, v. 34, n. 1, p. 1-20, 2013.

JUNKER, A.; BÄUMLEIN, H. Multifunctionality of the *LEC1* transcription factor during plant development. *Plant signaling & behavior*, v. 7, n. 12, p. 1718-1720, 2012.

KAMADA, H.; HARADA, H. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures I. Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, v. 91, n. 3, p. 255-266, 1979.

KARAMI, O.; AGHAVAISI, B.; POUR, A. M. Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of chemical biology*, v. 2, n. 4, p. 177-190, 2009.

KARAMI, O.; SAIDI, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports*, v. 37, p. 2493-2507, June 2010.

KERMODE, A. R. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 24, n. 4, p. 319-344, 2005.

KIM, S.; SOLTIS, P. S.; WALL, K.; SOLTIS, D. E. Phylogeny and domain evolution in the *APETALA2-like* gene family. *Molecular Biology and Evolution*, v. 23, n. 1, p. 107-120, 2006.

KREUGER, M.; VAN HOLST, G. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, v. 189, n. 2, p. 243-248, 1993.

KULINSKA-LUKASZEK, K.; TOBOJKA, M.; ADAMIOK, A.; KURCZYNSKA, E. U. Expression of the BBM gene during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia plantarum*, v. 56, n. 2, p. 389-394, 2012.

KUMARAVEL, M.; UMA, S.; BACKIYARANI, S.; SARASWATHI, M. S. Proteomic analysis of somatic embryo development in *Musa* spp. cv. Grand Naine (AAA). *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

LELU-WALTER, M. A.; THOMPSON, D.; HARVENGT, L.; SANCHEZ, L.; TORIBIO, M.; PAQUES, L. E. Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genetics & Genomes*, v. 9, p. 883-899, April 2013.

LETARTE, J.; SIMION, E.; MINER, M.; KASHA, K. J. Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Reports*, v. 24, n. 12, p. 691-698, 2006.

LIANG, J.; ZHOU, M.; ZHOU, X.; JIN, Y.; XU, M.; LIN, J. *JcLEA*, a novel *LEA*-like protein from *Jatropha curcas*, confers a high level of tolerance to dehydration and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, v. 8, n. 12, p. 1-13, 2013.

LOTAN, T. OHTO, M. A.; YEE, K. M.; WEST, M. A.; LO, R.; KWONG, R. W.; YAMAGISHI, K.; FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; HARADA, J. J. *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, v. 93, n. 7, p. 1195-1205, 1998.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; DE-LA-PEÑA, C.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; QUIROZ-FIGUEROA, F. R. Plant tissue culture. In: WALKER, J. M.; RAPLEY, R. *Protein and Cell Biotechnology Handbook*, Humana Press, Totowa, p. 875-904, 2008.

LOYOLA-VARGAS, V.M. The history of somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. Springer, 2016. p. 11-22.

MAGWANGA, R. O.; LU, P.; KIRUNGU, J. N.; LU, H.; WANG, X.; CAI, X.; ZHOU, Z.; ZHANG, Z.; SALIH, H.; WANG, K.; LIU, F. Characterization of the *late embryogenesis abundant (LEA)* proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton. *BMC Genetics*, v. 19, n. 1, p. 1-31, 2018.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; NOTHNAGEL, E. A. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiology*, v. 122, n. 1, p. 3-10, 2000.

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, H. A.; LEDEZMA-RODRÍGUEZ, M.; AVILEZ-MONTALVO, R. N.; JUÁREZ-GÓMEZ, Y. L.; SKEETE, A.; AVILEZ-MONTALVO, J.; DE-LA-PEÑA, C.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in plant science*, v. 10, p. 77, 2019.

MICHALCZUK, L.; RIBNICKY, D. M.; COOKE, T. J.; COHEN, J. D. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiology*, v. 100, n. 3, p. 1346-1353, 1992.

MISRA, S. Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis, and seed germination: biochemical and molecular advances. *Seed Science Research*, v. 4, n. 4, p. 357-384, 1994.

NIC-CAN, G. I.; AVILEZ-MONTALVO, J. R.; AVILES-MONTALVO, R. N.; MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E.; MELLADO-MOJICA, E.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The Relationship between stress and somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and Applications*. Springer, 2016. p. 39-52.

NIC-CAN, G. I.; LOPEZ-TORRES, A.; BARREDO-POOL, F.; WROBEL, K.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; 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, p. e72160, 2013.

NIC-CAN, G. I.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications. Springer, 2016. p. 171-182.

NISHIWAKI, M.; FUJINO, K.; KODA, Y.; MASUDA, K.; KIKUTA, Y. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. Planta, v. 211, n. 5, p. 756-759, 2000.

NOWAK, K.; GAJ, M. D. Transcription factors in the regulation of somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications. Springer, Cham, 2016. p. 53-79.

NOWAK, K.; WÓJCIKOWSKA, B.; GAJ, M. D. *ERF022* impacts the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis* through the ethylene-related pathway. Planta, v. 241, n. 4, p. 967-985, 2015.

PALOVAARA, J.; HALLBERG, H.; STASOLLA, C.; HAKMAN, I. Comparative expression pattern analysis of *WUSCHEL-related homeobox 2 (WOX2)* and *WOX8/9* in developing seeds and somatic embryos of the gymnosperm *Picea abies*. New Phytologist, v. 188, n. 1, p. 122-135, 2010.

PASSARINHO, P.; KETELAAR, T.; XING, M. et al. BABY BOOM target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. Plant molecular biology, v. 68, n. 3, p. 225-237, 2008.

PELLETIER, J. M.; KWONG, R. W.; PARK, S. et al. *LEC1* sequentially regulates the transcription of genes involved in diverse developmental processes during seed development. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 114, n. 32, p. E6710-E6719, 2017.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T.; SOUZA, R.; SÁENZ, L.; CHAN, J. L.; ZUNIGA-AGUILAR, J. J.; OROPEZA, C. Detection of a *SERK-like* gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. Plant Cell Reports, v. 28, n. 1, p. 11-19, 2009.

PÉREZ-PASCUAL, D.; JIMÉNEZ-GUILLEN, D.; VILLANUEVA-ALONZO, H.; SOUZA-PERERA, R.; GODOY-HERNÁNDEZ, G.; ZÚÑIGA-AGUILAR, J. J. Ectopic expression of the *Coffea canephora* *SERK1* homolog-induced differential transcription of genes involved in auxin metabolism and in the developmental control of embryogenesis. *Physiologia plantarum*, v. 163, n. 4, p. 530-551, 2018.

PETRÁŠEK, J.; FRIML, J. Auxin transport routes in plant development. *Development*, v. 136, n. 16, p. 2675-2688, 2009.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; MÉNDEZ-ZEEL, M.; LARQUÉ-SAAVEDRA, A.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports*, v. 20, p. 679–684, september 2001.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, v. 86, n. 285, august 2006.

RAI, M. K.; SHEKHAWAT, N. S.; GUPTA, A. K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 106, n. 2, p. 179-190, 2011.

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. *Naturwissenschaften*, v. 45, p. 344-345, 1958.

SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J. G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the *ERF/AP2* domain of *Arabidopsis* *DREBs*, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 290, n. 3, p. 998-1009, 2002.

SARKAR, A. K.; LUJITEN, M.; MIYASHIMA, S. et al Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*, v. 446, n. 7137, p. 811-814, 2007.

SCHLEIDEN, M. J. Beiträge zur phyto-genesis. *archiv für anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*, 1, p. 137-176, 1838.

SCHMIDT, E. D.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A.; DE VRIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, v. 124, n. 10, p. 2049-2062, 1997.

SCHWANN, T. Mikroskopische untersuchungen über die uebereinstimmung in der struktur und demwachstum der thiere und pflanzen. Berlin: Sander, 1839.

SHAH, K.; VERVOORT, J.; DE VRIES, S. C. Role of threonines in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. J Biol Chem, v. 276, p. 41263 – 41269, 2001.

SHARMA, S. K.; BRYAN, G. J.; MILLAM, S. Auxin pulse treatment holds the potential to enhance efficiency and practicability of somatic embryogenesis in potato. Plant Cell Reports, v. 26, n. 7, p. 945-950, 2007.

SILVA, A. T.; BARDUCHE, D.; DO LIVRAMENTO, K. G.; PAIVA, L. V. A putative *BABY BOOM*-like gene (*CaBBM*) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of *Coffea arabica* L. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, v. 51, n. 1, p. 93-101, 2015.

SINGH, A.; KHURANA, P. Ectopic expression of *Triticum aestivum* *SERK* genes (*TaSERKs*) control plant growth and development in *Arabidopsis*. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

SIVANESAN, I.; JEONG, B. R. Optimizing factors affecting somatic embryogenesis in *Cineraria*. In: MUJIB, A. (Ed.). Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications. Springer, 2016. p. 55-65.

SKRIVER, K.; MUNDY, J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. The Plant Cell, v. 2, n. 6, p. 503-512, 1990.

STACEY, N. J.; ROBERTS, K.; KNOX, J. P. Patterns of expression of the *JIM4* arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. Planta, v. 180, n. 2, p. 285-292, 1990.

STEWARD, F. C., MAPES, O. M.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells II: Organization in cultures grown from freely suspended cells. American Journal of Botany, v. 45, n. 10, p. 705-708, december 1958.

STONE, S. L.; BRAYBROOK, S. A.; PAULA, S. L.; KWONG, L. W.; MEUSER, J.; PELLETIER, J.; HSIEH, T. F.; FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; HARADA, J. J. *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON2* induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 105, n. 8, p. 3151-3156, 2008.

STONE, S. L.; KWONG, L. W.; YEE, K. M.; PELLETIER, J.; LEPINIEC, L.; FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; HARADA, J. J. *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 20, p. 11806-11811, 2001.

TANG, L. P.; ZHANG, X. S.; SU, Y. H. et al. Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis. *aBIOTECH*, p. 185-193, 2020.

TVOROGOVA, V. E.; LEBEDEVA, M. A.; LUTOVA, L. A. A. A. Expression of *WOX* and *PIN* genes during somatic and zygotic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Russian Journal of Genetics*, v. 51, n. 12, p. 1189-1198, 2015.

TVOROGOVA, V. E.; LUTOVA, L. A. Genetic regulation of zygotic embryogenesis in angiosperm plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 65, n. 1, p. 1-14, 2018.

UEDA, M.; ZHANG, Z.; LAUX, T. Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes *WOX8/9* links zygote polarity to embryo development. *Developmental cell*, v. 20, n. 2, p. 264-270, 2011.

VAN HENGEL, A. J.; TADESSE, Z.; IMMERZEEL, P.; SCHOLS, H.; VAN KAMMEN, A. B.; DE VRIES, S. C. N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, v. 125, n. 4, p. 1880-1890, 2001.

VIKRANT, J. P. Progress in understanding the regulation and expression of genes during plant somatic embryogenesis: A review. *J. Appl. Biol. Biotechnol.*, v. 6, p. 49-56, 2018.

VON ADERKAS, P.; ROHR, R.; SUNDBERG, B.; GUTMANN, M.; DUMONT-BÉBOUX, N.; LELU, M. A. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 69, n. 2, p. 111-120, 2002.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 69, n. 3, p. 233-249, 2002.

VONDRÁKOVÁ, Z.; KRAJŇÁKOVÁ, J.; FISCHEROVÁ, L.; VÁGNER, M.; ELIÁŠOVÁ, K. Physiology and role of plant growth regulators in somatic embryogenesis. *Vegetative Propagation of Forest Trees*, p. 123-169, 2016.

WANG, H.; CARUSO, L. V.; DOWNIE, A. B.; PERRY, S. E. The embryo MADS domain protein *AGAMOUS-Like 15* directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *The Plant Cell*, v. 16, n. 5, p. 1206-1219, 2004.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, v. 218, n. 1, p. 1-14, 2003.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, outubro 2010.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*. v. 57, p. 443-462, april 1986.

WINKELMANN, T. Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. In: GERMANA, M. A.; LAMBARDI, M. *In vitro* embryogenesis in higher plants. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 25-46.

WÓJCIKOWSKA, B.; GAJ, M. D. *LEAFY COTYLEDON2*-mediated control of the endogenous hormone content: implications for the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 121, n. 1, p. 255-258, 2015.

WÓJCIKOWSKA, B.; JASKÓŁA, K.; GASIOREK, P.; MEUS, M.; NOWAK, K.; GAJ, M. D. *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* promotes embryogenic induction in somatic tissues of *Arabidopsis*, via *YUCCA*-mediated auxin biosynthesis. *Planta*, v. 238, n. 3, p. 425-440, 2013.

XIAO, Y.; CHEN, Y.; DING, Y.; WU, J.; WANG, P.; YU, Y.; WEI, X.; WANG, Y.; ZHANG, C.; Li, F.; GE, X. Effects of *GhWUS* from upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) on somatic embryogenesis and shoot regeneration. *Plant Science*, v. 270, p. 157-165, 2018.

YADAV, R. K.; PERALES, M.; GRUEL, J.; GIRKE, T.; JÖNSSON, H.; REDDY, G. V. WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes & development*, v. 25, n. 19, p. 2025-2030, 2011.

ZHANG, H.; LIN, X.; HAN, Z.; WANG, J.; QU, L. J.; CHAI, J. *SERK* family receptor-like kinases function as co-receptors with *PXY* for plant vascular development. *Molecular plant*, v. 9, n. 10, p. 1406-1414, 2016.

ZHANG, T. Q.; LIAN, H.; ZHOU, C. M.; XU, L.; JIAO, Y.; WANG, J. W. A two-step model for de novo activation of *WUSCHEL* during plant shoot regeneration. *The Plant Cell*, v. 29, n. 5, p. 1073-1087, 2017.

ZHENG, W.; ZHANG, X.; YANG, Z. et al. *AtWuschel* promotes formation of the embryogenic callus in *Gossypium hirsutum*. *PloS one*, v. 9, n. 1, p. e87502, 2014.

ZUO, J.; NIU, Q. W.; FRUGIS, G.; CHUA, N. H. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, v. 30, n. 3, p. 349-359, 2002.

***Lactuca sativa* L.: BIOINDICADOR VEGETAL PARA PROSPECÇÃO DE TOXICIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGICIDAS**

Francielen Barroso Aragão

Iasmini Nicoli Galter

Ian Drumond Duarte

Maria Aparecida Marin Morales

Larissa Fonseca Andrade Vieira

Silvia Tamie Matsumoto

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem aumentado a preocupação com relação aos efeitos da poluição sobre a biota e, conseqüentemente, sobre os seres humanos. Para uma avaliação consistente dessa ação biológica dos poluentes ambientais, como resíduos industriais, urbanos, metais pesados, agrotóxicos ou outros xenobiontes, vem sendo utilizados diversos métodos, passíveis de serem aplicados em diferentes organismos. Entre os métodos utilizados, destacam-se os bioensaios realizados com bioindicadores específicos de poluição e toxicidade, por estes fornecerem dados complementares àqueles obtidos convencionalmente nas caracterizações químicas qualitativas e quantitativas dos compostos (BARDENA et al., 2011; IQBAL et al., 2019).

Da mesma forma, os estudos ecotoxicológicos e de mutagenicidade ambiental devem também associar ensaios químicos que caracterizem a composição e a concentração do resíduo/composto, bem como de seus constituintes, a bioensaios que permitam avaliar a ação desses agentes sobre o material biológico. Para tanto, estes estudos envolvem a utilização de bioensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, que permitem avaliar interferentes que atuam na integridade celular e genética, além de estimar, de forma real e funcional, a dimensão dos riscos para o meio biológico, causados pelos compostos (LAH et

al., 2008, MATEJCZYK et al., 2011; FROTA et al., 2019; MARTIN et al., 2020; PINHEIRO et al., 2020).

2. *Lactuca sativa* L.: BIOENSAIO VEGETAL

Os bioensaios realizados com plantas superiores, por apresentarem alta sensibilidade a diversos agentes mutagênicos, são indicados para avaliar danos potenciais no material genérico, como aberrações cromossômicas e mutações pontuais. Os vegetais são também considerados excelentes modelos biológicos (bioindicadores) a serem usados em ensaios de toxicidade, por possibilitarem a análise simultânea de mecanismos de ação em células de diferentes órgãos e tecidos (MALUSZYNSKA & JUCHIMIUK, 2005; LEME & MARIN MORALES, 2009; SILVEIRA et al., 2017; GHOSH et al., 2019). Além disso, estes bioensaios também atuam como eficientes ferramentas para analisar mecanismos de ação de componentes químicos derivados do metabolismo secundário de plantas (FERREIRA & AQUILA, 2000; MACÍAS et al., 2000; PANDARD et al., 2006).

Ensaios realizados com plantas superiores vem sendo amplamente utilizadas para avaliar os efeitos biológicos de substâncias ou de compostos complexos de diversas origens, como amostras diversas coletadas em ambientes aquáticos lóticos (GALTER, 2016; SANTOS et al., 2019) e lênticos (DUARTE, 2014; RAMOS et al., 2020); contaminadas com hidrocarbonetos (LEME & MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008; MACHADO, 2013; CRUZ et al., 2019), corantes (VENTURA, 2011; GOMES et al., 2013) e agrotóxicos (BIANCHI et al., 2016; ARAGÃO et al., 2019, BERNARDES et al., 2019).

As espécies *Lactuca sativa* L., *Allium cepa* L., *Tradescantia sp.*, *Vicia faba* L. e *Zea mays* L. destacam-se como os principais modelos vegetais utilizados em análises de citogenotoxicidade (MARTIN et al., 2020; SEMINI et al., 2020; AGHAJANYAN et al., 2020; OUBANE et al., 2020; EGUREFA et al., 2020; Gonçalves et al., 2020).

Lactuca sativa L é uma dicotiledônea da família Asteraceae (Compositae), originária do Oriente Médio, popularmente conhecido como alface, consumida mundialmente durante sua fase vegetativa (ABAURRE, 2004). Esta planta vem sendo muito utilizada como bioindicador de toxicidade, por apresentar

características vantajosas de análise, como plasticidade e boa correlação com outros sistemas teste usados para o mesmo fim; baixo custo; fácil manuseio; grande quantidade de sementes (SOUSA et al., 2009; SOUZA FILHO et al., 2010; GOMES et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012; SILVEIRA et al., 2017); cromossomos grandes, portanto facilmente visualizáveis; alta sensibilidade a fatores externos e a diversas substâncias, como as proveniente do metabolismo secundário e poluentes ambientais como metais pesados e defensivos agrícolas (ANDRADE et al., 2010; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014; ARAGÃO et al., 2015; LUBER et al., 2015; AGUIAR et al., 2016; FREITAS et al., 2016).

Carvalho et al. (2019) avaliaram o efeito alelopático de extrato etanólico de folhas de cinco espécies de *Amaranthus*, em células meristemáticas de *L. sativa*. Os autores constataram um efeitos alelopáticos do extrato para *L. sativa*, decorrentes da sinergia dos seus componentes. A fitotoxicidade foi dada pela ação aneugênica do extrato, que induziu uma diminuição da divisão celular, proporcionada pelo impedimento de ligação dos cromossomos ao fuso mitótico, que manteve a célula na fase de C-metáfase. Os autores REHMANULLAH et al. (2019) estudando os efeitos alelopáticos de extratos aquosos de folhas, cascas e frutos de *Cassia fistula* em *Lactuca sativa*, *Setaria italica* e *Pennisetum americanum*. Pelos resultados obtidos, os autores consideraram que *Lactuca sativa* foi o bioindicador que melhor respondeu ao estresse alelopático dos extratos.

O modelo *L. sativa* apresentou resultados positivos para estudos de fitotoxicidade de metais. Mot et. al (2019) avaliaram os efeitos de Cd, Cu, Ni, Pb, Co e Zn sobre a germinação e o crescimento de mudas de *L. sativa* e *Spinacia oleracea* L. Os autores observaram que o índice de germinação diminui proporcionalmente ao aumento dos níveis de metais, enquanto que a inibição do crescimento ocorre mesmo em baixas concentrações. *L. sativa* também tem demonstrado aplicabilidade na avaliação defensivos agrícolas, como observado por Silva et. al (2020), ao estabelecer um protocolo para a produção *in vitro* de mudas axênicas de braúna e avaliar a toxicidade de agentes desinfetantes (fungicida Captan ®) em *L. sativa*. Neste estudo, os autores constaram que o fungicida avaliado possui efeitos fitotóxico, citotóxico, genotóxico potentes, com ação clastogênica e aneugênica sobre o ciclo celular da *Lactuca sativa*, que podem levar a formação de mudas anormais em *M. brauna*.

Estudos realizados por Grecco (2020) mostraram que os fungicidas azoxistrobina (AZO) e carbendazim (CARB) possuem efeitos fitotóxico e citogenotóxico e induzem alterações bioquímicas em *L. sativa*. Neste estudo, o autor avaliou os parâmetros germinação; crescimento radicular; ciclo celular; alterações cromossômicas e nucleares, atividade das enzimas antioxidantes catalase, peroxidase do ascorbato e superóxido dismutase; e quantificação de glutathione reduzida. O bioindicador *L. sativa* também foi utilizado por Aragão et al. (2019) para avaliar os efeitos de fungicidas comerciais que contém os mesmos compostos ativos (grupo Triazol: Tebuconazol -TBZ e Dfenconazol -DFZ e grupo Dicarboximida: Procimidona -PRD e Iprodiona -IPD) sobre o ciclo celular de *L. sativa*, Esses autores observaram atividade citotóxica, evidenciada por alterações na proliferação celular, e ação genotóxica, pela presença de alterações cromossômicas, que confirmaram a sensibilidade e eficiência desse modelo vegetal na avaliação de toxicidade de xenobiontes.

3. BIOMARCADORES EM *Lactuca sativa* L.

3.1. Crescimento radicular e ciclo celular

As raízes são estruturas vegetais que permitem o desenvolvimento de ensaios de respostas rápidas, possuem alta sensibilidade a contaminantes e são as primeiras estruturas a serem expostas a agentes tóxicos dispersos no solo ou na água, por isso indicadas para serem usadas em avaliação da toxicidade de poluentes ambientais (FISKEJÖ, 1988; CLEMENS et al., 2002). Todavia, as respostas dos bioensaios realizados com raízes não se limitam ao único local de resposta do ensaio. O desencadeamento de toxicidade em organismos vegetais envolve uma rede complexa de mobilização, que vai desde a absorção pelas raízes, até o transporte e distribuição do agente por toda planta (CLEMENS et al., 2002). Estes processos provocam efeitos em níveis bioquímicos e moleculares, que levam a um desequilíbrio na homeostase de metais essenciais (SHARMA & DUBEY, 2005), desencadeiam uma cascata de danos, que podem causar estresse oxidativo e, por fim, afetam o desenvolvimento da planta (HOSSAIN et al., 2011).

O teste de crescimento radicular consiste em expor sementes de um

determinado modelo vegetal a um agente ou amostra ambiental a ser testada e avaliar os efeitos desse agente sobre o desenvolvimento e elongação radicular. Esse teste toxicológico é considerado o mais simples entre os testes de biomonitoramento ambiental, que possibilitam a avaliação do efeito de amostras líquidas (ARAÚJO et al., 2001) e de toxicidade de resíduos orgânicos (YOUNG et al., 2012) e inorgânicos (ANDRADE et al., 2010).

A aplicação de teste de crescimento radicular em *L. sativa*, associada a alta sensibilidade e a facilidade do desenvolvimento de testes de citogenotoxicidade com essa planta, vem destacando esse bioindicador em estudos de toxicidade de metais (PEREIRA et al., 2013; MORAES et al., 2015; MARTÍN et al., 2020), de nanopartículas de prata (PAIVA et al., 2020); de resíduos industriais (PALMIERI et al., 2016), de agroquímicos (BERNARDES et al., 2015) e até de metabolismo secundário de plantas (ARAGÃO et al., 2015). Como pontuado por Andrade et al. (2010), o uso do bioindicador *L. sativa* vai muito além de análises macroscópicas que avaliam o crescimento radicular, pois esse mesmo bioindicador pode ser usado em ensaios microscópicos, como os de alterações no ciclo celular, no cromossomos e no núcleo celular, que são eventos estreitamente interligados, uma vez que o desenvolvimento da planta está altamente relacionado à divisão e ao crescimento celular (HARASHIMA & SCHNITTGER, 2010).

A avaliação do ciclo celular permite estimar a toxicidade, por meio da detecção de anormalidades induzidas no índice mitótico e pela presença de alterações cromossômicas e nucleares. Os dados dessas análises possibilitam evidenciar os potenciais mutagênicos, genotóxicos e carcinogênicos de agentes químicos e ou de amostras ambientais (ANDRADE et al., 2008; 2010; LEME & MARIN-MORALES, 2009; KUMARI et al., 2011; BONCIU et al., 2018). O índice mitótico (IM) é avaliado pelo número de células em divisão, em comparação com o número total de células meristemáticas contadas na análise, conforme a fórmula: $IM = (\text{Número de células em divisão} / \text{Número de células observadas}) \times 100$. A frequência desse índice é expresso em porcentagem (FERNANDES et al., 2007).

A redução desse índice pode indicar que o agente estudado tem potencial de interferir no crescimento e desenvolvimento do organismo. Já o seu acréscimo, que é dado pelo aumento da divisão celular, pode, entre as possíveis consequências da proliferação, induzir a formação de tumores (HOSHINA & MARIN-MORALES,

2009; MACHADO, 2013). Muitas vezes, o aumento de divisão celular pode também levar a um aumento de alterações cromossômicas, como é evidenciado em processos de tumorização (ARAGÃO et al., 2015).

A análise de alterações cromossômicas (AC) permite avaliar se um agente, ou um poluente, apresenta efeito deletério sobre o material genético e ainda quais os mecanismos de ação desses agentes (NATARAJAN, 2002; MACEDO et al., 2014). Os tipos de alterações observadas podem informar se o poluente apresenta efeito clastogênico ou efeito aneugênico. Quando o agente promove quebras dos cromossomos, que vão resultar em alterações como pontes e fragmentos cromossômicos, eles são consideradas de efeito clastogênico, enquanto que os de efeito aneugênico são caracterizados pela indução de segregação anormal dos cromossomos, que resulta em danos como perda cromossômicas, cromossomos aderentes, c-metáfases, multipolaridade e atraso na segregação (LEME & MARIN-MORALES, 2009; COSTA et al., 2015; SILVA et al., 2015). O índice de Aberrações Cromossômicas (IAC) é dado pela fórmula:

$$IAC = (\text{Número de células com cromossomos alterados} / \text{Número de células observadas}) \times 100$$

Quanto a danos citogenotóxicos, Fernandes et al. (2007) citam que descontrolo na divisão celular pode ocasionar alterações nucleares e, conseqüentemente, a formação de células poliplóides. De acordo com esses autores, quando o material genético é amplificado, parte desse material amplificado pode ser eliminado, derivando anomalias nucleares. As alterações nucleares (AN) são caracterizadas por diferenças morfológicas presentes no núcleo interfásico, que podem ser resultantes da ação tóxica de compostos químicos. O índice de AN (IAN) é obtido pela expressão:

$$AN = (\text{Número de células com alterações nucleares} / \text{Número de células observadas}) \times 100$$

A associação de ensaios de toxicidade (germinação e desenvolvimento radicular) com ensaios de citogenotoxicidade (IM, AC e AN) aumentam a precisão na detecção de dados causados no DNA de organismos testes (LEME & MARIN-MORALES, 2009). Estudo realizado por Santos et al. (2019) avaliou o efeito alelopático de extratos hidroalcoólicos de duas espécies de Solanaceae (*S. muricatum* Ait. e *S. betaceum* Cav). Neste estudo, os autores observaram uma redução no crescimento radicular e no IM, além de alterações nucleares significativas nas células meristemáticas de *L. sativa*. Esse estudo ainda

avaliou morte celular e genotoxicidade, pelo teste de Tunel e ensaio do cometa, respectivamente, que mostraram um efeito sinérgico dos compostos do extratos, com atividade alelopática de fitotoxicidade expressiva, que induziram danos celulares e ao DNA, que levaram as células à morte.

Andrade-Vieira et al., (2019) avaliaram o mecanismo de ação do óleo de *Jatropha curcas* por meio da análise do ciclo celular de *Lactuca sativa*. O estudo observou a diminuição no crescimento da raiz, intimamente relacionada à redução no índice mitótico, juntamente com um aumento do número de núcleos condensados. Os autores ainda observaram aberrações cromossômicas como cromossomos aderente, atraso cromossômicos, c-metáfases, pontes e fragmentos cromossômicos, que evidenciaram atividade aneugênica e clastogênica, para o óleo avaliado.

3.2. Ensaio do Cometa

O ensaio cometa é um bioensaios que possibilita a detecção de danos diretos ao DNA de células individuais (OSTLING & JOHANSON, 1984). A técnica consiste em isolar o nucleóide do modelo de estudo exposto a um agente tóxico, colocá-los sobre lâmina previamente revestidas por gel de agarose e submetê-las à eletroforese, para que os fragmentos de DNA, quando presentes, percorrem a lâmina, formando figuras semelhantes a cometas (RITTER & KNEBEL, 2009). A avaliação ocorre por meio da análise da distância da migração do DNA, pelo comprimento da cauda do cometa e também pela intensidade da fluorescência da cauda, parâmetros esses que permitem quantificar o grau de danos ao DNA (SIGHN, 2000; YILDIZ, 2009).

O ensaio cometa é comumente utilizado na avaliação de danos e de reparos de DNA em células individuais, sendo amplamente utilizado para testar agentes genotóxicos de resíduos industriais, agrícolas e domésticos, bem como em biomonitoramento, aplicações clínicas, avaliação do potencial alelopático de substâncias, de fenóis naturais, dentre outros (WHITE & RASMUSSEN, 1998; HARTMANN et al., 2003; BRIANEZI, 2009; CAPRIGLIONE et al., 2011; PEREIRA et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2018; ALVES ET AL., 2018). A técnica possui alta especificidade, rápido desempenho e alta sensibilidade para

vários tipos de danos no DNA (GONÇALVES et al., 2003; YILDIZ et al., 2009; AZQUETA et al. 2011).

O ensaio do cometa, que vem sendo utilizado, principalmente, em modelos animais como linfócitos (MARCUSI et al., 2011), células epiteliais (CARBAJAL-LÓPEZ et al., 2016) e hepatócitos (PERERA et al., 2016), também apresenta a possibilidade de ser aplicado em modelos vegetais (YILDIZ et al., 2009; REGO et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2018; ALVES ET AL., 2018).

Reis et al., (2017) compararam resultados do ensaios do cometa realizados com pontas de raízes de *L. sativa* e com sangue humano. Os resultados mostraram respostas semelhantes para os dois modelos testados, o que comprovou que *L. sativa* é também um modelo confiável para detectar danos ao DNA induzidos por poluentes genotóxicos.

Dos Santos et al. (2019), avaliaram efeitos alelopáticos de extratos alcoólicos de *Solanum muricatum* Ait. e *S. betaceum* Cav. pelos ensaios de germinação, desenvolvimento inicial, ciclo celular e fragmentação celular e ensaios do cometa, em raízes de *L. sativa*. Neste estudo, os autores observaram uma correlação diretamente proporcional entre o aumento da concentração dos extratos e os aumentos de fragmentação dos nucleóides e presença de núcleos condensados. Estudos realizados por Aragão et al. (2017), sobre os efeitos do fungicida tebuconazol (TBZ), um químico do grupo químico triazol, mostraram que o ensaio do cometa foi eficiente para detectar o potencial genotóxico do fungicida, tendo em vista o aumento dos danos encontrados nos nucleóides das células expostas, em todas as concentrações avaliadas.

3.3. Teste de TUNEL

O teste de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labeling assay) é utilizado para a detecção de fragmentação de DNA e demais mecanismos relacionados ao processo de morte celular (GAVRIELI et al., 1992; MAJTNEROVÁ & ROUSAR, 2018). A técnica consiste na detecção das extremidades de fragmentos de DNA que apresentam incorporação de nucleotídeos modificados pela enzima Transferase terminal de desoxinucleotídeos (TdT). Os Tdts são marcados com corante fluorescente e detectados pela emissão da luz de

fluorescência ao se ligarem a extremidade 3'-OH livre, onde ocorreu a quebra do DNA, devido a exposição a algum agente quelante. A análise ocorre por meio de microscopia de fluorescência ou pelo laser de citômetro (VERMES et al., 2000; IKEGAMI et al., 2003).

Esse teste é comumente utilizado em análises de agentes genotóxicos, podendo ser útil para as mais diversas funcionalidades, como monitoramento de resíduos industriais e agrícolas até aplicações clínicas e teste de fármacos (GAVRIELI et al., 1992; IKEGAMI et al., 2003; FIGUEROA, 2012; BELENKI et al., 2013; HEIN et al., 2015; SHARMA et al., 2020). Santiago et al. (2017) avaliaram os efeitos citogenotóxicos do óleo essencial (OE) extraído de *Backhousia citriodora* L. (Myrtaceae) em ensaios com *L. sativa*. Pelo teste de Tunel, os autores observaram a ocorrência de fragmentação de DNA, que é um indicativo de morte celular.

O Teste de Tunel foi utilizado por Palmieri et al. (2019), para avaliar a ação de venenos de vespas, *Polybia occidentalis* e *P. fastidiosa*, sobre o DNA de *L. sativa*. Os resultados demonstraram que ambos os venenos induziram morte celular, evidenciados pela fragmentação do DNA em eletroforese em gel de agarose.

3.4. Estresse Oxidativo

O oxigênio possibilita a eficiente produção energética por combustão enzimática de compostos orgânicos. Por outro lado, pode provocar diversos danos às células, devido à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécie reativas de nitrogênio (ERNs), que possuem alta reatividade com outras classes de biomoléculas (BARTOSZ, 1997). Em organismos fotossintéticos, a produção de EROs ocorre em reações que ocorrem nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (FOYER & NOCTOR, 2000). Outras fontes produtoras de EROs menos citadas, mas igualmente encontradas em plantas, são as reações de desintoxicação catalisadas pelo citocromo P450, que ocorre no citoplasma e o no retículo endoplasmático (GILL & TUTEJA, 2010). As células em estado normal produzem EROs e ERNs, como o superóxido, hidroxil, peróxil, hidroperóxil, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, peroxinitrito e o óxido nitroso (HUANG et al., 2000).

Como forma de manter o controle na produção de EROs, são produzidos compostos antioxidantes que possuem a capacidade de neutralizar o efeito negativo desses radicais sobre o metabolismo do organismo. Essas defesas podem ser de caráter enzimático: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Peróxido dismutase (POD) e Ascorbato peroxidase (APX), ou não enzimático: glutationa (GSH) e vitaminas A, C e E (JOHANSEN et al., 2005). Entre os antioxidantes produzidos pela planta, a SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs que, em conjunto com a POD, catalisa a transformação do superóxido em peróxido de hidrogênio, protegendo as células dos efeitos tóxicos dos radicais, evitando a formação do radical hidroxil (OH) (ALSCHER et al., 2002; DEL RIO et al., 2002).

A CAT é responsável pela inativação do peróxido de hidrogênio formado na conversão do glicolato a glioxalato durante a fotorrespiração, e pela decomposição do peróxido formado na reação de oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos (HOLTMAN et al., 1994; IGAMBERDIEV & LEA, 2002). A APX, que atua degradando o peróxido de hidrogênio, utilizando o ascorbato como substrato, é de grande importância na defesa de tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação (ASADA, 1992).

Apesar da eficiência dos mecanismos de defesa da planta, ainda é possível ocorrer desequilíbrios entre a produção e eliminação de EROs, o que acaba desencadeando eventos de estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode provocar danos em macromoléculas, como DNA, RNA, lipídios e proteínas (HALLIWELL, 2009) e, conseqüentemente, causar falhas no sistema de reparo do DNA, causando diversos problemas às células, como divisão descontrolada e morte celular (SOSA et al., 2013).

Paula et al. (2015) avaliaram, em plântulas de alface, a atividade das enzimas antioxidante presentes em extrato de folhas de *Bauhinia unguolata*. Pelos resultados de produção das enzimas α -amilase, POD, CAT e polifenol oxidase, observados no bioindicador utilizado, os autores comprovaram que o extrato de *Bauhinia* alterou o sistema de defesa antioxidante de *L. sativa*. Já Asrorov et al. (2016) avaliaram a ação das enzimas POD e Polifenoloxidase (PPO), bem como as concentrações de prolina, metionina e cisteína, de três agroquímicos (Carbophos, Lannate e Sumi-alfa) em espécimes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Os resultados mostraram

que os inseticidas estudados, especialmente o Sumi-alfa, interromperam o balanço oxidativo das plantas tratadas, conferindo um potencial impacto na vulnerabilidade a estresses secundários.

Grecco (2020) avaliou os efeitos fitotóxicos, citogenotóxicos e bioquímicos dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim sobre o organismo teste *L. sativa* L. O autor constatou que esses agrotóxicos aumentaram as atividades das enzimas CAT, SOD, APX e Glutathiona peroxidase, induzindo estresse oxidativo na planta.

4. ESTUDO DE CASO: EFEITOS DO FUNGICIDA DIFENOCONAZOL SOBRE O ORGANISMO TESTE *Lactuca sativa*

Os fungicidas são compostos tóxicos amplamente utilizados no controle de fungos fitopatogênicos, devido ao seu grande potencial de extermínio e abrangência de ação em diversos organismos-alvo, bem como pela ampla diversidade de compostos químicos disponíveis para esse fim.

Os fungicidas podem ser classificados de acordo com a sua classe química e seu mecanismo de ação sobre os organismos (ZAMBOLIM et al., 2008). A classe química dos triazóis remete-se aos fungicidas sintéticos de ação sistêmica, que tem como um de seus representantes o Difenconazol, conhecido por controlar o crescimento de diversos fungos por meio do rompimento de sua parede celular (SYNGENTA, 2016).

No presente estudo, o efeito tóxico e os mecanismos de ação de diferentes concentrações do fungicida Difenconazol foram avaliados por diferentes bioensaios realizados com o modelo vegetal *Lactuca sativa* L. Para a avaliação da ação desse fungicida foram preparadas soluções aquosas nas concentrações de 0,016 (C1); 0,031 (C2); 0,062 (C3); 0,125 (C4) e 0,250 (C5) g/L, estabelecidas e derivadas da recomendação do fabricante para o cultivo de tomate, onde C3 é a solução de uso, indicada pelo fabricante. Como controles positivos, foram utilizadas soluções de trifluralina (0,84 g/L), para a análise de crescimento radicular e ciclo celular (FERNANDES et al., 2007, 2009), e de Metil Metano Sulfonato - MMS (4×10^{-4} mol/L), para os testes de quebra e fragmentação do DNA. Para o controle negativo, foi utilizado água destilada.

As ferramentas de análises (*end points*) utilizados foram crescimento radicular, ciclo celular, teste do tunel, ensaio do cometa e atividade enzimática.

Em todos os testes realizados, as sementes foram germinadas em placas Petri com papel filtro umedecido com água, de forma descontínua, onde as raízes, após alcançarem protrusão de 1-2 mm, foram colocadas no tratamento com as soluções dos fungicidas e controles. Foram utilizadas 30 sementes por placa de Petri, sendo 5 placas por tratamento realizado.

Os dados avaliados em *L. sativa* foram analisados estatisticamente pelo teste de Shapiro-Wilks, para checar a distribuição normal das médias. Para os dados que não seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis ($P < 0,05$). Já para os dados que seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Tukey ($P < 0,05$) e Duncan ($P < 0,05$).

As análises do crescimento radicular (CR) mostraram que o fungicida provocou ação fitotóxica, pois induziu redução significativa do tamanho das raízes, nas concentrações C3, C4 e C5, quando comparadas com o controle negativo (Figura 1). A diminuição do crescimento radicular foi inversamente proporcional à concentração testada do fungicida [menor crescimento (média de 1,55 mm), para a maior concentração testada (C5)], em relação à média (9,13 mm) do controle negativo.

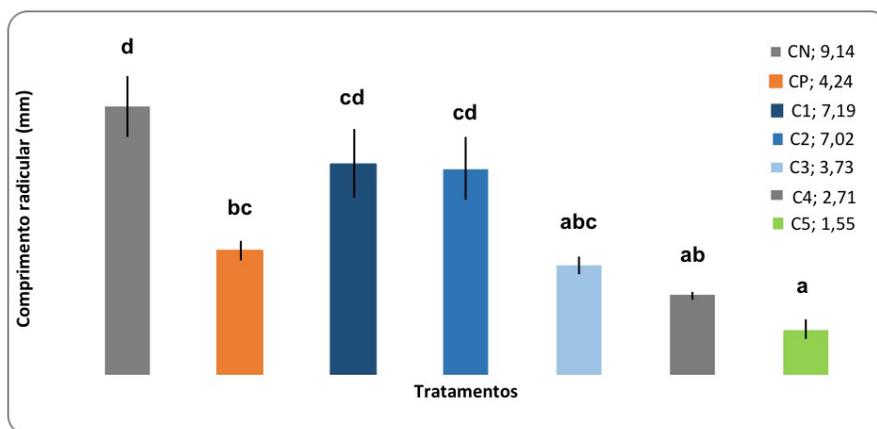


Figura 1 - Crescimento radicular (mm) de raízes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol. As médias seguidas com a mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de de Kruskal Wallis. CN: água destilada; CP - trifluralina (0,84 g/L); C1 - 0,016; C2 - 0,031; C3 - 0,062; C4 - 0,125 e C5 - 0,250 g/L.

A fase inicial do crescimento das raízes é muito sensível à ação de substâncias não envolvidas com o metabolismo da planta, podendo ocasionar anormalidades às plântulas, alterações no crescimento e até mesmo necroses radiculares (FERREIRA & BORGHETTI, 2004). As causas da redução do crescimento radicular podem ocorrer pela inibição de processos como: divisão celular, alongamento das células e absorção de nutriente, e até mesmo devido à morte celular (KOCHIAN, 1995; RENGEL et al., 1996; IKEGAWA et al., 1998; HARASHIMA & SCHNITTGER, 2010).

Pela análise do ciclo celular de células meristemáticas de *L. sativa*, expostas às diferentes concentrações do fungicida Difenconazol, foi possível observar que a concentração C4 foi a única que apresentou índice mitótico estatisticamente diferente do CN, o que permite inferir que nesta concentração o fungicida teve ação citotóxica para o bioindicador utilizado (Tabela 1). Esses resultados podem explicar as causas da diminuição do CR para a C4. O IM é uma variável confiável para se definir a presença de substâncias citotóxicas. A redução desse índice pode indicar uma interação entre o DNA com as substâncias citotóxicas, que provoca tanto distúrbios celulares como disfunção da cromatina (GLINSKÁ et al., 2007). Já o aumento do IM, pode acarretar em uma proliferação celular desordenada e, eventualmente, na formação de anormalidades no indivíduo (LEME & MARIN-MORALES, 2009).

O estudo ainda demonstrou um aumento significativo de alterações cromossômicas em todas as concentrações testadas, quando comparadas com os resultados do CN. O aumento do número de células aberrantes foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações do fungicida (Tabela 1). Durante a avaliação das alterações cromossômicas, foi possível ainda observar uma tendência para a ação aneugênica do difenoconazol, devido ao alto índice de alterações do tipo cromossomo aderentes e c-metáfase registrados (Figura 2), seguido de uma ação clastogênica mais discreta, representada pela presença de pontes cromossômicas (Figura 2).

Tabela 1 - Alterações no ciclo celular e frequência das alterações cromossômicas e nucleares observadas em células de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol. CN: água destilada; CP - trifluralina (0,84 g/L); C1 - 0,016; C2 - 0,031; C3 - 0,062; C4 - 0,125 e C5 - 0,250 g/L.

Tratamento/ Concentrações	Índice mitótico (IM %)	Alterações Cromossômicas (AC%)	Alterações Nucleares (AN%)
Controle negativo	11,55 ± 0,63 ^{bc}	0,87 ± 2,0 a	0 ± 0,12 a
Controle positivo	19,92 ± 0,63 d	70,11 ± 2,0 d	0,08 ± 0,12 a
C1	12,64 ± 0,63 bc	7,44 ± 2,0 b	0,22 ± 0,12 ab
C2	13,02 ± 0,63 c	8,02 ± 2,0 b	0,46 ± 0,12 bc
C3	11,66 ± 0,63 bc	8,42 ± 2,0 b	0,26 ± 0,12ab
C4	9,20 ± 0,63 a	14,57 ± 2,0 c	0,76 ± 0,12 c
C5	10,76 ± 0,63 ab	16,48 ± 2,0 c	0,68 ± 0,12 c

As médias ± erro padrão seguidas com a mesma letra nas colunas não diferiram estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de Duncan.

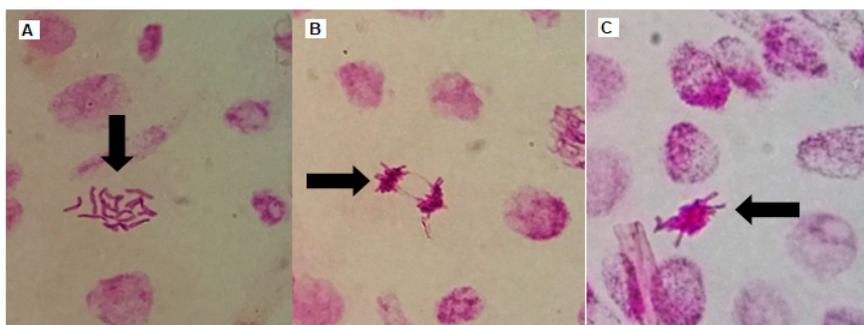


Figura 2 - Principais alterações cromossômicas (seta) encontradas em células meristemáticas de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol. A: C-metáfase, B: ponte cromossômica, C: aderência cromossômica.

A organização estrutural do núcleo e suas propriedades mecânicas são críticas para uma variedade de funções e processos celulares (ZWERGER et al, 2011). De acordo com De May et al. (1996), aberrações na estrutura e morfologia nuclear podem se apresentar de várias formas (morfologia irregular, alterações nucleolares, perda de domínios nucleares mudanças na organização da cromatina). Em decorrências dessas alterações morfológicas, podem ser desencadeadas outras alterações nos núcleos, como mudanças na estrutura da cromatina (ZINK et al. 2004). A heterocromatinização do material genético celular é um tipo de alteração que promove a condensação nuclear (presença de núcleos picnóticos ou heterocromatinizados), por mudança na conformação da cromatina. A condensação nuclear pode ser um indicativo de ação genotóxica de um determinado agente ao qual o organismo foi exposto que, por sua vez, pode desencadear morte celular, via mecanismo de apoptose (ZHANG & SUNA, 2018), confirmando a citação de PALMIERI et al. (2014), de que muitas alterações cromossômicas e nucleares são prejudiciais à célula e estão envolvidas em processo de morte da célula. No presente estudo, foi observado que as concentrações C2, C4 e C5 do fungicida difenoconazol induziram condensação nuclear, com maior destaque para a C4, confirmando a ação tóxica do fungicida para essas concentrações (Tabela 1). Essas alterações nucleares, quando analisadas em conjunto com as alterações cromossômicas, tornam os dados mais precisos, em relação aos danos causados no DNA (LEME & MARIN-MORALES, 2009).

Os resultados do ensaio do cometa indicaram que o fungicida difenoconazol apresentou potencial genotóxico na concentração C3, sendo que a maior frequência de danos ocorreu nesta concentração (Tabela 2). Esses dados corroboram com os resultados encontrados nas análises de alterações cromossômicas e teste de TUNEL.

Neste estudo, a análise de morte celular, realizada pelo teste de TUNEL em células meristemáticas de *L. sativa*, evidenciou o aumento na fragmentação de DNA pelo tratamento com o fungicida (Figura 3). Esses dados corroboram os resultados encontrados para a análise de crescimento radicular e pela presença observada de núcleos condensados para alguns dos tratamentos realizados, uma vez que a redução do crescimento radicular pode estar relacionada a indução de morte celular pelo fungicida (KARIYA et al., 2017).

Tabela 2 – Avaliação, pelo ensaio do cometa, de danos no DNA de células de raízes de *L. sativa* expostas ao princípio ativo Difenconazol. CN: água destilada; CP - MMS 4×10^{-4} mol/L; C1 - 0,016; C2 - 0,031; C3 - 0,062; C4 - 0,125 e C5 - 0,250 g/L.

Tratamento/ concentrações	Classificação tipo de Dano					ID
	0	1	2	3	4	
Controle negativo	95,33	4,66	0	0	0	4,67±30,39 a
Controle positivo	33,67	40	20,67	5,67	0	98,33±30,39 ab
C1	45,33	51,67	3	0	0	57,67±30,39 ab
C2	46,00	47	6,67	0	0	60,67±30,39 ab
C3	32,33	42	14,33	8	3,33	128,00±30,39 b
C4	43	41	14	1,33	0	73,00±30,39 ab

ID: Médias ± EP seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o Teste de Ducan ($p < 0.05$). Nota: I.D = índice de danos; EP: Erro padrão da média.

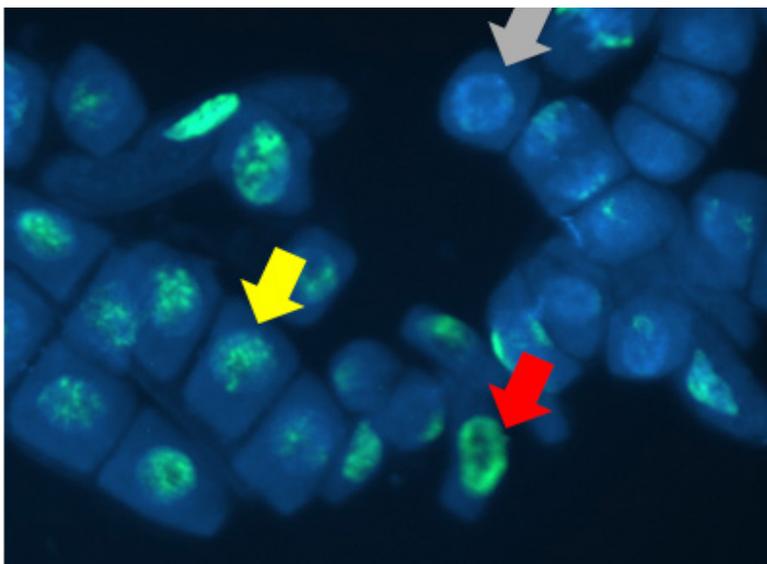


Figura 3 – Análise de células de meristemas radiculares de *L. sativa* tratadas com o princípio ativo difenoconazol no teste de TUNEL. As setas coloridas representam os tipos de danos encontrados (cinza: sem danos, amarela: danos leves e vermelha: danos graves).

As atividades de enzimas antioxidantes desencadeiam uma cascata de reações que protegem as células do estresse abiótico (CAREGNATO, 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ESPOSITO, 2012). Os dados obtidos em ensaios estresse oxidativo podem ser usados para complementar os dados das análises mutagênicas, pois respostas deste teste podem indicar as consequências da exposição dos organismos/células a poluentes ambientais. Pelo ensaio de estresse oxidativo realizado com *L. sativa* exposta ao fungicida *difenoconazol*, foi observado que a concentração C4 induziu um aumento da atividade da SOD, confirmando a toxicidade do fungicida estudado (Figura 4 B).

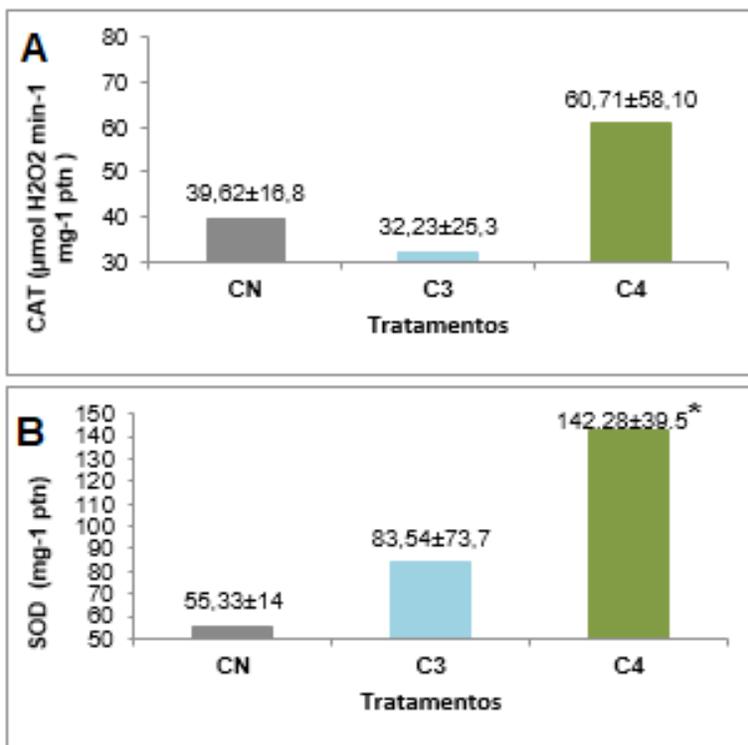


Figura 4 - Atividade enzimática de plântulas de alface submetidas a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol. As médias seguidas por (*) diferem estatisticamente das médias respectivas de cada tipo de dano, em relação ao controle negativo, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância. CN: água destilada; C3 - 0,062 e C4 - 0,125 g/L.

O aumento de danos observados pelo teste TUNEL, provavelmente seja decorrente da produção de EROs, causada pelo estresse promovido pelo difenoconazol nas plântulas de alface. As EROS são produzidas pelo metabolismo celular, principalmente nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (BHATTACHARJEE, 2010; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). Sua baixa produção ativa canais de defesa da planta, para tolerar as pressões impostas pelo ambiente mas, em casos de desequilíbrio, o aumento na concentração de EROs pode ser tóxico para o organismo, ocasionando, dependendo do tipo de EROs, a morte celular (KOHANSKI et al., 2010; BELENKY & COLLINS, 2011; BELENKY et al., 2013). Quando uma planta entra em estresse, pode haver uma produção desequilibrada de espécies reativas de oxigênio (EROs), cuja principal consequência é a fragmentação do DNA/ morte da célula.

Pelos resultados gerais das avaliações de toxicidade do fungicida difenoconazol, é possível inferir que este fungicida é citotóxico, genotóxico e mutagênico para *L. sativa*, pois promoveu uma redução no crescimento radicular; um aumento na frequência de alterações cromossômicas e nucleares; aumento na fragmentação do DNA, pelo teste de TUNEL; e aumento da atividade da enzima SOD, que é considerado um mecanismo de defesa da planta contra ação de xenobiontes, mesmo para concentração indicada pelo fabricante, para uso em cultura de tomate.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo vegetal *L. sativa* se mostrou muito sensível para estudos de mutagenicidade com agroquímicos. Evidenciando que o seu uso deve ser feito de maneira controlada, como forma de evitar danos a organismos não-alvo e consequentemente ao ecossistema, próximo a locais de uso do fungicida.

Além disso, os resultados obtidos no estudo de caso demonstraram a importância da integração dos testes realizados com o bioindicador *L. sativa*, para melhor compreender o efeito e a ação do composto estudado (Figura 5).

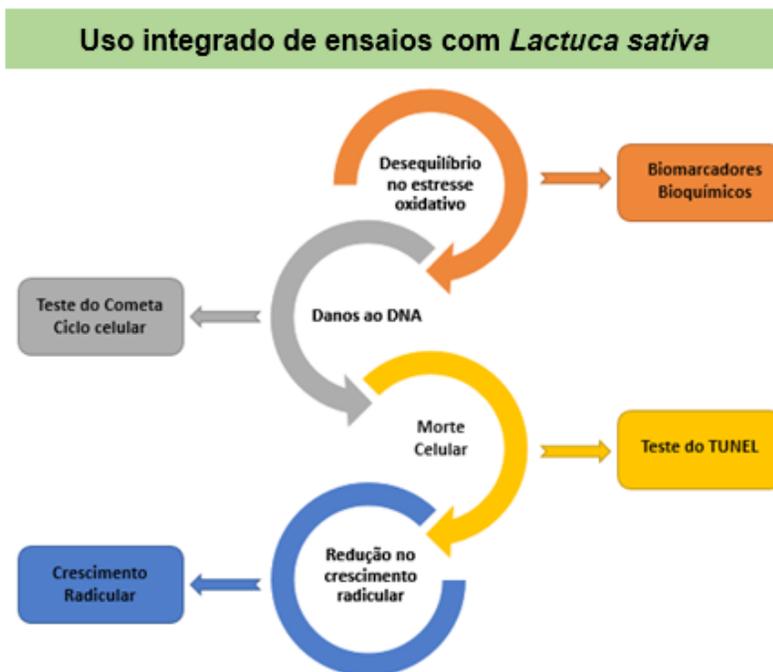


Figura 5 - Esquema integração dos testes estudados.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J.; DAVIDE, L. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, p. 706-710, 2008.

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 626-631, 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; BOTELHO, C. M.; LAVIOLA, B. G.; FERREIRA, A.; FONTES, M. M. P. Acute toxicity of *Jatropha curcas* oil on plant cell cycle. *Bioscience Journal*, v. 35, p. 1544-1551, 2019.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; BOTELHO, C. M.; PALMIERI, M. J.; LAVIOLA, B. G.; PRAÇA-FONTES, M. M. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa*

root tip bioassays. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso)*, v. 86, p. 373-382, 2014.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; GEDRAITE, L. S.; CAMPOS, J. M. S. ; DAVIDE, L. C. Spent Pot Liners (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 882-888, 2011.

ABAURRE, M. E. Crescimento e produção de duas cultivares da alface sob malhas termorreforestadas no cultivo de verão. Viçosa-MG, 2004. 79f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

AGHAJANYAN, E.; AVALYAN, R.; ATOYANTS, A.; KHOSROVYAN, A.; AROUTIOUNYAN, R. Assessing a Freshwater Ecosystem Using *Tradescantia* Model Test Object. *Water Air Soil Pollut* 231, 44, 2020.

AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVID, J. A. O. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 133, p. 366-372, 2016.

ALSCHER, R. G. ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1331–1341, 2002.

ARAGAO, F. B.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; QUEIROZ, V. T.; PINHEIRO, P. F. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy Journal*, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ARAGÃO, F. B.; BERNARDES, P. M.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Cyto(geno)toxicity of Commercial Fungicides Based on the Active Compounds Tebuconazole, Difenoconazole, Procymidone, and Iprodione in *Lactuca sativa* L. Meristematic Cells. *Water Air And Soil Pollution*, v. 230, p. 1-9, 2019.

ARAGAO, F. B.; QUEIROZ, V. T.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; PINHEIRO, P. F.; CARRIJO, T. T.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). *Revista de Biologia Tropical*, v. 65, p. 1-10, 2017.

ARAÚJO, A.S.F.; SAHYOUN, F. K.; MONTEIRO, R. T. R. Evaluation of toxicity of textile sludge compost on seed germination and root elongation of soybean and wheat. *Revista Ecosystema*, v.26, p.117-119, 2001.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, v. 85, p. 235-241, 1992.

ASROROV, A.; MATUSÍKOVÁ, I.; DALIMOVA, S.; GÁLOVÁ, Z.; SULTANOVA, E.; VESHKUROVA, O. SALIKHOV, S. Agrochemicals affect the antioxidative defense potential of cotton plants. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences; Nitra Vol. 5*, p. 505-508. 2016.

AZQUETA, A.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R.. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 724, n. 1, p. 41-45, 2011.

BARBOSA, S.; MORAES, R. M.; SANTOS-FILHO, P. R.; CARVALHO, M. NOGUEIRA, M. L. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 13, n. 2, 2015.

BARDENA, D.; MAGGIONI, S.; BORIANI, E.; GEMMA, S.; MOLTENI, M.; LOMBARDO, A.; COLOMBO, A.; BORDONALI, S.; ROTELLA, G.; LODI, M.; BENFENATI, E. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environmental Research*, v. 111, p. 603–613, 2011.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 19, p. 47- 64, 1997.

BELENKY, P.; COLLINS, J. J. Antioxidant strategies to tolerate antibiotics. *Science*, v. 334, p. 915–916, 2011.

BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Reports*, v. 3, p. 350–358, 2013.

BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S. Toxicity of Difenoconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 226, n. 7, p. 1-11, 2015.

BERNARDES, P.M.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; ARAGÃO, F.B. et al. Toxicological effects of commercial formulations of fungicides based on procymidone and iprodione in seedlings and root tip cells of *Allium cepa*. *Environ Sci Pollut Res* 26, 21013–21021, 2019.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*, p. 1-30, 2010.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. *Chemosphere*, v. 144, p. 475 – 483, 2016.

BRIANEZI, G. S. Desenvolvimento e Validação de Técnica Quantitativa de Análise de Imagem para Avaliação do Teste do Cometa Corado pela Prata. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 45, n. 4, 2009.

CAPRIGLIONE, T.; DE IORIO, S.; GAY, F.; CAPALDO, A.; VACCARO, M. C.; MORESCALCHI, M. A.; LAFORGIA, V. Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. *Ecotoxicology*, v. 20, p. 885, 2011.

CARBAJAL-LÓPEZ, Y.; GÓMEZ-ARROYO, S.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; CALDERÓN-SEGURA, M.E.; MARTÍNEZ-ARROYO, A. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 3, p. 2513-2520, 2016.

CARVALHO, M. S. S.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; SANTOS, F. E.; CORREA, F. F.; CARDOSO, M. G.; VILELA, L. R. Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus spp.* in the plant model *Lactuca sativa*. *Scientia Horticulturae*, v. 245, p. 90-98, 2019.

CAREGNATO, F. F. Análise dos parâmetros de estresse oxidativo em espécies vegetais expostas a poluentes ambientais. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2009.

CLEMENS, S.; PALMGREN, M. G.; KRÄMER, U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant science*, v. 7, n. 7, p. 309-315, 2002.

COSTA, A. C.; DOMINGUES, G.; DÚSMAN, E.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Citotoxicidade das águas do rio do Peixe (São Paulo-Brasil), em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. Bioscience Journal, v. 31, n. 1, p. 248-258, 2015.

CRUZ, J. M.; CORROQUÉ, N. A.; MONTAGNOLI, R. N. Comparative study of phytotoxicity and genotoxicity of soil contaminated with biodiesel, diesel fuel and petroleum. Ecotoxicology 28, 449–456, 2019.

DE ALVES, T. A.; PINHEIRO, P. F.; PRAÇA-FONTES, M. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CORRÊA, K. B.; ALVES, T. A.; CRUZ, F. A.; JÚNIOR, V. L.; FERREIRA, A.; SOARES, T. C. B. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. Industrial Crops and Products, v. 114, p. 59-67, 2018.

DEMARY, R. M. The Art and Science of Cytopathology. Chicago: Am. Soc. Clin. Pathol. Press; 1996.

DEL RIO, L. A.; CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; GÓMES, M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. Journal of Experimental Botany, v. 53, n. 372, p. 1255-1272, 2002.

DOS SANTOS, F. E.; CARVALHO, M. S.; SILVEIRA, G. L.; et al. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. Environ Sci Pollut Res 26, 27558–27568, 2019.

DUARTE, I. D. Qualidade da água da lagoa Juara (Serra/ES): avaliações físicas, químicas e respostas genéticas e fisiológicas em plantas. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2015.

BONCIU, E.; FIRBAS, P.; FONTANETTI, C. S.; WUSHENG, J.; KARAIMAILOĞLU, M. C.; LIU, D.; MENICUCCI, F.; PESNYA, D. S.; POPESCU, A.; ROMANOVSKY, A. V.; SCHIFF, S.; ŚLUSARCZYK, J.; SOUZA, C. P.; SRIVASTAVA, A.; SUTAN A.; PAPINI, A. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay, Caryologia, 71:3, 191-209, 2018.

ESPOSITO, J. B. N. Influência do MnDFB na tolerância ao estresse oxidativo em plantas de *Glycine max* expostas ao ozônio e chuva ácida. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal E Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo-SP, 2012.

EGUREFA, S. O.; ORJI, M. U.; UBA, B. O. Toxic Effect of Refinery Industrial Effluent Using Three Toxicity Bioassays. *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 6(2), 10-23, 2020.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent- Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.12, p.175-204, 2000.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 323 p, 2004.

FIGUEROA, A. R. M. Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca. Tese (Doutorado em Toxicologia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, São Paulo, p. 118, 2012.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test: an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, v. 197, n. 2, p. 243-260, Feb. 1988.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*, v. 146, p. 359-388, 2000.

FREITAS, A. S.; CUNHA, I. M. F.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TECHIO, V. H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 124, p. 426-434, 2016.

FROTA, R. G.; AMORIM, A. S.; CARNEIRO, J. K. R.; OLIVEIRA, M. A. S. Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of the infusion of *Plectranthus barbatus* – Lamiaceae (holy-mallow) evaluated by the *Allium cepa* test system. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 18, n. 1, p. 67-72, 2019.

GALTER, I. N. Avaliação da água do Rio Itapemirim/ES: aspectos abióticos e toxicogenéticos. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) –

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alegre –ES, 2016.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of cell biology*. v. 119, n. 3, p.493-501, 1992.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, p.909-930, 2010.

GLINSKÁ S.; BARTCZAK, M.; OLEKSIK, S.; WOLSKA, A.; GABARA, B.; POSMYK, M.; JANAS, K. Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa* L. roots treated with heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 68, p. 343-350, 2007.

GOMES, L. S.; SILVA, F. A. Ecotoxicity of Sludges Generated by Textile Industries: A review. *Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.7, p.89-96, 2012.

GOMES, K. M. S.; OLIVEIRA, M. V. G. A.; CARVALHO, F. R. S.; MENEZES, C. C.; PERON, A. P. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. *Food Science and Technology (Campinas)*, v. 33, n. 1, p. 218-223, 2013.

GONÇALVES, L. M.; CONCEIÇÃO, M. B.; RESGALLA-JUNIOR, C. Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão *Perna perna* através do Ensaio do Cometa. II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL, Itajaí, SC. Livro de Resumos, v. 1, p. 384, 2003.

GONÇALVES, M. M. C.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F. G.; MELO, W. J.; ARAÚJO, A. S. F.; PINHEIRO, J. B.; MARIN-MORALES, M. A. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of composted tannery sludges. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, p 34495-34502, 2020.

GRECCO, K. D. Efeitos toxicogenéticos, bioquímicos e fisiológicos dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim em bioensaios vegetais. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2020.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v. 141, p. 312-322, 2006.

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*, v.13, p.66–74, 2010.

KARIYA, K.; TSUCHIYA, Y.; SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y. Aluminium-induced cell death requires upregulation of NtVPE1 gene coding vacuolar processing enzyme in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Inorganic Biochemistry* 181: 152-161, 2017.

HARTMANN, A. AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HEIN, K. Z.; TAKAHASHI, H.; TSUMORI, T.; YASUI, Y.; NANJOH, Y.; TOGA, T.; WU, Z.; GRÖTZINGER, J.; JUNG, S.; WEHKAMP, J.; SCHROEDER, B. O.; SCHROEDER, J. M.; MORITA, E. Disulphide-reduced psoriasis is a human apoptosis-inducing broad- spectrum fungicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 42, p. 13039-13044, 2015.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plant. *Annual Review of plant physiology and plant molecular biology*, v. 46, p. 237-260, 1995.

HOLTMAN, W. L.; HEISTEK, J. C.; MATTERN, K. A.; BAKHUIZEN, R.; DOUMA, A. C. Beta-oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. *Plant Science*, v. 99, p. 43–53, 1994.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009.

HOSSAIN, M. A.; PIYATIDA, P.; SILVA, J. A. T.; FUJITA, M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, v. 2012, p. 1-37, 2012.

HUANG, T.T.; CARLSON, E.J.; GILLESPIE, A. M.; SHI, Y. EPSTEIN, C. J. Ubiquitous overexpression of Cu,Zn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *The journals of Gerontology Serie a Biological Science Medical Science*, v.55, p.B5–B9, 2000.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. *Phytochemistry*, v. 60, n. 7, p. 651-674, 2002.

IKEGAWA, H.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO H. Cell death caused by a combination of aluminum and iron in cultured tobacco cell. *Physiologia Plantarum*, v. 104, n. 3, p. 474-478, 1998.

IKEGAMI, Y.; GOODENOUGH, S.; INOUE, Y.; DODD, P. R.; WILCE, P. A.; MATSUMOTO, I. Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. *Neuroscience Letters*, v. 341, p. 201-205, 2003.

IQBAL, M.; ABBAS, M.; NISAR, J.; NAZIR, A.; QAMAR, A. Z. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. *Chemistry International*, v. 5, p. 1-80, 2019.

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, v.4, p.5, 2005.

KARUPPANAPANDIAN, T.; JUN-CHEOL, L.; KIM, C. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 6, p. 423-435, 2010.

KUMARI, M.; KHAN, S. S.; PAKRASHI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 190, p. 613-621, 2011.

LAH, B.; VIDIC, T.; GLASENCNIK, E.; CEPELJNIK, T.; GORJANC, G.; MARINSEK-LOGAR, R. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 139, p. 107-118, 2008.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquatic Toxicology*, v.88, p. 214-219, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. *Mutation Research*, v.650, p. 80–86, 2008.

LUBER, J.; PALMIERI, M. J.; BOTELHO, C. M.; RINALDO, D.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Latuca sativa*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, p. 903-913, 2015.

MACHADO, A. T. avaliação do potencial mutagênico do efluente do terminal petroquímico Almirante Soares Dutra (Osório – RS – Brasil) através do sistema teste de *Allium cepa*. Monografia – Gestão Ambiental Marinha e Costeira, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

MACÍAS, F. A.; CASTELHANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep* 45, 1469–1478, 2018.

MALUSZYNSKA, J.; JUCHIMIUK, J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Plant Genotoxicity*, v. 56, n. 2, p. 177-184, 2005.

GHOSH, M.; GHOSH, I.; GODDERIS, L.; HOET, P.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants. *Mutation Research*, v. 842, p. 132-145, 2019.

MARCUSSI, S.; SANTOS, P. R.; MENALDO, D. L.; SILVEIRA, L. B.; SANTOS-FILHO, N. A.; MAZZI, M. V.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; ANTUNES, L. M.; SOARES, A. M. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. *Mutation Research*, v. 724, n. 1, p. 59-63, 2011.

MARTÍN, A.; ARIAS, J.; LÓPEZ, J.; SANTOS, L.; VENEGAS, C.; DUARTE, M.; ORTÍZ-ARDILA, A.; DE PARRA, N.; CAMPOS, C.; ZAMBRANO, C.C. Evaluation of the Effect of Gold Mining on the Water Quality in Monterrey, Bolívar (Colombia). *Water* 2020.

MATEJCZYK, M.; PŁAZA, G. A.; NAŁĘCZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; MARKOWSKA-SZCZUPAK, A. Estimation of the environmental risk posed by landfills using chemical, microbiological and ecotoxicological testing of leachates. *Chemosphere*, v. 82, p. 1017–1023, 2011.

OUBANE, M.; KHADRA, A.; EZZARIAI, A.; FELS, L. E.; KOUISNI, L.; HAFIDI, M. Micronucleus assay based on *Vicia faba* roots as a tool to assess the performances of wastewater treatment systems. *Environmental Technology & Innovation*, v. 19, 2020.

MOURA, J. F.; SILVA, M. S.; BATISTA, N. J. C.; UCHOA, V. T.; ALVES, W. S. Estudo da genotoxicidade do extrato de *Abelmoschus esculentus* (quiabo) pelo teste *Allium cepa*. *Revista Saúde em Foco*, v. 1, n. 1, p. 15-28, 2014.

MOT, A.; MADJAR, R.; BĂDULESCU, L.; MIHALACHE, M. The effects of heavy metals on seed germination and seedling growth of *Lactuca sativa* L. and *Spinacia oleracea* L. *Research Journal of Agricultural Science*, v. 51, 2019.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 504, n. 1, p. 3-16, 2002.

NAWALAGE, S. K.; PATHIRATNE, A. Application of cytogenetic model *Allium cepa* for screening potential cytogenotoxicity of herbal-based hair dyes. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 55:11, 1366-1372, 2020.

OSTILING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical Research Communication*, v.123, p. 291-298, 1984.

PINHEIRO S. K. P.; CHAVES, M. M.; MIGUEL, T. B. A. R.; BARROS, F. C. F.; FARIAS C. P.; FERREIRA O. P.; EMILIO, E. C. Toxic effects of silver nanoparticles on the germination and root development of lettuce (*Lactuca sativa*). *Australian Journal of Botany* 68, 127-136, 2020.

PALMIERI, M. J.; LUBER, J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVIDE, L. C. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. *Mutation Research*, v. 763, p. 30-35, 2014.

PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M.; DOS SANTOS GEDRAITE, L.; DAVIDE, L. C. Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium*

cepa root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 133, p. 442-447, 2016.

PALMIERI, M. J.; BARROSO, A. R.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; MONTEIRO, M. C.; SOARES, A. M.; CESAR, P. H. S.; BRAGA, M. A.; TRENTO, M. V. C.; MARCUSSI, S.; DAVIDE, L. C. *Polybia occidentalis* and *Polybia fastidiosa* venom: a cytogenotoxic approach of effects on human and vegetal cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 2019.

PANDARD, P.; DEVILLERS, J.; CHARISSOU, A. M.; POULSEN, V.; JOURDAIN, M. J.; FÉRARD, J. F.; GRAND, C.; BISPO, A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of the total environment*, v. 363, n. 1, p. 114-125, 2006.

PAULA, C. V. et al. Estudos do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguolata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v. 17, n. 4, p. 577-584, 2015.

PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F.; RODRIGUES, L.; BARBOSA, S.; CASTRO, E. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. *Revista Agroambiente*, v.7, n. 1, p. 36-43, 2013.

PEREIRA, B. K.; PEREIRA, A. B.; FERRAZ, A. C.; SCHRODER, N. T.; SILVA, J. Avaliação do efeito fotoprotetivo de *Polytrichum juniperinum* Hedw, *Colobanthus quitensis* (Kunth.) Bartl. e *Deschampsia antarctica* Desv. através de ensaio cometa em *Helix aspersa* (Müller, 1774). *Revista de Iniciação Científica da ULBRA*, n. 3, 2016.

PERERA, L. M. S.; PILOTO, J.; CANELSOTA, D.; PELZER, L.; DORVIGNY, B. M. Further Pharmacological Evidence Supporting the Development of an Antiulcerogenic Drug Based on *Rhizophora mangle* L. Aqueous Extract. HPLC Method Proposed for Determinating. *Open Access Library Journal*, v.3, p. 1625, 2016.

RAMOS, L. P. N.; LEITE, D. M.; MACEDO, W. A.; FARIAS, C. B. M.; OLIVEIRA, A. S.; DAHMER, N.; KARSBURG, I. V. Avaliação do efeito citotóxico e genotóxico de células radiculares de *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) após exposição em amostras de água de cinco lagos de Alta Floresta, Estado de Mato Grosso. *Rev. Ambient. Água*, Taubaté, v. 15, n. 1, p. 2463, 2020.

REGO, S. C.; MATA, A. M. O. F.; ROSA, M. S. P. S.; ALENCAR, M. V. O. B.; GOMES-JUNIOR, A. L.; ARARUNA-JUNIOR, A. A.; PAZ, M. F. C. J.; CAVALGANTE, A. A. C. M. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade da dipirona sódica e do paracetamol em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. Boletim Informativo Geum, v. 6, n. 4, p. 7-15, 2015.

REHMANULLAH, KHAN e MAJEED (2019) REHMANULLAH, Z. M. N. I.; KHAN, W. M.; MAJEED, A. Allelopathic potential of *Cassia fistula* against *Lactuca sativa*, *Setaria italica* and *Pennisetum americanum*. Pure and Applied Biology (PAB), v. 8, n. 1, p. 187-198, 2019.

REIS, G. B.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; MORAES, I. C.; CÉSAR, P. H. S.; MARCUSSI, S.; DAVIDE, L. C. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agentes. Ecotoxicology and Environmental Safety v. 142, p. 110–116, 2017.

RENGEL, Z. Uptake of aluminum by plant cell. New physiologist, v. 134, n. 3, p. 389- 406, 1996.

RIBEIRO, L. O.; BARBOSA, S.; BALIEIRO, F. P.; BEIJO, L. A.; SANTOS, B. R.; GOUVEA, C. M. C. P.; PAIVA, L. V. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. Revista Brasileira de Biociências, v.10, p.220-225, 2012.

RITTER, D.; KNEBEL, J. Genotoxicity testing in vitro—development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. Toxicology in Vitro, v. 23, n. 8, p. 1570-1575, 2009.

SANTIAGO, J. A.; CARDOSO, M. G.; CRUZ, F. A.; PALMIERI, M. J.; SOUZA, R. V.; SOARES, L. I.; CAMPOS, J. M. S.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Cytogenotoxic effect of essential oil from *Backhousia citriodora* L. (Myrtaceae) on meristematic cells of *Lactuca sativa* L. South African Journal of Botany, v. 112, p. 515-520, 2017.

SANTOS, N. B.; MOURA, C.; ROCHA-LIMA, A. B. C.; LOBO, D. A.; SALDIVA, P. H. N.; BIZETO, L. Utilização de *Tradescantia pallida* purpurea como bioindicadora de agentes tóxicos na água. UNISANTA Bioscience, v. 8, p. 326-335, 2019.

SHARMA, R.; IOVINE, C.; AGARWAL, A.; HENKEL, R. TUNEL assay—Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. Andrologia. 2020.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.

SILVA, A. E. P.; MOURA, J. W. M.; LÚCIO-NETO, M. P. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica da *turnera ulmifolia* L. (Chanana) em células eucarióticas. *Revista Saúde em foco*, v. 2, n. 1, art. 3, p. 25-48, 2015.

SILVA, E. R.; SIMÕES, I. M.; BAPTISTA, J. O.; BIGHI, K. N.; FONTES, M. M. P.; SCHMILDT, E. R.; LOPES, J. C.; CALDEIRA, M. V. W.; ALEXANDRE, R. S. In vitro germination of *Melanoxylon brauna* schott. and evaluation of the toxicity of disinfecting agents in the *Lactuca sativa* L. model plant. *Cerne*, v. 25, p. 375-385, 2020.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADEVIERIA, L. F. Toxic effect so fenvironmental pollutants: comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. *Chemosphere*. v. 178, p. 359–367, 2017.

SINGH, N. P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 455, n. 1, p. 111-127, 2000.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

SOUZA-FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – Revisão Crítica. *Planta Daninha*, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. *Caryologia*, v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009.

SYNGENTA. 2016. Score 250 EC. Disponível em:<<http://www.syngenta.pt/product/crop-protection/fungicida/score-250-ec>>. Acesso em: 10 de set de 2020.

VENTURA-CAMARGO, B.C.; MALTEMPI, P. P. P.; MARIN-MORALES, M. A. The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium cepa* Meristematic Cells. *J Environment Analytic Toxicol*, 2011.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, n. 2, p. 171-179, 2000.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 410, n. 3, p. 223-236, 1998.

YILDIZ, M.; CIĞERCI, I. H.; KONUK, M.; FIDAN, A. F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalto chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, v. 75, n. 7, p. 934-938, 2009.

YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P. A.; CRESPO, D. C.; RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 76, p. 182-186, 2012.

ZAMBOLIM, L.; PICANÇO, M. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A. (Ed.). *Produtos Fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas)*. Viçosa: DFP, 2008.

ZHANG, L.; SUNA, C. F. Cyclic Lipopeptides from Marine *Bacillus subtilis* Strains, Kill the Plant-Pathogenic Fungus *Magnaporthe grisea* by Inducing Reactive Oxygen Species Production and Chromatin Condensation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 84, p.1-17, 2018.

ZINK, D.; FISCHER, A. H.; NICKERSON, J. A. Nuclear structure in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer*. v.4, p. 677–687, 2004.

ZWERGER, M.; HO, C. Y.; LAMMERDING, J. Nuclear Mechanics in Disease. *Annu Rev Biomed Eng*, v. 15, p. 397–428, 2011.

Capítulo 10

NÚMERO CROMOSSÔMICO E CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DO GÊNERO *Peperomia* (PIPERACEAE): O ESTADO DA ARTE

Alda Francisca Rodrigues de Sousa Fernandes

Loren Cristina Vasconcelos

Maria Eliza Soares Queiroz

Darley Aparecido Tavares Ferreira

Milene Miranda Praça Fontes

1. O GÊNERO *Peperomia*

Peperomia Ruiz & Pávon é o segundo maior gênero da família Piperaceae, reunindo 1473 espécies e 175 variedades e formas (FRODIN, 2004; MATHIEU, 2001-2020). Considerado um dos gêneros mais ricos em diversidade, *Peperomia* aparece entre os 10 gêneros de angiospermas com mais espécies. As espécies de *Peperomia* apresentam distribuição pantropical, sendo que 90% ocorrem na flora neotropical, sendo encontradas desde o sul do Estados Unidos estendendo-se até a Argentina e Chile (MATHIEU et al., 2015). Embora a maioria das espécies do gênero seja endêmica das regiões dos Andes e da Amazônia, algumas espécies podem ser encontradas na Ásia, África, Madagascar, Austrália e Nova Zelândia (WANKE et al., 2006; FRENZKE et al., 2015; MATHIEU, 2001-2020).

O Brasil possui grande diversidade de *Peperomia* com representantes encontrados em todos os domínios fitogeográficos. Ao todo, 173 espécies e 31 variedades já foram descritas, sendo 108 endêmicas, destacando-se a espécie *Peperomia stroemfeltii* Dahlst. (Figura 1A). Sua maior distribuição está na Mata Atlântica com 130 espécies, como por exemplo *Peperomia glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst. (Figura 1B), *Peperomia alata* Ruiz & Pav. (Figura 1C), *Peperomia martiana* Miq. (Figura 1D) e *Peperomia urocarpa* Fisch. & C.A. Mey. (Figura 1E). A Amazônia ocupa a segunda posição com 57 espécies, seguido do Cerrado com 35 e Caatinga com 11 (BFG, 2018; FLORA DO BRASIL, 2020).



Figura 1: Diversidade de espécies do gênero *Peperomia* encontradas no Parque Estadual de Forno Grande, um fragmento de Mata Atlântica localizado no município de Castelo - Espírito Santo, Brasil. (A) *P. stroemfeltii*, (B) *P. glabella* var. *nigropunctata*, (C) *P. alata*, (D) *P. martiana* e (E) *P. urocarpa*. (Fotos: Jheniffer Abeldt Christ, 2017).

O uso de espécies de *Peperomia* na medicina tradicional para o tratamento de enfermidades tem sido reportado em várias localidades do mundo, como na América do Sul (GRENAND et al., 1987; DE DIAZ et al., 1988; SCHULTES & RAFFAUF, 1990; VILLEGAS et al., 2001), África (MBAH et al. 2002, 2012), Tailândia (CHEN et al., 1989; YANG et al. 2014) e China (WANG et al. 2012). Espécies como *Peperomia dindygulensis* Miq., *Peperomia duclouxii* C. DC., *Peperomia sui* T.T. Lin & S.Y. Lu, *Peperomia vulcânica* Baker & C.H.Wright, *Peperomia fernandopoioana* C.D.C., *Peperomia galioides* Kunth, *Peperomia subspathulata* Yunck, *Peperomia blanda* (Jacq.) Kunth, *Peperomia cavaleriei* C. DC., *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. e *Peperomia tetraphylla* (G.Forst.) Hook. & Arn. são utilizadas no tratamento de problemas respiratórios (NISHANTHI et al., 2012; YANG et al., 2014), problemas cardíacos, dores (DE LA TORRE, 2008), desordens gastrointestinais (DE DIAZ et al., 1988; MOLLIK et al., 2010; NISHANTHI et al., 2012), câncer (CHEN et al., 1989; WANG et al., 2012), infecções (MBAH

et al., 2002, 2012), artrite (CALIMAG, 2007), cicatrização de feridas, úlceras (VILLEGAS et al., 2001), colesterol (SANTOS et al., 2001) e diabetes (HAMZAH et al., 2012), entre outros.

Diferentes estudos sobre as propriedades químicas e farmacológicas de *Peperomia* demonstraram a presença de atividades antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária e antitumoral de diversas espécies do gênero (MAHIOU et al., 1995, 1996; ARRIGONI-BLANK et al., 2004; LANGFIELD et al., 2004; LI et al., 2007, 2012; FELIPPE et al., 2008; VELOZO et al., 2009; PINHEIRO et al., 2011; MBAH et al., 2012; YANG et al., 2014; JARDIM et al., 2015; ALVES et al., 2019). Além disso, várias espécies de *Peperomia* são cultivadas como plantas ornamentais devido ao hábito herbáceo, filotaxia e principalmente pela beleza de suas folhas com diferentes formas e cores, sendo utilizadas em vasos e canteiros, como *Peperomia caperata* Yunck, *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon e *Peperomia obtusifolia* (L.) A.Dietr. (McKENDRICK, 1992; LORENZI & SOUZA, 2008). Algumas espécies, como *Peperomia pellucida* (L.) Kunth também são usadas na culinária (LORENZI & MATOS, 2002).

Além desses aspectos, as peperômias também estão envolvidas em interações ecológicas. Estudos apontam o endofitismo entre o fungo *Phytophthora nicotianae* van Breda de Haan e *P. tetraphylla*. O excesso de água presente em *P. tetraphylla* parece estimular o crescimento fúngico (GUTIERREZ, 2009). A espécie epífita *Peperomia macrostachya* (Vahl) A.Dietr. possui uma relação mutualista bem estudada com as formigas *Camponotus femoratus* (Fabricius). Nesta relação, *P. macrostachya* fornece substrato para os ninhos em suas raízes, enquanto as formigas dispersam suas sementes e as protegem do ataque de outros herbívoros. Compostos químicos encontrados nas sementes de *P. macrostachya* foram identificados como responsáveis pela atração a *C. femoratus* (YOUNGSTEADT et al., 2009, 2010). Embora a diversidade e a distribuição de espécies do gênero *Peperomia* seja enorme, pouco se sabe sobre a biologia da polinização de suas espécies. Sendo assim, a morfologia das flores de *Peperomia* é sugestiva de polinização por vento e/ou inseto, mas a maioria das espécies são considerados autopolinizadoras (FIGUEIREDO & SAZIMA, 2007).

As espécies do gênero *Peperomia* são caracterizadas como predominantemente suculentas, epífitas, geófitas e parasitas (WANKE et al., 2007). A maioria das plantas são adaptadas às condições de seca dos trópicos. A adaptação fotossintética envolve o mecanismo CAM, conforme descrito para *Peperomia scandens* Ruiz & Pav. e *Peperomia camptotricha* Miq. (HOLTHE et al., 1987; PATEL & TING, 1987). De acordo com Yuncker (1974), as flores das peperômias são protegidas por uma bractéola (pequena bráctea, solitária ou em par, localizada no eixo lateral de qualquer inflorescência, acima da bráctea e abaixo do cálice) e apresentam um pistilo uni-estigmado junto com dois estames laterais, e seu fruto é do tipo drupa. No entanto, as características morfológicas dentro de *Peperomia* é bastante diversificada. Estudos mostraram que algumas características morfológicas de *Peperomia* evoluíram independentemente várias vezes (WANKE et al., 2006). Isso é resultado do déficit de sinapomorfias morfológicas para grupos infragenéricos com evolução paralela de caracteres facilmente observáveis e pela redução extrema das flores (SAMAIN et al., 2009). Esses fatores tornam complexa a classificação morfológica em *Peperomia*.

Miquel (1843) propôs a primeira classificação infragenérica do gênero *Peperomia* e de quatro outros gêneros relacionados, *Acrocarpidium*, *Erasmia*, *Phyllobryon* e *Verhuellia* dentro da tribo Peperomiae, dividindo o gênero em quatro subgêneros. Os gêneros *Acrocarpidium*, *Erasmia* e *Phyllobryon* atualmente se encontram incluídos dentro de *Peperomia*. Uma classificação mais completa realizada por Dahlstedt (1900) baseada na morfologia de frutos de cerca de 200 espécies adicionou mais 5 subgêneros e sete seções a *Peperomia* (WANKE et al., 2007). Algumas revisões foram publicadas posteriormente por Trelease (1930), Yuncker (1933), Stehlé (1940), Skottsberg (1947), Yuncker (1953) e Yuncker (1974). No entanto, as várias inclusões e agrupamentos de subgêneros tornaram a classificação taxonômica de *Peperomia* confusa. Por esses motivos, a classificação feita por Dahlstedt é considerada a mais fácil sendo a mais usada, embora apresente algumas incongruências sobre as relações e a circunscrição de alguns subgêneros. Estudos moleculares e morfológicos realizados por Wanke et al. (2006), Smith et al. (2008), Samain et al. (2009) e Frenzke et al. (2015) em *Peperomia* demonstraram o monofiletismo do gênero e as suas relações subgenéricas. A classificação infragenérica proposta com base em dados moleculares por Frenzke et al. (2015)

classificou 1520 spp. em 14 subgêneros monofiléticos. Um resumo das principais classificações para o gênero *Peperomia* é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo das principais classificações do gênero *Peperomia* (GE = gênero, SG = subgênero, SE = seção).

Miquel (1843)	Dahlstedt (1900)	Frenzke et al. (2015)
<i>Peperomia</i> (GE)	<i>Peperomia</i> (GE)	<i>Peperomia</i> (GE) (SG)
<i>Acrocarpidium</i> (GE)	<i>Acrocarpidium</i> (SG)	
	<i>Ogmocarpidium</i> (SG)	
<i>Erasmia</i> (GE)	<i>Erasmia</i> (SG)	<i>Erasmia</i> (SG)
	<i>Pleurocarpidium</i> (SG)	<i>Pleurocarpidium</i> (SG)
<i>Tildenia</i> (SE)	<i>Tildenia</i> (SG)	<i>Tildenia</i> (SG)
	<i>Eutildenia</i> (SE)	
	<i>Hemirhynchophorum</i> (SE)	
<i>Panicularia</i> (SE)	<i>Panicularia</i> (SG)	<i>Panicularia</i> (SG)
<i>Rhynchophorum</i> (SE)	<i>Rhynchophorum</i> (SG)	
	<i>Oxyrhynchum</i> (SE)	<i>Oxyrhynchum</i> (SG)
	<i>Malacorhynchum</i> (SE)	
	<i>Leptorhynchum</i> (SE)	<i>Leptorhynchum</i> (SG)
	<i>Sphaerocarpidium</i> (SG)	
	<i>Alternifoliae</i> (SE)	
	<i>Verticillatae</i> (SE)	
<i>Micropiper</i> (SE)	<i>Micropiper</i> (SG)	<i>Micropiper</i> (SG)
<i>Phyllobryon</i> (GE)		<i>Fenestratae</i> (SG)
<i>Verhuellia</i> (GE)		<i>Hispidulae</i> (SG)
		<i>Multipalmata</i> (SG)
		<i>Perlucida</i> (SG)
		<i>Phyllobryon</i> (SG)
		<i>Pseudocupula</i> (SG)

* Adaptado de Wanke et al. (2006) e Frenzke et al. (2015).

Além dos dados morfológicos e moleculares, as informações da citogenética clássica e o tamanho do genoma nuclear são de grande relevância para compreensão taxonômica, sistemática e evolutiva (STACE, 2000). Nesse sentido, o presente capítulo apresenta uma revisão sobre número cromossômico e conteúdo de

DNA nuclear para espécies do gênero *Peperomia*. Estas informações reunidas poderão ser base para novos estudos, contribuindo para o avanço na fronteira do conhecimento deste táxon.

2. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM *Peperomia*

O gênero *Peperomia* apresenta diferentes níveis de ploidia, com espécies diploides ($2n = 22$; $2n = 24$), alguns casos de triplóides ($2n = 33$; $2n = 36$), tetraplóides ($2n = 44$; $2n = 48$), hexaplóide ($2n = 66$), octaplóide ($2n = 88$) e dodecaplóide ($2n = 132$). Além disso, espécies com número $2n = 16, 20, 23, 26, 46, 32, 60$ e 110 cromossomos também já foram reportadas. Ao todo, o número cromossômico é conhecido para 74 espécies do gênero *Peperomia* (Tabela 2). Algumas espécies apresentam mais de um número aceito, por exemplo, *Peperomia argyreia* (Hook.) E.P. Morren com $2n = 20, 22$ e 24 cromossomos. Afroz (2016) verificou que *P. pellucida* possui $2n = 46$ cromossomos metacêntricos. Anteriormente diferentes números cromossômicos também foram relatados para essa espécie, como $2n = 20, 22$ e 44 (BROWN, 1908; SHARMA & BHATTACHARYYA, 1958; MATHEW, 1958; SMITH, 1966). Existem duas razões prováveis para o desacordo em relação ao número de cromossomos de *P. pellucida*: (I) alto grau de tendência de euploidia e aneuploidia, ou (II) existência de diferentes citótipos (AFROZ, 2016).

Jose et al. (1994) ao analisar o cariótipo de cinco espécies de *Peperomia*, observaram diferenças estruturais e numéricas. Estes autores reportaram o número cromossômico $2n = 24$ para *Peperomia sandersii* C.DC. e *Peperomia verschafteltii* Lem. e $2n = 3x = 36$ para *Peperomia bicolor* Sodiro, sugerindo o número básico $x = 12$. Em contrapartida, para as espécies *Peperomia clusiifolia* (Jacq.) Hook. e *Peperomia rotundifolia* (L.) Kunth observaram $2n = 22$ e sugeriram $x = 11$ como o número básico. A existência de diferentes números de cromossomos ancestrais em *Peperomia* já foi apontada em outros trabalhos (HAUSER, 1916; JOSÉ & SHARMA, 1985; JOSE et al., 1992; SKOTTSBERG, 1955). Isso indica que possa existir duas linhas evolutivas para o cariótipo do gênero. Para Mathew (1958) e Sharma & Bhattacharyya (1959), $x = 11$ é o número básico para *Peperomia*, já Smith (1966) sugere a presença de números básicos secundários ao longo da evolução.

3. CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE *Peperomia*

Em *Peperomia*, o conhecimento do conteúdo de DNA ainda é escasso e está disponível somente para oito espécies do gênero (SAMUEL & MORAWETZ 1992). Apesar dos poucos representantes analisados, uma grande diferença interespecífica no tamanho do genoma foi reportada. Os valores 2C variaram de 2,47 pg a 15,70 pg. Os dados reportados para cada espécie podem ser conhecidos na tabela 2. Neste trabalho, os autores também observaram variações no tamanho do genoma entre espécies com o mesmo número de cromossomos ($2n = 22$), um padrão demonstrado em vários grupos de plantas (PEGINGTON & REES, 1970; BENNETT, 1971). Além disso, os autores também descrevem que o aumento o comprimento cromossômico está diretamente correlacionado com o aumento da quantidade de DNA nas espécies hexaplóide, tetraplóide e na maioria das espécies diplóides, exceto na espécie triplóide *Peperomia metallica* Liden & Rodig. Considerando as formas de vida e estratégias de sobrevivência entre as espécies de *Peperomia*, a variação no tamanho do genoma dentro e entre os diferentes níveis de ploidia pode ter algum valor adaptativo.

Tabela 2: Número cromossômico, nível de ploidia e conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) relatado para o gênero *Peperomia*.

Espécie	Número cromossômico (2n)	Nível de Ploidia	Referências para número do cromossomo Nível de Ploidia	Valor 2C (pg)	Referências para valor 2C
<i>P. alata</i> Ruiz & Pav	22	2x	Kobayashi et al. (2019)	-	-
<i>P. argyreia</i> (Hook.) E. P. Morren	20	-	Bai & Subramanian (1985)	-	-
	22	2x	Smith (1966); Samuel & Morawetz (1989)	-	-
	24	2x	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
<i>P. baronii</i> Baker	44	4x	Smith (1966)	-	-
<i>P. berteriana</i> Miq.	44	4x?		-	-
	48	4x?		-	-
	46	-	Valdebenito et al. (1992)	-	-
<i>P. bicolor</i> Sodiro	36	3x	Jose et al. (1994)	-	-
	22	2x	Kobayashi et al. (2019)	-	-
<i>P. blanda</i> (Jacq.) Kunth	22	2x	Samuel & Morawetz (1989)	6.25	Samuel & Morawetz (1992)
<i>P. blanda</i> var. <i>floribunda</i> (Miq.) H. Hüber	66	6x	Murray & Lange (2013)	-	-
<i>P. caperata</i> Yunck	24	2x	Bai & Subramanian (1985)	-	-
	33	3x	Okada (1986); Smith (1966)	-	-
<i>P. clusiifolia</i> (Jacq.) Hook	22	2x	Smith (1966); Jose & Sharma (1985); Okada (1986); Jose et al. (1994); Mathew et al. (1999)	-	-
<i>P. clusiifolia</i> variegata A. Dietr.	22	2x	Jose & Sharma (1985)	-	-

Continua...

Tabela 2: Número cromossômico, nível de ploidia e conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) relatado para o gênero *Peperomia* (continuação).

Espécie	Número cromossômico (2n)	Nível de Ploidia	Referências para número do cromossomo Nível de Ploidia	Valor 2C (pg)	Referências para valor 2C
<i>P. coquimbensis</i> Skottsb	46	-	Valdebenito et al. (1992)	-	-
<i>P. diaphanoides</i> Dahlst.	22	2x	Kobayashi et al. (2019)	-	-
<i>P. dindygulensis</i> Miq.	88	8x	Mathew et al. (1999)	-	-
<i>P. dolabrififormis</i> Kunth	22	2x	Smith (1966)	-	-
<i>P. eekana</i> C. DC.	36	3x	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
<i>P. erythroclada</i> C. DC.	28	-	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
<i>P. expallescens</i> C. DC.	66	6x	Smith (1966)	-	-
<i>P. fernandeziana</i> Miq.	44	4x	Spooner et al. (1987); Sanders et al. (1983); Valdebenito et al (1992)	-	-
<i>P. flexicaule</i> (Miq.) C. D.C.	44	4x	Samuel & Morawetz (1989)	-	-
<i>P. flexicaulis</i> Wawra	22	2x	Kobayashi et al. (2019)	-	-
<i>P. galioides</i> Kunth	22	2x	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
	44	4x	Valdebenito et al. (1992)	-	-
<i>P. galioides</i> H. B. K.	22	2x	Valdebenito et al. (1992)	-	-
<i>P. glabella</i> (Sw.) A. Dietr.	22	2x	Samuel & Morawetz (1989)	6.69	Samuel & Morawetz (1989)
<i>P. glabela</i> var. <i>variegata</i>	36	3x	Jose et al. (1992)	-	-
<i>P. hawaiensis</i> C. DC.	42	-	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
	46	3x		-	-

Continua...

Tabela 2: Número cromossômico, nível de ploidia e conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) relatado para o gênero *Peperomia* (continuação).

Espécie	Número cromossômico (2n)	Nível de Ploidia	Referências para número do cromossomo Nível de Ploidia	Valor 2C (pg)	Referências para valor 2C
<i>P. hederifolia</i> Hort.	22	2x	Okada (1986)	-	-
	24	2x	Blot 1960*	-	-
	26	-	Bai & Subramanian (1985)	-	-
<i>P. heyneana</i> Miq.	44	4x	Mathew et al. (1999)	-	-
<i>P. hesperomannii</i> Wawra	48	4x?	Smith (1966)	-	-
	66	6x?		-	-
<i>P. hylophila</i> C. DC.	22	2x	Kobayashi et al. (2019)	-	-
<i>P. incana</i> (Haw.) A. Dietr.	22	2x	Smith (1966); Bai & Subramanian (1985); Okada (1986); Samuel & Morawetz; (1989)	-	-
<i>P. japonica</i> Makino	22	2x	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
	44	4x	Smith (1966); Okada (1986)	-	-
<i>P. liliifolia</i> C.DC.	42	-	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
<i>P. longespicata</i> C. DC.	66	6x	Samuel & Morawetz (1989)	-	-
			Samuel & Morawetz (1992)	15.70	Samuel & Morawetz (1992)
<i>P. maculosa</i> (L.) Hook.	44	4x	Martinoli (1948)	-	-
	22	2x	Smith (1966)	-	-
<i>P. magnoliifolia</i> (Jacq.) A. Dietr.	22	2x	Jose & Sharma (1985); Samuel & Morawetz (1989); Jose et al. (1992)	5.37	Samuel & Morawetz (1992)
	24	2x	Hauser (1916) *	-	-
	38	-	Bai & Subramanian (1985)	-	-

Continua...

Tabela 2: Número cromossômico, nível de ploidia e conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) relatado para o gênero *Peperomia* (continuação).

Espécie	Número cromossômico (2n)	Nível de Ploidia	Referências para número do cromossomo Nível de Ploidia	Valor 2C (pg)	Referências para valor 2C
<i>P. margaritifera</i> Bertero ex Hook.	44	4x	Valdebenito et al. (1992)	-	-
	48	4x	Sanders (1983)	-	-
<i>P. marmorata</i> Hook. f.	32	-	Bai & Subramanian (1985)	-	-
<i>P. metallica</i> Linden & Rodig.	22	2x	Jose & Sharma (1985)	-	-
	24	2x	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
	32	-			
	33	3x	Smith (1966); Samuel & Morawetz (1989)	12.67	Samuel & Morawetz (1992)
<i>P. nivalis</i> Miq.	22	2x	Smith (1966)	-	-
<i>P. nummularifolia</i> H.B.K.	23	-		-	-
<i>P. obtusifolia</i> (L.) A. Dietr.	22	2x	Smith (1966); Jose et al. (1992); Bai & Subramanian (1985); Samuel & Morawetz (1989); Okada 1986); CCDB-Rice et al. (2014)	4.71	Samuel & Morawetz (1992)
	24	2x	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
<i>P. olens</i> C. DC.	44	2x	Valdebenito et al (1992)	-	-
<i>P. okinawensis</i> T. Yamaz.	44	2x	Kobayashi et al. (2019)	-	-

Continua...

Tabela 2: Número cromossômico, nível de ploidia e conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) relatado para o gênero *Peperomia* (continuação).

Espécie	Número cromossômico (2n)	Nível de Ploidia	Referências para número do cromossomo Nível de Ploidia	Valor 2C (pg)	Referências para valor 2C
<i>P. pellucida</i> (L.) Kunth	20	-	Brown (1908)	-	-
	24	2x		-	-
	22	2x	Sobti & Singh (1961)	-	-
	24	2x	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
	48	4x		-	-
	44	4x	Smith (1966); Jose & Sharma (1985); Bai & Subramanian (1985); Okada (1986); Jose et al. (1992); Mathew et al. (1999)	-	-
<i>P. polybotrya</i> Kunth	46	3x	CCDB-Rice et al. (2014); Afroz et al. (2016)	-	-
	22	2x	José & Sharma (1985); Jose et al. (1992)	-	-
<i>P. polystachya</i> (Ait.) Hook.	22	2x	Kobayashi et al. (2019)	-	-
<i>P. portulacoides</i> (Lam.) Dieter.	44	4x	Mathew et al. (1999)	-	-
<i>P. prostrata</i> B. S. Williams	22	2x	Kobayashi et al. (2019)	-	-
<i>P. quadrangularis</i> (J. V. Thomps.) A. Dietr	22	2x	Samuel & Morawetz (1989)	-	-
<i>P. reflexa</i> (L.) A. Dietr.	40	-	Bai & Subramanian (1985)	-	-
	22	2x	Bernardello et al. (1990)	-	-
	44	4x	Mathew et al. (1999)	-	-

Continua...

Tabela 2: Número cromossômico, nível de ploidia e conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) relatado para o gênero *Peperomia* (continuação).

Espécie	Número cromossômico (2n)	Nível de Ploidia	Referências para número do cromossomo Nível de Ploidia	Valor 2C (pg)	Referências para valor 2C
<i>P. resediflora</i> Linden & André	44	4x	Mathew et al. (1999)	-	-
<i>P. reticulata</i> Balf. f.	132	12x?	Kobayashi et al. (2019)	-	-
<i>P. rhombea</i> Ruiz & Pav.	44	4x	Smith (1966)	-	-
<i>P. rotundifolia</i> (L.) Kunth	22	2x	Smith (1966); Samuel & Morawetz (1989); Jose et al. (1994)	-	-
<i>P. sandersii</i> C. DC.	24	2x	Jose et al. (1994); Bai & Subramanian (1985); CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
	22	2x	José & Sharma (1985); Okada (1986); Mathew et al. (1999)	-	-
<i>P. scandens</i> Ruiz & Pav.	24	2x	Bai & Subramanian (1985)	-	-
	60	-	Blot 1960*	-	-
<i>P. sintenisii</i> C. DC.	16	-	Brown (1908)	-	-
<i>P. skottsbergii</i> C. DC. ex Skottsb.	46	3x?	Spooner et al. (1987); Valdebenito et al (1992)	-	-
	48	4x?	Sanders (1983)	-	-
	44	4x?	Valdebenito et al. (1992)	-	-
	48	4x?		-	-
<i>P. strawii</i> Hutchison ex Pino & Klopfenstein	22	2x	Pino et al. (2004)	-	-
<i>P. tetraphylla</i> Hook. & Arn.	22	2x	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
	44	2x	Muray & Lange (1999)	-	-

Continua...

Tabela 2: Número cromossômico, nível de ploidia e conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) relatado para o gênero *Peperomia* (continuação).

Espécie	Número cromossômico (2n)	Nível de Ploidia	Referências para número do cromossomo Nível de Ploidia	Valor 2C (pg)	Referências para valor 2C
<i>P. urocarpa</i> Fisch. & C. A. Mey.	44	2x	Smith (1966)	-	-
<i>P. velutina</i> Linden & André	22	2x	Smith (1966)	-	-
<i>P. verschaffeltii</i> Lem.	22	2x	Okada (1986)	-	-
	24	2x	Jose et al. (1994)	-	-
	26	-	Bai & Subramanian (1985)	-	-
<i>P. verticillata</i> (L.) A. Dietr.	22	2x	Samuel & Morawetz (1989)	-	-
<i>P. victoriana</i> C. DC.	22	2x	Smith (1966)	-	-
<i>P. aff. boninsimensis</i> Makino	110	-	Okada (1986)	-	-
<i>P. aff. fenzlei</i> Regel	44	4x	Samuel & Morawetz (1989)	8.09	Samuel & Morawetz (1992)
<i>P. aff. griseoargentina</i> Yunck.	22	2x	Smith (1966); Samuel & Morawetz (1989)	2.47	Samuel & Morawetz (1992)
	24	2x	Blot 1960*	-	-
<i>P. aff. longispicata</i> C. DC.	66	6x	Samuel & Morawetz (1989); Smith (1966)	-	-
<i>P. aff. perrottetiana</i> Miq.	66	6x	Smith (1966)	-	-
<i>P. aff. rubella</i> Hook.	22	2x	Bai & Subramanian (1985) Samuel & Morawetz (1989)	-	-
<i>P. aff. thomsoni</i> Hook.	66	6x	CCDB-Rice et al. (2014)	-	-
<i>P. aff. urvilleana</i> C. D.	44	4x	Murray & Lange (1999)	-	-

* Manuscrito original não acessado

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Peperomia* possui sistemática controversa e apesar da relevância em diferentes aspectos, sua biologia permanece pouco compreendida. As informações do número de cromossomos e conteúdo de DNA nuclear são úteis em estudos evolutivos, entretanto, para espécies de *Peperomia* estes dados ainda são limitados. Até o presente levantamento, somente 5% das espécies descritas para o gênero possuem o número cromossômico reportados. Em relação ao conteúdo de DNA nuclear, o número de espécies avaliadas é ainda menor, e atinge somente 0,54%. Portanto, estudos que visem ampliar o conhecimento do genoma para mais espécies são imperativos. Assim, o emprego da citogenética e da ferramenta citometria de fluxo podem dar suporte para melhorar a compreensão taxonômica, sistemática e evolutiva do gênero. Além disso, os dados fornecidos podem subsidiar estudos de melhoramento genético e conservação das espécies.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. REFERÊNCIAS

AFROZ, M.; SULTANA, S. S.; ALAM, S. S.; Karyomorphology of *Peperomia pellucida* (L.) H. B. & K. *Bangladesh Journal of Botany*, v.45, p.1251-1254, 2016.

ALVES, N. S. F.; SETZER, W. N.; SILVA, J. K. R. The chemistry and biological activities of *Peperomia pellucida* (Piperaceae): A critical review. *Journal of ethnopharmacology*, v. 232, p. 90-102, 2019.

ARRIGONI-BLANK, M.D.F.; DMITRIEVA, E. G.; FRANZOTTI, E.M.; ANTONIOLLI, A.R.; ANDRADE, M.R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). *Journal of ethnopharmacology*, v. 91, p. 215–218, 2004.

BAI, G. V. S.; SUBRAMANIAN, D. Cytotaxonomical studies of south Indian Piperaceae. *Cytologia*, v. 50, p. 583-592, 1985.

BFG - The Brazil Flora Group. Brazilian Flora 2020: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). *Rodriguésia*, v. 69, p. 1513-1527, 2018.

BENNETT, M.D. The duration of meiosis. *Proceedings of the Royal Society. Lond, Ser. B.*, v. 178, p. 277-299, 1971.

BENNETT, M.D. Nuclear characters in plants. *Brookhaven Symposium in Biology.*, v. 25, p. 344-366, 1974.

BERNARDELLO, L. M.; STIEFKENS, L. B.; PIOVANO, M. A. Números cromosómicos en dicotiledóneas argentinas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, v. 26, p. 149-157, 1990.

*BLOT, J. Contribution a l'étude cytologique du genre *Peperomia*. *Rev. Gen. Bot.*, v. 67, p. 522-535, 1960.

BROWN, W. H. The nature of the embryo sac of *Peperomia*. *Botanical Gazette*, v. 46, p. 445-460, 1908.

CALIMAG, Maria Minerva P. Herb-drug interactions. Manila, Philippines, Manila Medical Society, 2007.

CHEN, C. M.; JAN, F. Y.; CHEN, M. T.; LEE, T. J. Peperomins A, B and C, novel secolignans from *Peperomia japonica*. *Heterocycles*, v. 29, p. 411-414, 1989.

DAHLSTEDT, Hugo. Studien über Süd-und Central-Americkanische: Peperomien mit besonderer Berücksichtigung der Brasilianischen Sippen. *Kunl. boktr. PA Norstedt*, 1900.

DE LA TORRE, L.; Navarrete, H.; Muriel, P.; Macía, M. J.; Balslev, H. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (con extracto de datos)*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus, 2008.

DE DIAZ, A. M. P; DIAZ, P.P.; CARDOSO, H. Volatile constituents of *Peperomia subespatulata*. *Planta Medica*, v. 54, p. 92-93, 1988.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, D. S. V.; GUIMARAES, E. F.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal

tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry*, v. 69, p. 445–450, 2008.

FIGUEIREDO, R. A.; SAZIMA, M. Phenology and pollination biology of eight *Peperomia* species (Piperaceae) in semideciduous forests in Southeastern Brazil. *Plant Biology*, v. 9, p. 136–141, 2007.

FRENZKE, L.; SCHEIRIS, E.; PINO, G.; SYMMANK, L.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C.; SAMAIN, M. S. A revised infrageneric classification of the genus *Peperomia* (Piperaceae). *Taxon*, v. 64(3), p. 424-444, 2015.

FRODIN, David G. History and concepts of big plant genera. *Taxon*, v. 53(3), p. 753-776, 2004.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 29 out. 2020.

GRENAND, Pierre. Pharmacopées traditionnelles en Guyane: créoles, wayãpi, palikur. IRD éditions, 2018.

GUTIÉRREZ, Lady Yasmin Valério. Filogenia molecular e metabolismo secundário de espécies de *Peperomia*. São Paulo, 2015. 267 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

HAMZAH, R.U.; ODETOLA, A.A.; ERUKAINURE, O.L.; OYAGBEMI, A.A. *Peperomia pellucida* in diets modulates hyperglycemia, oxidative stress and dyslipidemia in diabetic rats. *Journal of Acute Disease*, v. 1(2), p. 135-140, 2012.

*HAUSER, R. Beitr. allg. Bot. 1: 115. In *Chromosome Atlas of Flowering Plants* by DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. (1955). George Allen and Unwin Ltd., London. 1916.

HOLTHE, P. A.; STERNBERG, L. D. S. L; TING, I. P. Developmental control of CAM in *Peperomia scandens*. *Plant Physiology*, v. 84, n. 3, p. 743-747, 1987.

JARDIM, A. C. G.; IGLOI, Z.; SHIMIZU, J. F.; SANTOS, V. A. D. F. F. M. D.; FELIPPE, L. G.; MAZZEU, B. F.; ...; RAHAL, P. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. *Antiviral research*, v. 115, p. 39-47, 2015.

JOSE, J.; SHARMA, A. K. Chromosome studies in *Peperomia* Ruiz & Pav. *Acta Bot. Indica*, v. 13, p. 77-83, 1985.

JOSE, J.; THOPPIL, J. E.; MATHEW, L. Chromosome complement analysis in five species of *Peperomia* Ruiz & Pav. *Cytologia*, v. 57, p. 227-229, 1992.

JOSE, J.; THOPPIL, J. E.; THOMAS, L. Karyotype analysis in *Peperomia* Ruiz & Pav. *Caryologia*, v. 47, p. 75-79, 1994.

KOBAYASHI, Y. H.; FUSE, S.; TAMURA, M. N. Biosystematic Studies on the Family Piperaceae (Piperales) I. Plastid DNA Phylogeny and Chromosome Number of *Peperomia* subgenus *Micropiper*. *Acta Phytotax. Geobot.*, v. 70, p. 1-17, 2019.

LANGFIELD, R. D.; SCARANO, F. J.; HEITZMAN, M. E.; KONDO, M.; HAMMOND, G. B.; NETO, C. C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *Journal of ethnopharmacology*, v. 94(2-3), p. 279-281, 2004.

LI, N.; WU, J. L.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J. I.; BAI, L. M.; WANG, L. Y.; ... & TOMIDA, A. Lignanas bioativas de *Peperomia duclouxii*. *Journal of natural products*, v. 70 (4), p. 544-548, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002. 512p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras: 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2008, 1130p.

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; BARRIOS, A. A.; FOURNET, A.; DUCROT, P. H. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. *Journal of natural products*, v. 58(2), p. 324-328, 1995.

MARTINOLI, G. Embriologia della *Peperomia maculosa* Hook. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.*, v. 55, p. 235-250, 1948.

MATHEW, P. M.: Studies on Piperaceae. *Journal of the Indian Botanical Society.*, v. 37, p. 155- 171, 1958.

MATHEW, P. J.; MATHEW, P. M.; PUSHPANGADAN, P. Cytology and its bearing on the systematics and phylogeny of the Piperaceae. *Cytologia*, v. 64, p. 301-307, 1999.

MATHIEU, G. Taxonomic Repertory of the Genus *Peperomia* 2001-2020. Disponível em: <<http://www.peperomia.net>> Acesso em: out. 2020.

MATHIEU, G.; VERGARA-RODRIGUEZ, D.; KRÖMER, T.; KARGER, D. N. *Peperomia* (Piperaceae) novelties from Veracruz State, Mexico. *Phytotaxa*, v. 205(4), p. 268-276, 2015.

MBAH, J. A.; TCHUENDEM, M. H.; TANE, P.; STERNER, O. Two chromones from *Peperomia vulcanica*. *Phytochemistry*, v. 60, p. 799–801, 2002.

MBAH, J. A.; NGEMENYA, M. N.; ABAWAH, A. L.; BABIAKA, S. B.; NUBED, L. N.; NYONGBELA, K. D.; EFANGE, S. M. Bioassayguided discovery of antibacterial agents: in vitro screening of *Peperomia vulcanica*, *Peperomia fernandopoioana* and *Scleria striatinux*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, v. 11, p. 10, 2012.

McKENDRICK, M. *Peperomias*. Survey of a varied, and sometimes exasperating, genus. *Garden* (London 1975+), v. 117, p. 352-356, 1992.

MOLLIK, M. A. H.; HOSSAN, M. S. H.; PAUL, A. K.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, M.; JAHAN, R.; RAHMATULLAH, M. A comparative analysis of medicinal plants used by folk medicinal healers in three districts of Bangladesh and inquiry as to mode of selection of medicinal plants. *Ethnobotany Research and Applications*, v. 8, p. 195–218, 2010.

MIQUEL, F. A. W. *Systema Piperacearum* (Kramers, H. A., ed.), Rotterdam, 1843, p.64–199.

MURRAY, B. G.; LANGE, P. J. Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand flora - 35. Miscellaneous familie. *New Zealand Journal of Botany*, v. 37, p. 511-521, 1999.

MURRAY, B. G.; LANGE, P. J. Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand flora - 40. Miscellaneous counts for 36 families. *New Zealand Journal of Botany*, v. 51, p. 31-60. 2013.

NISHANTHI, M.; MOHANAMBAL, E.; NARENDIRAN, S.; SHANKAR, M.; AANANDHI, M. V.; VIJAYAKUMAR, B. Extraction and preliminary phytochemical investigation on whole plant of *Peperomia tetraphylla* (G. Forst. Hook & Arn). *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, v. 2, p. 35-38, 2012.

OKADA, H. Karyomorphology and relationships in some genera of Saururaceae and Piperaceae. *Bot. Mag.*, v. 99, p. 289-299, 1986.

PATEL, A.; TING, I. P. Relationship between respiration and CAM-cycling in *Peperomia camptotricha*. *Plant physiology*, v. 84, p. 640–642, 1987.

PEGINGTON, C.; REES, H. Chromosome weights and measures in the *Triticinae*. *Heredity*, v. 25, p. 195-205, 1970.

PINHEIRO, B. G.; SILVA, A. S. B.; SOUZA, G. E. P.; FIGUEIREDO, J. G.; CUNHA, F. Q.; LAHLOU, S.; ... & SOUSA, P. J. C. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *Journal of ethnopharmacology*, v. 138(2), p. 479-486, 2011.

PINO, G.; KLOPFENSTEIN, O.; CIEZA, N. Four new taxa of *Peperomia* (Piperaceae) from San Marcos, northern Peru. *Haseltonia*, v. 10, p. 87-95, 2004.

RICE, A.; GLICK, L.; ABADI, S.; EINHORN, M.; KOPELMAN, N. M.; SALMAN-MINKOV, A.; MAYZEL, J.; CHAY, O.; MAYROSE, I. The chromosome counts database (CCDB) a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytol.*, v. 206, p. 19-26, 2014.

SAMAIN, M. S.; VANDERSCHAEVE, L.; CHAERLE, P.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C.; & WANKE, S. Is morphology telling the truth about the evolution of the species rich genus *Peperomia* (Piperaceae)?. *Plant Systematics and Evolution*, v. 278, p. 1-21, 2009.

SAMUEL, R.; MORAWETZ, W. Chromosomal evolution within Piperaceae. *Pl. Syst. Evol.*, v. 166, p. 105-117, 1989.

SAMUEL, R.; MORAWETZ, W. Nuclear DNA measurements in diploid and polyploid species of *Peperomia* (Piperaceae). *Caryologia*, v. 45, p. 353-358, 1992.

SANDERS, R. W.; STUESSY, T. F.; RODRIGUEZ, R. Chromosome numbers from the flora of the Juan Fernandez Islands. *American Journal of Botany*, v. 70, p. 799-810, 1983.

SANTOS, P.R.D.; MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. Essential oil of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry*, v. 58 (4), p. 547-551, 2001.

SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F. *A floresta curativa: plantas medicinais e tóxicas do noroeste da Amazônia*. Imprensa Dioscorides, 1990.

SHARMA, A. K.; BHATTACHARYYA, N. K. Chromosome studies on the two genera of the family Piperaceae. *Genetica*, v. 29, p. 256-289, 1958.

SHARMA, A. K.; BHATTACHARYYA, N. K. An investigation on the karyotype of the genus *Crinum* and its phylogeny. *Genetica*, v. 23, p. 263-296, 1959.

SKOTTSBERG, C. The genus *Peperomia* in Chile. *Acta Horti Gothoburgensis*, v. 17, p. 1-47, 1947.

SKOTTSBERG C. Chromosome numbers in Hawaiian flowering plants. *Ark. Bot.*, v. 3, p. 63, 1955.

SMITH, J. B. Chromosome numbers in *Peperomia* Ruiz & Pav. (Piperaceae) and a note on chromosome number of *Piper magnificum* Trelease. *Kew Bull*, v. 20, p. 521- 526, 1966.

SMITH, J. F.; STEVENS, A. C.; TEPE, E. J.; DAVIDSON, C. Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 275, p. 9-30, 2008.

SOBTI, S. N.; SINGH, S. D. A chromosome survey of Indian medicinal plants (Part-1). *Proc. Indian Acad. Sci.*, v. 54, p. 138-144, 1961.

SPOONER, D. M.; STUESSY, T. F.; CRAWFORD, D. J.; SILVA, M. Chromosome numbers from the flora of the Juan Fernandez Islands. II. *Rhodora*, v. 89, p. 351-356, 1987.

STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon*, v. 49 p. 451- 477, 2000.

STEHLÉ, H. Flore Descriptive des Antilles Françaises 2—Les Pipérales. Fort-de-France: Imprimerie du Gouvernement, 1940.

TRELEASE, William. The geography of American peppers. *Proceedings of the American Philosophical Society*, v. 69(1), p. 309-327, 1930.

VALDEBENITO, H.; STUESSY, T. F.; CRAWFORD, D. L.; SILVA, M. Evolution of *Peperomia* (Piperaceae) in the Juan Fernandez Islands, Chile. *Pl. Syst. Evol.*, v. 182, p. 107-119, 1992.

VELOZO, L. S.; FERREIRA, M. J.; SANTOS, M. I. S.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. *Fitoterapia*, v. 80(2), p. 119-122, 2009.

VILLEGAS, L. F.; MARCALO, A.; MARTIN, J.; FERNANDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. (+)-epi-Alpha-bisabolol [correction of bisbolol] is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. *Journal of Natural Products*, v. 64(10), p. 1357-1359, 2001.

WANKE, S.; SAMAIN, M. S.; VANDERSCHAEVE, L.; MATHIEU, G.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA). *Plant Biology*, v. 8(1), p. 93-102, 2006.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M. S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales—matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 42(2), p. 477-497, 2007.

WANG, Q. W.; YU, D. H.; LIN, M. G.; ZHAO, M.; ZHU, W. J.; LU, Q.; ... & FANG, C. Antiangiogenic polyketides from *Peperomia dindygulensis* Miq. *Molecules*, v. 17, p. 4474–4483, 2012.

YANG, C. H.; TAN, D. H.; HSU, W. L.; JONG, T. T.; WEN, C. L.; HSU, S. L.; CHANG, P. C. Anti-influenza virus activity of the ethanolic extract from *Peperomia sui*. *Journal of ethnopharmacology*, v. 155(1), p. 320-325, 2014.

YOUNGSTEADT, E.; BACA, J. A.; OSBORNE, J.; SCHAL, C. Species-specific seed dispersal in an obligate ant-plant mutualism. *PLoS One*, v. 4(2), e4335, 2009.

YOUNGSTEADT, E.; BUSTIOS, P. G.; SCHAL, C. Divergent chemical cues elicit seed collecting by ants in an obligate multi-species mutualism in lowland Amazonia. *Plos One*, v. 5(12), e15822, 2010.

YUNCKER, Truman George. Revision of the Hawaiian species of *Peperomia*. *Bernice P. Bishop Mus. Bull*, n° 112, 1933, p. 3-131.

YUNCKER, Truman George. The "Piperaceae" of Argentina, Bolivia, and Chile (Vol. 27). *Universidad Nacional de Tucuman, Instituto Miguel Lillo*, 1953.

YUNCKER, Truman George. The Piperaceae of Brasil III. *Peperomia*: taxa of uncertain status. *Hoehnea*, v. 4, p. 71-413, 1974.

Capítulo 11

O GENÉRO *COSTUS* (COSTACEAE)

Weslaine de Almeida Macedo

Lindisai Fernandes

Isane Vera Karsburg

1. INTRODUÇÃO

Espécies vegetais vêm sendo utilizadas para fins medicinais desde há tempos remotos pois é uma boa opção terapêutica. No início eram usadas principalmente por pessoas de regiões com baixa rentabilidade (AMOROZO, 2002). Porém com o passar dos anos as plantas medicinais passaram a ser utilizadas por grande parte das populações, mesmo as de rentabilidade maior. E foi a partir do conhecimento e uso popular das pessoas que as plantas medicinais passaram a ser utilizadas na fabricação de medicamentos na medicina tradicional (FIRMO et al., 2011).

Logo após serem feitos estudos da anatomia das espécies da família Costaceae, esta foi separada da família Zingiberaceae, por apresentar muitas espécies medicinais (TOMLINSON, 1962; KRESS, 1990). Espécies de Costaceae são usadas na medicina popular brasileira principalmente suas folhas, hastes e rizomas (LORENZE & MATOS, 2002), no tratamento de cálculos renais, reumatismo e diabetes, pela ação depurativa, diurética e cicatrizante (MARTINS et al., 2003; TRESVENZOL et al., 2006; MENEZES, 2007).

Embora as plantas medicinais apresentem vários benefícios à saúde, podem surgir alguns efeitos colaterais decorrentes da toxicidade dos extratos, altas dosagens ou interação com outros medicamentos, sendo necessário obter informações fitoquímicas da planta e métodos que padronizem um sistema de cultivo adequado e em larga escala. Sendo assim estudos que visem à propagação destas espécies e a investigação de seus efeitos genotóxicos, anti-proliferativos e anti-mutagênicos sobre as células são fundamentais (ROCHA, 2013).

No comércio de plantas ornamentais a presença de espécies da Família Costaceae também tem sido constatada, tanto para plantas de vaso para decoração

de interiores ou mudas para emprego em jardins, como para flores de corte, utilizando-se as inflorescências em arranjos florais. As espécies de Costaceae apresentam um crescimento intenso e de rápido florescimento e alta durabilidade pós colheita. Possuem extrema adaptação às condições abióticas, apresentando uma crescente demanda no mercado, sendo bem aceitas nos mercados nacional e internacional (CASTRO et al., 2011).

Vários autores abordaram as questões evolutivas e taxonômicas da família Costaceae e o gênero *Costus* na busca de respostas mais concretas e precisas do número de espécies e sua origem evolutiva mediante as incertezas ainda existentes (MAAS, 1972; SPECHT et al., 2001; SPECHT, 2006; ANDRÉ et al., 2016). Poucos foram os estudos de caracterização do cariótipo voltados para as espécies do gênero *Costus*, sabe-se que a maioria das Costaceae apresentam um conjunto cromossômico haplóide de $n=9$ e uma variação cromossômica em células somáticas entre $2n=2x=18$ a $2n=16x=144$. Estudos citogenéticos contribuem com esclarecimentos da ocorrência de poliploidia e hibridação (recombinação genética) para a evolução destas plantas (ANDRÉ, 2016). Com base nos dados citológicos, pode-se concluir que a poliploidia e as alterações estruturais dos cromossomos têm desempenhado papel importante na evolução desse gênero (SUBRAHMANYAM & KHOSHOO, 1986).

2. FAMÍLIA COSTACEAE

Costaceae integra a ordem Zingiberales (APG IV 2016), abrange sete gêneros e cerca de 120 a 150 espécies, e possui distribuição nos trópicos e subtropicais do Velho e do Novo Mundo (MAAS 1972, 1977). Os gêneros são: *Costus*, com o maior número de espécies (cerca de 80), *Cheilocostus*, *Chamaecostus*, *Paracostus*, *Dimerocostus*, *Monocostus* e *Tapeinochilos*. Esta família tem distribuição natural na América, África, Ásia e norte da Austrália, sendo pouco explorada economicamente apesar de seu potencial ornamental. De forma esporádica é possível encontrar algumas plantas no comércio, tanto como plantas de vaso, mudas para jardins, flores de corte ou plantas medicinais. Para o Brasil, são registrados três gêneros: *Chamaecostus* C.Specht & D.W.Stev., com seis espécies, e *Costus* L., com 16 espécies, ambos de ocorrência predominante na Região Norte, além

de *Dimerocostus* Kuntze (*D. strobilaceus* Kuntze, no Acre) (SOUZA E LORENZI 2008; MAAS & MAAS 2010; BFG, 2015).

Espécies de Costaceae são ervas perenes; rizoma com ramificação simpodial, caules aéreos não ramificados, eretos ou em espiral. Suas folhas são espiraladas, raramente rosuladas, pecioladas, bainha tubulosa, fechada; lígula truncada ou bilobada; limbo inteiro, simples, lanceolado, elíptico ou obovado, peniparalelinérveo; inflorescências terminais, espigas compactas, alongadas ou capitadas, ou raramente flores axilares; brácteas densamente imbricadas, com ou sem apêndice apical foliáceo (calo), glândula nectarífera linear, abaixo do ápice; bractéolas carenadas ou tubulosas (JARDIM et al., 2016).

As flores desta família são bissexuadas, zigomorfas; sépalas (3), unidas, formando um cálice tubuloso, trilobado; pétalas (3), unidas entre si geralmente até a metade; labelo petaloide formado pela fusão de 5 estaminódios; estame (1), filete achatado, ligeiramente petaloide, antera biteca, introrsa, rimosa; ovário ínfero, bi ou trilocular, estilete filiforme, entre as tecas, estigma bilamelado ou capitado, óvulos numerosos, placentação axilar; nectários septais. Frutos cápsulas loculicidas, cálice persistente. Sementes angular-ovoides, marrom-escuras ou pretas, arilo branco (JARDIM et al., 2016).

Espécies da família Costaceae tem sido amplamente comercializadas, seja para plantas de vaso e também decoração de interiores ou mudas para emprego em jardins, como para flores de corte, utilizando-se as inflorescências em arranjos florais. As espécies de Costaceae apresentam um crescimento intenso e de rápido florescimento e alta durabilidade pós colheita. Possuem extrema adaptação às condições abióticas, apresentando uma crescente demanda no mercado, sendo bem aceitas nos mercados nacional e internacional (CASTRO et al., 2011).

As plantas desta família além de utilização no quesito de ornamentação, são muito usadas na medicina popular brasileira, o qual são feitos usos de suas folhas, caule, flores e rizomas principalmente na região Amazônica (LORENZI & MATOS, 2002), sendo: depurativos, adstringentes e diuréticos (BOORHEM, 1999; BORRÁS, 2003). A decocção das partes vegetativas das espécies atua no tratamento de irritações vaginais, leucorréias e úlceras. De maneira geral o suco do caule fresco diluído é eficaz no tratamento de gonorreia, sífilis, nefrite, picada de insetos, problemas de bexiga e diabetes. As folhas podem ser combinadas com

Bonamia ferruginea “cipó-tuíra” (Choisy) Hallier em forma de combinações (garrafadas) no tratamento da malária, hepatite e diabetes (MARTINS et al., 2003; MENEZES, 2007).

3. GÊNERO *Costus*

3.1. Importância econômica

Conhecidas como cana-mansa, canarana, cana-de-macaco, canela-de-ema, pobre-velho e cana-do-brejo (LORENZI & SOUZA, 1999; LORENZI & MATOS, 2002; BORRÁS, 2003), plantas do gênero *Costus* possuem efeitos fitoterápicos com ação depurativa e diurética, analgésica para bexiga e uretra, sendo comumente utilizada na medicina popular (OLIVEIRA et al., 2008) aliviando infecções urinárias e auxiliando eliminação de pedras renais e formações de cristais (MENEZES, 2007; CÓGÁIN et al., 2015), seu chá é usado como depurativo, adstringente e diurético e no tratamento de irritações vaginais, leucorréias e úlceras (BOORHEM & LAGE, 2009; BORRÁS, 2003).

O suco do caule fresco é eficaz no tratamento de gonorréia, sífilis, nefrite, picada de insetos, problemas de bexiga e diabetes (ALBUQUERQUE, 1989; BORRÁS, 2003). As folhas são utilizadas no tratamento da malária, hepatite e diabetes em forma de combinações (garrafadas). A infusão das folhas é usada contra hipertensão e a infusão dos colmos é usada contra cólicas intestinais (DI STASI & LIMA, 2002). Contém, em seu rizoma, uma quantidade apreciável de diosgenina, uma sapogenina esteroideal usada para a síntese de cortisona, hormônios sexuais e contraceptivos (DASGUPTA & PANDEY, 1970).

Além destas aplicações, também se destacam como plantas ornamentais. Os interesses por algumas espécies desse gênero se dão como flor de corte pela grande durabilidade pós-colheita das inflorescências, enquanto o uso no paisagismo em vasos ou em canteiros está relacionado ao longo período de floração, à arquitetura da planta, à variação da textura, à forma e cor de folhas e inflorescências e à adaptação a diferentes locais de cultivo (CASTRO, 1995; CASTRO et al., 2011).

Por conta da baixa exploração econômica, esporadicamente, é possível encontrar algumas plantas no comércio, tanto como plantas de vaso, mudas para jardins, flores de corte ou plantas medicinais (CASTRO et al., 2011).

3.2. Aspectos morfológicos

Ervas terrestres, rizomatosas, perenes, geralmente possuem de um a três metros de altura (SALZMAN et al., 2015), não ramificadas. Possuem caule aéreo. Folhas com lígula geralmente pronunciada, de ápice acuminado. Inflorescência terminal, disposta em ramos áfilos ou foliosos, brácteas persistentes ovado-triangulares podendo ser verdes, vermelhas, amarelas, alaranjadas (brilantemente coloridas), algumas vezes, com apêndice apical foliáceo conspícuas, coriáceas, raramente cartáceas, comumente com apêndice apical foliáceo; bractéola dobrada, carenada. Suas flores com cálice raramente excedendo o comprimento das brácteas; estame 1, filete petaloide; labelo do mesmo comprimento ou superando a corola; ovário trilocular, com numerosos óvulos dispostos em fileiras de 2; estigma 2-lamelado com apêndice dorsal bilobado, lobos do cálice triangulares, tubo da corola igual ao comprimento do cálice, lobos estreitamente elípticos, em geral grande e vistoso; estame estreitamente elíptico; ovário com óvulos 2-seriados. A cápsula deiscente ou indeiscente, alva, elipsóide a globosa; sementes carnosas, pretas ou castanhas, 2-4 mm, arilo alvo, grande e lacerado; muitas vezes todas as sementes do mesmo lóculo, na deiscência, coalescentes pelos seus arilos (ANTAR & SANO, 2016; JARDIM et al., 2016).

3.3. Botânica e Distribuição geográfica

A polinização do gênero *Costus* é feita por um número limitado de taxa, os polinizadores são as abelhas ou os beija-flores, indicando alto grau de especialização destas plantas e de seus polinizadores (KAY & SCHEMSKE, 2003; ARAUJO & OLIVEIRA, 2007).

O padrão de floração anual é de quatro a cinco meses, ocorrendo entre novembro e abril, na estação chuvosa com formação de frutos no final desta estação (SCHEMSKE, 1983; NEWSTROM et al., 1994; BUZATO et al., 2000; ARAÚJO & OLIVEIRA, 2007). A maioria das espécies de *Costus* se reproduzem por propagação vegetativa (MAAS, 1997). Geralmente, estas crescem em baixa densidade populacional. A maioria produz apenas uma flor por dia, podendo, com raridade, produzir duas e apresentam um período de floração estendido

(SCHEMSKE,1981; KAY & SCHEMSKE, 2003). Algumas espécies se desenvolvem a pleno sol e outras sob sombra; ou, ainda, são resistentes ao frio intenso e já outras estritamente tropicais (CASTRO et al., 2011).

Estudos filogenéticos utilizando caracteres morfológicos e moleculares apontam *Costus* como polifilético. Assim, uma nova circunscrição foi proposta, na qual são reconhecidos como gêneros: *Costus*, *Paracostus*, *Cheilocostus* e *Chamaecostus* (SPECHT et al., 2001, SPECHT & STEVENSON 2006). O gênero *Costus* é o maior da família Costaceae, com 125 a 175 espécies (STEVENSON & STEVENSON, 2004) de distribuição pantropical, mas, segundo Costa et al., (2011), este número de espécies é de aproximadamente 100, destas, cerca de 20 ocorrem no Brasil. Já Salzman et al. (2015) destacam, na circunscrição atual, que, *Costus* é um gênero monofilético e possui cerca de 80 espécies, encontradas na América do Sul em florestas chuvosas; segundo Maas e Maas (2015), no Brasil, ocorrem 16 espécies distribuídas em todas as regiões, predominantemente em ambientes florestais associados a locais úmidos e sombreados. De acordo com André et al. (2016), quase metade das espécies neotropicais de *Costus* são endêmicas da América Central mantendo uma distribuição com cerca de 29 espécies na África e 51 nos Neotrópicos. No sudeste da Ásia e nordeste da Austrália com cerca de 5 espécies (KAMER & MAAS, 2003). Esta variação no número de espécies é devido à complexidade para identificação e diferenciação dessas plantas.

3.4. Cariótipo do gênero

Em relação ao cariótipo do gênero, o número cromossômico pode variar, apresentando $2n= 18, 36, 27...$ a 144 cromossomos somáticos (BOEM, 1931; SATO, 1960; MAHANTY, 1970; MAAS, 1972; GUERRA, 1988; MUKHOPADHYAY & SHARMA, 1990; VOVIDES & LASCURAIN, 1995). O número básico ou o conjunto haploide do gênero *Costus* é $n= 9$ (MAAS, 1972; RAVEN, 1975) como mostra a tabela 1. Pode-se, portanto, considerar a ocorrência de indivíduos haploides, diploide, poliploides, triploides e tetraploides entre as espécies.

Subrahmanyam & Khoshoo (1986) afirmaram que três espécies do gênero, coletadas em diferentes regiões da Índia, estudadas em ângulo citogeográfico, que os materiais de diferentes regiões geográficas possuem diferentes níveis de ploidia.

A poliploidia tem sido um fator importante na adaptação, especiação, e evolução dos eucariontes (LAVANIA & SRIVASTAVA, 1999; MASTERSON, 1994; OTTO & WHITTON, 2000), estando, frequentemente, associada a mudanças na morfologia, fenologia, metabolismo, taxas de desenvolvimento, regulação gênica e tolerâncias fisiológicas (OTTO & WHITTON, 2000).

Tabela 1. Números cromossômicos de espécies do gênero *Costus*, abordados na literatura.

Espécie	Número cromossômico		Autor
	n	2n	
<i>Costus albus</i> A. Chev		36	Mahanty (1970)
<i>C. afer</i> Ker-Gawl		18; 36	Gill (1978); Venkatasubban (1946)
<i>C. amazonicus</i> (Loes.) J.F.Macbr		18	Fernandes et al.,(2020)
<i>C. arabicus</i>		18	Maas (1972); Fernandes et al., (2020)
<i>C. bicolor</i> J. Braun et K. Schum		18	Venkatasubban (1946)
<i>C. brasiliensis</i> K. Schum		18	Guerra (1988)
<i>C. curvibracteatus</i> Maas		18	Guerra (1988)
<i>C. cylindricus</i> (Plum.) Jacq.		18	Simmonds (1953)
<i>C. deistelii</i> K. Schum		18	Miege (1962)
<i>C. dhaninivatii</i> K. Larsen		18	Larsen (1965)
<i>C. dinklagei</i> K. Schum		18	Miege (1962)
<i>C. dirzoi</i> Garcia-Mend e Ibarra-Manriquez	27, 28;	28	Vovides & Lascurain (1995); Vovides (1994)
<i>C. discolor</i> Roscoe		18	Venkatasubban (1946), Mahanty (1970)
<i>C. dubius</i> K. Schum		36	Chen et al. (1986)
<i>C. elegans</i> Host. Ex Peters	18;	27	Venkatasubban (1946); Ramachandran (1969)
<i>C. englerianus</i> K. Schum		36	Mahanty (1970)
<i>C. erythrocorone</i> K. Schum		18	Guerra (1988)
<i>C. friedrichsenii</i> O. G. Peters.		18	Simmonds (1953)
<i>C. giganteus</i> Welw. Ex Ridl.		18	Miege (1962)
<i>C. glabratus</i> Sw.		36	Venkatasubban (1946)

(continua...)

Tabela 1. Números cromossômicos de espécies do gênero *Costus*, abordados na literatura. (Continuação)

Espécie	Número cromossômico		Autor
	n	2n	
<i>C. glaucus</i> Maas		18	Guerra (1988)
<i>C. guanaiensis</i> Rusby		18	Guerra (1988)
<i>C. igneus</i> N.E. Br.		18	Venkatasubban (1946)
<i>C. lacerus</i> Gagnep		18	Chen et al. (1987)
<i>C. lucanusianus</i> J. Braun et K. Schum		18, 27; 36	Edeoga & Okoli (2000); Miege (1962)
<i>C. macrostrobilus</i> K. Schum		18	Mahanty (1970)
<i>C. malortieanus</i> H. Wendl		18; 18, 27; 36	Subrahmanyam e Khoshoo (1986); Miege (1962); Omanakumari e Mathew (1988)
<i>C. megalobracteata</i> K. Schum		36	Subrahmanyam & Khoshoo (1986)
<i>C. musaicus</i> Hort.		108	Venkatasubban (1946)
<i>C. niveus</i> G. Mey		18	Mahanty (1970)
<i>C. niveo-purpureus</i> Jacq.		18	Simmonds (1953)
<i>C. pictus</i> D. Don ex Lindl.	9	18; 18, 36; 36	Vovides & Lascurain (1995); Vovides (1994); Venkatasubban (1946)
<i>C. pulverulentus</i> C. Presl		18	Maas (1972); Guerra (1988), Vovides e Lascurain (1995)
<i>C. rumphianus</i> Valetton ex K. Heyne		18	Mahanty (1970)
<i>C. scaber</i> Ruis e Pav		18	Maas (1972), Vovides (1994), Vovides & Lascurain (1995); Fernades et al., (2020)
<i>C. schlechteri</i> H. Winkl		27	Mahanty (1970)
<i>C. sericeus</i>		27	Simmonds (1953)
<i>C. speciosus</i> (Koenig) Sm.		18, 27, 36; 18, 36; 18, 27, 36, 54, 72, 144	Miege (1962), Tyagi (1988), Lodh & Basu (2013); Subrahmanyam & Khoshoo (1986); Mukhopadhyay & Sharma (1990)
<i>C. spectabilis</i> (Fenzl) K. Schum		18, 27	Miege (1962)
<i>C. spiralis</i> var. <i>spiralis</i>		18	Maas (1972)

(continua...)

Tabela 1. Números cromossômicos de espécies do gênero *Costus*, abordados na literatura. (Continuação)

Espécie	Número cromossômico		Autor
	n	2n	
<i>C. spiralis</i> var. <i>villosus</i>		18	Maas (1972)
<i>C. spiralis</i> (Jacq.) Roscoe		18	Fernandes et al.,(2020)
<i>C. talbotii</i> Ridl.		18	Miege (1962)
<i>C. tappenbekianus</i> J. Braun et K. Schum		18	Mahanty (1970)
<i>C. tonkinensis</i> Gagnep		18	Chen e Chen (1984)
<i>C. villosus</i> K. Schum		27	Venkatasubban (1946)
<i>C. zechii</i> K. Schum		18	Gill (1978)

A morfologia cromossômica de *Costus* também foi relatada em alguns trabalhos. Várias foram as análises realizadas quanto ao número cromossômico, como pode ser visto na tabela anterior (tabela 1), porém poucos estudos evidenciam sua morfologia. Dentre os poucos, pode-se citar o trabalho realizado por Guerra (1988), que, para seis espécies de *Costus*, o comprimento cromossômico variou entre $2,0 \pm 5,5 \mu\text{m}$ distribuídos em pares metacêntricos e submetacêntricos em todas as espécies analisadas. Mahanty (1970) evidenciou a ocorrência de variação do comprimento cromossômico de $2,3 \pm 3,7 \mu\text{m}$ em oito espécies estudadas. Por sua vez, Lodh & Basu (2013) descreveram, para o comprimento cromossômico, variação de $1,47 \pm 3,27 \mu\text{m}$ para *C. speciosus* (representantes diploides); $1,6 \pm 4,37 \mu\text{m}$ em triploides e $1,57 \pm 4,27 \mu\text{m}$ em tetraploides. O cariótipo de *C. lucanusianus*, na concepção de Edeoga & Okoli (2000), é composto por 1 par de metacêntricos e 8 pares de cromossomos acrocêntricos de acordo com a aposição do centrômero (1M+8A).

3.5. Espécies de *Costus* L. que são utilizadas como ornamentais e medicinais

De acordo com o estudo de Fernandes et al., (2020), ao analisar o número cromossômico de espécies de *Costus* adotando a metodologia de Carvalho et al. (2007) e Carvalho & Saraiva (1993), concluiu que as espécies *C. arabicus*, *C. spiralis*, *C. scaber* e *C. amazonicus* apresentaram $2n = 2x = 18$ cromossomos,

sendo o número cromossômico básico $n = 9$.

E no estudo de Macedo (2020), ao analisar a citogenotoxicidade destas quatro espécies de *Costus* (*C. spiralis*, *C. amazonicus*, *C. scaber* e *C. arabicus*), verificou que houve efeitos citotóxicos e genotóxicos, além de alta percentagem de efeito antiproliferativo em algumas concentrações utilizadas, sendo assim as quatro espécies podem ser utilizadas no melhoramento genético de plantas no quesito de farmacologia, principalmente no ramo da oncologia, por possuir compostos secundários inibitórios da divisão celular.

Além disso Macedo (2020), recomenda para a população que faz uso destas espécies, não utilizar altas concentrações de *Costus* L. e nem fazer uso por vários dias consecutivos, devido poder trazer danos à saúde do organismo, pois apresentou alto índice citotóxico e genotóxico em algumas concentrações a medida que aumentou o tempo de exposição.

3.5.1. *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe

Costus spiralis (Figura 1) é popularmente usada para o tratamento de infecções urinárias, cálculos renais, infecções de garganta, câncer de próstata, hipertensão arterial, diarreia, hepatite, sífilis, gonorreia e diabetes mellitus (SILVEIRA & RIEDER, 2009).

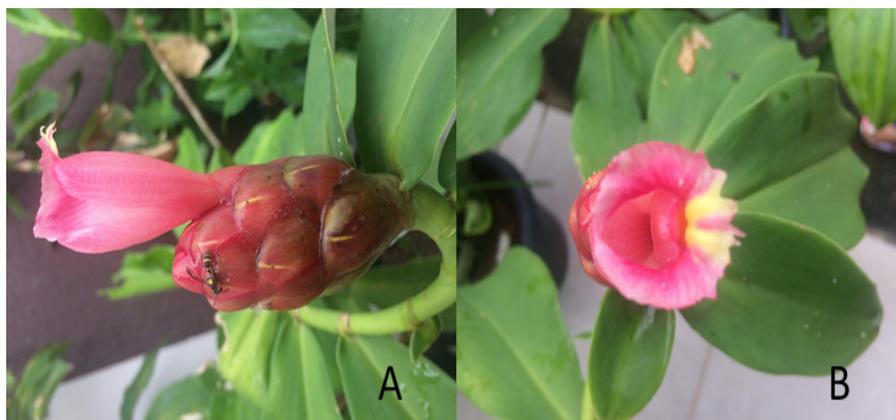


Figura 1. *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe. Fonte: Weslaine de Almeida Maced

São ervas que possuem de 1 à 3,5 metros de altura; folhas com pecíolo de 2 à 17 milímetros de comprimento; a bainha possui de 5 à 20 milímetros de largura; a lígula truncada de 2 à 10 milímetros de comprimento; lâmina estreitamente elíptica a estreitamente obovada de 8 à 30 centímetros, ápice agudo a acuminado, base cuneada a arredondada, face adaxial glabra, face abaxial glabra passando a pubérula próximo ao ápice. Inflorescências ovoides de 4 à 11 podendo chegar até centímetros de comprimento; brácteas vermelhas em ambas as faces, coriáceas, largamente ovadas de 20 à 40 milímetros de comprimento; bractéolas de 15 à 29 milímetros de comprimento. Suas flores possuem cálice de cor vermelho-purpúreo de 6 à 13 milímetros de comprimento; a corola é de cor vermelho-salmão a vermelho-purpúreo em ambas as faces de 45 à 60 milímetros de comprimento, lobos de 35 à 45 milímetros de comprimento; labelo vermelho-róseo, oblongo obovado quando estendido de 25 à 30 milímetros de comprimento, lobos laterais encurvados, formando um tubo delgado, vermelho, lobo mediano branco; estame vermelho, ápice amarelo de 25 à 30 milímetros de comprimento; estigma bilamelado. As cápsulas são elipsoides de 1 à 1,3 centímetros de comprimento (JARDIM et al., 2016).

Costus spiralis (Jacq.) Roscoe ocorre na América do Sul tropical em florestas chuvosas, savanas, ou em afloramentos graníticos exceto na região andina. No Brasil, ocorre em diversas regiões, sendo: cerrado, mata estacional semidecídua, restinga, áreas de mata próximas a rios e em plantações de cacau. As flores são coletadas de janeiro a julho e com frutos em março (MAAS, 1972; JARDIM et al., 2016).

Costus spiralis apresenta padrão de floração anual com duração média de 4 a 5 meses. Este padrão é semelhante ao descrito para populações da mesma espécie para áreas da Mata Atlântica. Como outras espécies do gênero (SCHEMSKE, 1983), *C. spiralis* floresce na estação chuvosa e frutifica no fim desta estação. Apresenta estratégia de floração do tipo disponibilidade regular, com a produção de uma ou duas flores por inflorescência por dia durante um período prolongado (ARAÚJO & OLIVEIRA, 2007).

Para Smith et al. (2004), esta espécie, assim como outras espécies deste gênero possui inflorescências com brácteas vermelhas que tem função de atrair os polinizadores (STILES, 1981). As flores de *C. spiralis* são morfológicamente

complexas e similares a outras espécies de *Costus* polinizadas por aves, que geralmente são alaranjadas, vermelhas ou rosa, com as brácteas da mesma cor, enquanto as flores das espécies polinizadas por abelhas frequentemente são brancas, amarelas, alaranjadas e raramente vermelhas, com as brácteas das inflorescências geralmente verdes. As flores polinizadas por aves geralmente apresentam o lábio pequeno e tubular enquanto naquelas polinizadas por abelhas este lábio é curto e largo podendo ser usado como plataforma de pouso (SPECHT et al. 2001).

Considerando que extratos de várias espécies de *Costus* são utilizados para controlar os níveis de glicose no sangue, é notório que as propriedades anti-hiperglicêmicas de *C. spiralis* resulta da atividade de AGI conferida pela presença de flavonoides (OLIVEIRA et al., 2018).

3.5.2. *Costus amazonicus* (Loes.) J.F.Macbr

Costus amazonicus (Loes.) J.F.Macbr (Figura 2), recentemente reclassificada como *Costus arabicus* L. *variegata* (CASTRO et al., 2011), é uma espécie que possui porte de 1 a 3 metros de altura, suas folhas são estreitamente obovada ovais e a inflorescência pode ser ovóide ou cilíndrica de cor amarela, laranja-amarelado ou branco-amarelado, a corola é amarela e com lóbulos laterais descascados amarelos escuros enquanto os lobos médios têm uma zona amarela no centro com margem vermelha no centro. O uso ornamental desta espécie está relacionado ao longo período de floração, à arquitetura da planta, à variação da textura, forma e cor de folhas e inflorescências e à adaptação a diferentes locais de cultivo. Originalmente da América do Sul, essa planta é muito popular no Havaí e na Flórida. Esta espécie é distribuída na região amazônica do Brasil, Colômbia, Equador e Peru e sua ocorrência: no Brasil nos estados da Amazônia e Mato Grosso (COSTA et al., 2012).

Costus amazonicus de porte baixo e hábito expandido apresenta baixa capacidade de cobertura do solo decorrente da emissão de poucas hastes foliares levemente decumbentes. Possivelmente em plantios adensados dessa espécie, esta dificuldade seja facilmente superada. Entretanto, face às suas exóticas folhas variegadas em verde e creme, mantidas por longo período, esta espécie pode ser caracterizada como exuberante e muito atraente, com elevado potencial de uso em

jardins tropicais que necessitam de espécies de sombra, que possam fazer contraste de cor e textura com as outras folhagens, cresce em uma moita, melhor em solo rico e altamente orgânico, com umidade regular. Fácil de cultivar, pode até ser propagado a partir de estacas (CASTRO et al., 2011).



Figura 2. *Costus amazonicus* (Loes.) J.F.Macbr. Fonte: Weslaine de Almeida Macedo

Passos (2019) traz que esta espécie, além de ser utilizada como ornamental devido a beleza e durabilidade de suas flores, e na medicina popular por possuir compostos secundários em seus rizomas, caules, flores e folhas, sendo utilizada para tratar diversos **problemas urinários e todos aqueles relacionados com retenção hídrica**, de alguma maneira, é também utilizada na alimentação como plantas alimentícias não convencionais (PANC), sendo utilizadas as folhas e flores na forma de sucos, geleias e saladas.

3.5.3. *Costus scaber* Ruiz & Pav.

Como muitas espécies da ordem Zingiberales a *Costus scaber* (Figura 3), é uma planta rizomatosa com crescimento simpodial, possui brotos aéreos bem desenvolvidos com inflorescência terminal. A parte aérea pode chegar a 3 metros de altura (KIRCHOFF & RUTISHAUSER, 1990).

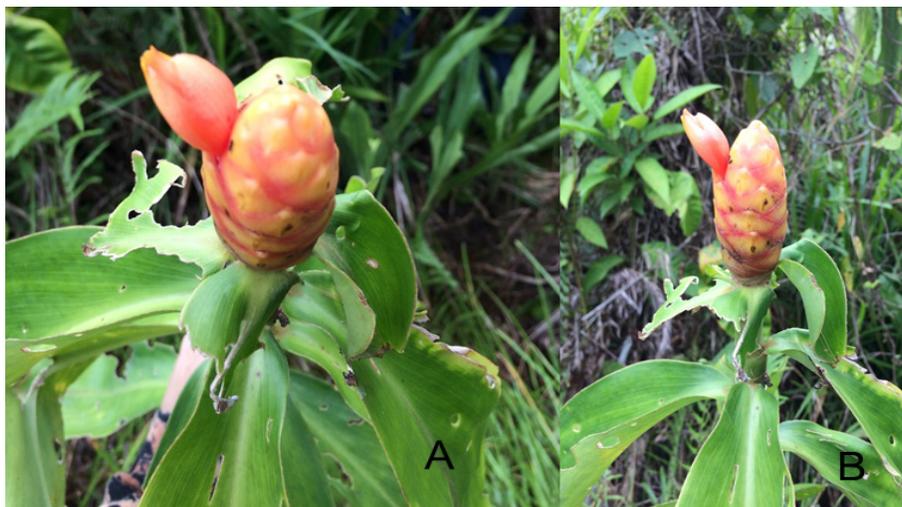


Figura 3. *Costus scaber* Ruiz & Pav. Fonte: Weslaine de Almeida Macedo

São ervas que possuem de 1 à 3 metros de altura, suas folhas possuem pecíolo de 2 à 10 milímetros de comprimento; a bainha tem de 5 à 15 milímetros de largura; a lígula truncada de 2 à 12 milímetros de comprimento; lâmina elíptica a obovada, de 10 à 11 centímetros, ápice agudo, base cuneada a arredondada, face adaxial esparsamente pilosa a glabra, face abaxial glabra passando a pubérula próximo ao ápice; suas inflorescências são ovoides a estreitamente cilíndricas de 4 à 11 centímetros de comprimento; as brácteas são vermelhas a laranja avermelhadas em ambas as faces, coriáceas, largamente ovadas de 20 à 35 milímetros de comprimento; bractéolas de 9 à 12 milímetros de comprimento. As flores possuem cálice de cor vermelha medindo de 30 à 70 milímetros de comprimento; a corola varia de cor laranja a amarela em ambas as faces de 35 à 40 milímetros de comprimento; labelo amarelo, oblongo-obovado quando estendido de 20 à 30 milímetros de comprimento; lobos laterais encurvados, formando um tubo delgado, vermelho purpúreo, o mediano branco; estame vermelho a laranja-avermelhado, ápice amarelo medindo de 20 à 25 milímetros de comprimento; o estigma é bilamelado e cápsulas são elipsoides a subglobosas medindo de 0,7 à 1,2 centímetros de comprimento (JARDIM et al., 2016).

Os brotos aéreos não são ramificados e sustentam entre 11 e 24 catafilos em suas regiões e 18 a 42 folhas. A inflorescência terminal apresenta entre 50 e 82

brácteas fica por um período de vários meses, o período de floração geralmente se estende de abril a setembro. Contudo, ocasionalmente é possível encontrar inflorescências e flores até dezembro (KIRCHOFF, 1986).

Sua distribuição geográfica se dá por toda a América do Sul tropical, no Brasil ocorre nas Regiões Norte, Centro-Oeste (Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo), Sul (Santa Catarina) e Nordeste (Pernambuco e Bahia). G8, H8, I8: floresta ombrófila, próximo a rios e em plantações de cacau, mata mesófila e restinga. Coletada com flores de março a julho e com frutos de fevereiro a março (MAAS & MAAS 2016; JARDIM et al., 2016).

Costus scaber assemelha-se a *C. spiralis* quanto à coloração das brácteas e tamanho do labelo, diferenciando-se principalmente pela cor da corola e do labelo: em *C. scaber*, a corola é laranja a amarela e o labelo amarelo, enquanto em *C. spiralis*, ambos são vermelho-purpúreos. Na ausência da coloração das flores, as medidas das peças florais devem ser consideradas: em *C. spiralis*, elas são maiores que em *C. scaber* (JARDIM et al., 2016).

3.5.4. *Costus arabicus* L.

A espécie *Costus arabicus* L. (Figura 4), são ervas que possuem 1 à 3 metros de altura, suas folhas possuem pecíolo de 2 à 7 milímetros de comprimento; a bainha de 5 à 15 milímetros de largura; lígula truncada de 2 à 10 milímetros de comprimento; lâmina estreitamente ovada a obovada de 9 à 22 centímetros, ápice agudo, base cordada, face adaxial glabra, a abaxial pubérula a velutina. Inflorescências ovoides a fusiformes de 6 à 13 centímetros de comprimento; brácteas verdes na face externa, vermelhas na interna, largamente ovadas de 25 à 45 milímetros de comprimento; bractéolas de 20 à 34 milímetros de comprimento. As flores com cálice vermelho-rosado de 11 à 14 milímetros de comprimento; corola branca de 60 à 70 milímetros de comprimento, tubo de 15 à 20 milímetros de comprimento, lobos de 40 à 50 milímetros de comprimento; labelo branco, largamente obovado quando estendido de 50 à 70 milímetros de comprimentos, lobos laterais geralmente púrpura, o mediano com mancha central amarela; estame branco de 40 à 50 milímetros de comprimento; estigma bilamelado e cápsulas elipsoides medindo de 1 à 1,8 centímetros de comprimento (JARDIM et al., 2016).



Figura 4. *Costus arabicus* L. Fonte: Weslaine de Almeida Macedo

Ocorre nas Antilhas e América do Sul tropical. No Brasil, distribui-se em todas as Regiões, mas no Nordeste, apenas nos estados da Bahia e do Maranhão. Floresta ombrófila do sul da Bahia, em áreas próximas a rios e em plantações de cacau. É coletada com flores em abril e de setembro a dezembro e com frutos de maio a julho. *C. arabicus* se destaca prontamente pela base da folha geralmente cordada, o que raramente acontece no gênero. É utilizada como medicinal e o extrato etanólico e hexânico do seu rizoma apresenta potencial antibacteriano e antifúngico (TINTINO et al. 2013).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, L.S.B.; NEVES, L.J. Anatomia de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt Smith (Zingiberaceae). Acta Botanica Brasilica, v.18, n.1, p.109-121, 2004.

AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger. Acta Botanica Brasilica, v.16, p.189-203, 2002.

ANDRÉ, T.; SALZMAN, S., WENDT, T.; SPECHT, C. D. Speciation dynamics and biogeography of Neotropical spiral gingers (Costaceae). Molecular phylogenetics and evolution, v.103, p. 55-63, 2016.

ANTAR, G. M.; SANO, P. T. Flora da serra do cipó, Minas Gerais: Costaceae. Boletim de Botanica USP, v.34, p.1-5, 2016.

APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. Botanical Journal of the Linnean Society v.161, p.105–121, 2016.

ARAÚJO, F. P.; OLIVEIRA, P. E. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. Revista Brasileira de Botânica, v.30 n.1, 61-70, 2007.

BFG (the Brazil Flora Group). Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. Rodriguésia v.66, n.4, p. 1085-1113, 2015.

BOORHEM, R. L. Segredos e virtudes das plantas medicinais. Reader's Digest Brasil Ltda, p.1109-1110, 1999.

BOORHEM, R. L.; LAGE, E. B. Drogas e extratos vegetais utilizados em fitoterapia. Revista Fitos, v.4, n.1, p.37-55, 2009.

BORRÁS, M.R.L. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa. Manaus: Valer, 2003. 322p.

BUZATO, S.; M. SAZIMA; SAZIMA, I. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites. Biotropica, v.32, p.824-841, 2000.

CASTRO, C. E. F.; MOREIRA, S. R.; CASTRO, C. R.; SOUZA, F. V. D.; LOGES, V.; GONÇALVES, C.; DE MOURA, L. F. Avaliação de espécies de Costaceae para uso ornamental. Ornamental Horticulture, v.17, n.1, p.63-74, 2011.

CASTRO, C.E.F. Inter-relações das famílias das Zingiberales. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, vol1, n.1, p.2-11, 1995.

CÓGÁIN, M. R.; LINNES, M. P.; LEE, H. J.; KRAMBECK, A. E.; UCHÔA, J. C. M.; KLIM, S., LIESKE, J. C. Aqueous extract of *Costus arabicus* in Hibits calcium oxalate crystal growth and adhesion to renal epithelial cell. Urolitíase, v.43, n.2, p.119-124, 2015.

COSTA, F. R. C.; ESPINELLI, F. P.; FIGUEIREDO, F. O. G. Guide to the zingiberales of PPBio sites in brazilian western Amazonia. Manaus: Áttema Design Editorial, 2011. 284p.

COSTA, V. P.; HAYASHI, A. H.; DE CARVALHO, M. A. M.; SILVA, E. A. Aspectos fisiológicos, anatômicos e ultra-estruturais do rizoma de *Costus arabicus* L.(Costaceae) sob condições de déficit hídrico. *Hoehnea*, v.39, n.1, 125-137, 2012.

DASGUPTA, B.; PANDEY, W. B. A new Indian source of diosgenin (*Costus speciosus*). *Experientia*, v.26, n.5, p.475-476, 1970.

DI STASI, L. C.; LIMA, H. C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª edição. UNES. 2002. 52p.

EDEOGA, H. O.; OKOLI, B. E. chromosome numbers of *Costus lucanusianus* (Costaceae) in Nigeria. *Folia Geobotanica*, v.35, p.315-318, 2000.

FERNANDES, L.; KARSBURG, I.V.; MELO, V.S.; GALLO, R.; Cariótipo e conteúdo de DNA nuclear de quatro espécies do gênero *Costus* L.: uma contribuição citotaxonomica e evolutiva. *Brazilian Journal of Development* v.6, p. 72196-72237, 2020.

FIRMO, W. D. C. A.; DE MENEZES, V. D. J. M.; DE CASTRO PASSOS, C. E., DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cadernos de pesquisa*, v.18, p.90-95, 2011.

GILL L.S. Chromosome numbers of angiosperms in Tanzania: II. *Adansonia*, v.18, p.19-24, 1978.

GUERRA, M. dos S. Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v.158, p.107-115, 1988.

JARDIM, A. B.; TORRES, D. S. C.; DE OLIVEIRA, R. P.; GIULIETTI, A. M. M. (2016). *Flora of Bahia: Costaceae*. SITIENTIBUS série Ciências Biológicas, 16, 2016.

KAY, K.M.; SCHEMSKE, D.W. Pollinator assemblages and visitation rates for 11 species of Neotropical *Costus* (Costaceae). *Biotropica*, v.35, p.198-207, 2003.

KIRCHOFF, B. K.; RUTISHAUSER, R. The phyllotaxy of *Costus* (Costaceae). *Botanical Gazette*, v.151, n.1, p.88-105, 1990.

KRESS, G. Linguistic processes in sociocultural practice. Oxford University Press; 2ª edição.1999. 101p.

LARSEN, K. *Costus dhaninivatii*, a new species from S.E. Thailand. Journal of Southeast Asian Studies. v.1, p.149-152, 1965.

LAVANIA, U. C. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genetic Resources. v.3, p.170–177, 2005.

LODH, D.; BASU, S. Karyomorphological analysis and cytotypic diversity in natural populations of *Costus speciosus* Koen. ex Retz. The Nucleus, v.56, n.3, p.155–162, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512p.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 1999. 720p.

MAAS, P. J. Costoideae (Zingiberaceae). Flora Neotropica, v.8, p.1-139, 1972.

MAAS, P. J. M.; MAAS, H. Costaceae. Flowering plants of the neotropics, 22-06, 2010.

MAAS, P.; H. MAAS. 2016. Costaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110631>; acesso em 09 Setembro de 2020.

MAAS, P.J. Two new species of *Costus* (Costaceae) from Costa Rica. Brittonia, v. 49, p.274-279, 1997.

MAAS, P.J.M. 1972. Costoideae (Zingiberaceae). Flora Neotropica, Monograph nº 8. Hafner, New York. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/4393675>. Acesso em: 25/08/2020.

MACEDO, W. A. Citogenotoxicidade e viabilidade polínica de espécies de *Costus* L. (Costaceae): uma contribuição para medicina popular, oncologia, melhoramento genético e educação. 2020. 102 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade do Estado de Mato Grosso. Alta Floresta, 2020.

MAHANTY H.K. A cytological study of the Zingiberales with special reference to their taxonomy. Cytologia, v.35, p.13-49, 1970.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C., DIAS, J. E. Plantas medicinais. Viçosa: UFV, 2003. 220p.

MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*. v. 264, n.5157, p. 421-424, 1994.

MENEZES, I. A. C.; CARVALHO, A. A.; ANTONIOLLI, A. A.; SANTOS, M. R. V. Cardiovascular effects and acute toxicity of the aqueous extract of *Costus spicatus* leaves (Zingiberaceae). *Biologia geral e experimental*, v.7, n.1, p.9-13, 2007.

MIEGE, J. Quatridme liste de nombres chromosomiques de plantes d'Afrique Occidentale. *Revue Cytologie et de Biologie Vegetales, le Botaniste*, v.24, p.149-164, 1962.

MUKHOPADHYAY, S.; SHARMA, A. K. Chromosome number and DNA content in callus culture of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. *Genetica*, v.80, n.2, p.109-114, 1990.

NEWSTROM, L. E.; G. W. FRANKIE; H. G. BAKER. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica*, v.26, p.141-159, 1994.

OLIVEIRA, C.C., CABRINI, D.A., SANTOS, E.P., MARQUES, M.C.A. & BUCHI, D.F. Canova medication and medicinal plants in south of Brazil. In: PRETORIUS, R. (ed). Trends and developments in ethnopharmacology. Research Signpost: Kerala, 2008. p.1-17.

OLIVEIRA, V.R.; SCAPIM, C.A.; OLIVEIRA JR., R.S.; PIRES, N.M. Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). *Revista Unimar*, v.18, p.537-544, 1996.

OTTO S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, v.34, p.401-37, 2000.

PASSOS, M. A. B. PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC) OCORRENTES EM RORAIMA. *Revista Eletrônica Científica Ensino Interdisciplinar*. v.5, n.14, p.388-404, 2019.

RAMACHANDRAN K. Chromosome numbers in Zingiberaceae. *Cytologia*, v.34, p.213-221, 1969.

RAVEN, P. H. The Bases of Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.62, n.3, p.724-764, 1975.

ROCHA, B. N. Propagação e Genotoxicidade de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). 2013. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013. 84 p.

SALZMAN, S.; DRISCOLL, H. E.; RENNER, T.; ANDRÉ, T.; SHEN, S.; SPECHT, C. D. Spiraling into history: A molecular phylogeny and investigation of biogeographic origins and floral evolution for the genus *Costus*. *Systematic Botany*, v.40, n.1, p.1004-115, 2015.

SCHEMSKE, D. W. Breeding system and habitat effects on fitness components in three neotropical *Costus* (Zingiberaceae). *Evolution*, v.37, n.3, p.523-539, 1983.

SCHEMSKE, D.W. Floral convergence and pollinator sharing in two bee-pollinated tropical herbs. *Ecology*, v.62, n.4, p.946-954, 1981.

SILVEIRA, T. T. S; RIEDER, A. Bioatividade do extrato foliar de cana-do-brejo (*Costus spiralis* (JACQ.) Roscoe) em *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797). 2ªed. jur. Cien – Cáceres: UNEMAT, 2009.

SIMMONDS, N.W. Chromosome behaviour in some tropical plants. *Hereditas*, v.8, p.139-146, 1953.

SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. Flowering plants of the neotropics. Princeton University Press, 2004.

SOUZA, V.C. LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008.

SPECHT, C. D.; KRESS, W. J.; STEVENSON, D. W.; DESALLE, R. A molecular phylogeny of Costaceae (Zingiberales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.21, n.3, p.333-345, 2001.

SPECHT, C. D.; STEVENSON, D. W. A new phylogenybased generic classification of Costaceae (Zingiberales). *Taxon*, v.55, n.1, p.153-163, 2006.

STEVENSON, D.W.M.; STEVENSON, J.W. Costaceae (*Costus* Family). In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.M.; HEALD, S.V. (ed). Flowering Plants of The Neotropics. Princeton: Princeton University Press, 2004. p.429-431.

STILES, F. G. Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.68, n.2, p.323-351, 1981.

SUBRAHMANYAM G.V.; KHOSHOO T.N. Cytological studies in the genus *Costus L.* *Cytologia*, v.51, p.737-748, 1986.

TINTINO, S. R.; GUEDES, G. M. M.; DA CUNHA, F. A. B.; DOS SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; DA COSTA, J. G. M. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana e moduladora dos extratos etanólico e hexânico de bulbo de *Costus arabicus*. *Bioscience Journal*, v.29, n.3, p.732-738, 2013.

TOMLINSON, P. B. Phylogeny of the Scitamineae - Morphological and anatomical considerations. *Evolution*, v.16, n.2, p.192-213, 1962.

TRESVENZOL, L. M.; PAULA, J. R.; RICARDO, A. F.; FERREIRA, H. D.; ZATTA, D. T. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, vol.3, n.2, 22-28, 2006.

TYAGI, B. R. The Mechanism of $2n$ Pollen Formation in Diploids of *Costus speciosus* (Koenig) J. E. Smith and Role of Sexual Polyploidization in the Origin of Intraspecific Chromosomal Races. *Cytologia*, v.53, p.763-770, 1988.

VENKATASUBBAN K.R. A preliminary survey of chromosome numbers in *Scitamineae* of Bentham and Hooker. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, v.23, p.281-300, 1946.

VOVIDES, A. P.; LASCURAIN, M. Números cromosômicos de cuatro especies de *Costus* (Costaceae), una de *Calathea*, una de *Maranta* y una de *Stromanthe* (Marantaceae). *Acta Botánica Mexicana*, vol.33, p.81-86, 1995.

VOVIDES, A.P. Flora de Veracruz: Costaceae. Xalapa: Instituto de Ecología, A.C., v.78, 1994. 16p.

Capítulo 12

ESTUDOS FILOGEOGRÁFICOS UTILIZANDO DADOS DE GBS

Francine Alves Nogueira de Almeida
Pedro Henrique Dias dos Santos

1. FILOGEOGRAFIA

Segundo John C. Avise (2000), a filogeografia pode ser definida como uma ciência onde o objetivo é compreender os princípios e processos que governam as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies muito próximas entre si (Figura 1). Esta ciência se baseia no estudo genealógico de população e genes, que revelam como o padrão da distribuição presente tem sido moldado por eventos geológicos, históricos e climáticos (HUANG et al., 2004).

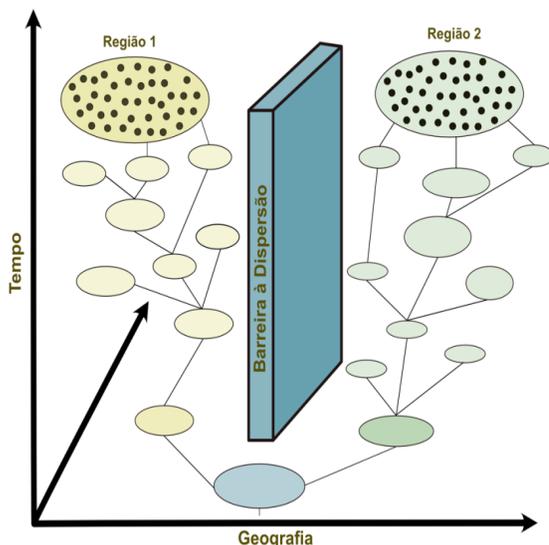


Figura 1 – Eventos que compõem a filogeografia. Genealogias dos genes de interesse são mapeadas no espaço e no tempo. Adaptado de Avise (2000).

A filogeografia, como ciência propriamente dita, se inicia em 1987, mas o desenvolvimento intelectual da disciplina teve impulso e notoriedade no início deste século, impulsionados pelo estudo de dinâmica populacional da rotatividade de sobrenomes nas sociedades humanas (LOTKA, 1931). Os lados estatísticos e matemáticos da filogeografia se desenvolveram nos últimos anos até chegar no que agora é denominado teoria da coalescência (KINGMAN, 1982), que aborda a maneira de como variantes genéticas amostradas em uma população podem ter se originado de um ancestral comum.

No caso mais simples, a teoria da coalescência não assume nenhuma recombinação, nenhuma seleção natural e nenhum fluxo gênico ou estrutura populacional, o que significa que cada variante tem a mesma probabilidade de ter sido passada de uma geração para a seguinte (SIGWART, 2009). O modelo olha para trás no tempo, fundindo alelos em uma única cópia ancestral de acordo com um processo aleatório em eventos de coalescência. Sob este modelo, o tempo esperado entre eventos sucessivos de coalescência aumenta quase exponencialmente no tempo (com ampla variação). A variação no modelo vem tanto da passagem aleatória de alelos de uma geração para a próxima, quanto da ocorrência aleatória de mutações nesses alelos (SIGWART, 2009; WAKELEY, 2000).

Podemos simplificar a teoria da coalescência em um método matemático para estudar a história evolutiva/ancestral (árvore genealógica) de indivíduos, genes ou sequências de DNA coletados de uma população maior. A teoria da coalescência é tão importante para os estudos filogenéticos e filogeográficos que podemos dizer que ela é para os geneticistas o mesmo que a distribuição normal é para os estatísticos.

Análises filogeográficas foram motivadas principalmente por estudos genéticos moleculares de DNA mitocondrial animal (mtDNA) (AVISE et al., 1987). Como essa molécula evolui rapidamente e é maternalmente herdada sem recombinação, ela fornece uma crônica das relações matrilineares dentro e entre as espécies relacionadas. Assim, as análises filogenéticas de variantes do mtDNA podem ser usadas para estimar o extenso componente matrilinear de uma linhagem de um organismo da mesma forma que os sobrenomes de famílias em muitas sociedades humanas tradicionalmente registram histórias patrilineares conforme o trabalho de Kingman (KINGMAN, 1982). Ao contrário dos sobrenomes, no

entanto, os arquivos genéticos mitocondriais se estendem muito mais no passado e, em princípio, podem ser recuperados de quase todas as espécies animais multicelulares. Por razões óbvias, estudos comparativos em plantas, frequentemente focam em outro genoma citoplasmático, DNA cloroplastidial (cpDNA), ao invés do mtDNA (ARBOGAST, 2001; AVISE, 2000, 2013). Os estudos comparativos em filogeografia molecular compartilham alguns pontos em comum (Figura 2) que seguem geralmente o mesmo padrão e se conectam, gerando inferências e questionamentos sobre a história evolutiva e a dispersão dos organismos em estudo. Além disso, os padrões filogeográficos moleculares também são altamente relevantes para a biologia da conservação e para a compreensão dos processos de especiação (AVISE, 2000, 2013). Deve se atentar que cada gene escolhido terá um padrão evolutivo diferente, o que nos leva a inicialmente avaliá-los individualmente para definição dos padrões das taxas de evolução, evitando que uma se sobreponha à outra.

Estudos Comparativos em Filogeografia molecular

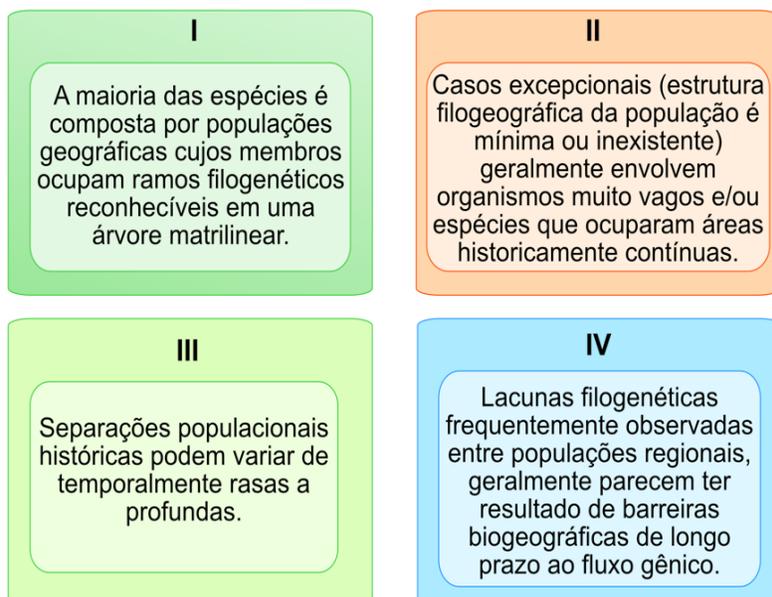


Figura 2 – Estudos comparativos de filogeografia e seus pontos comum.

A filogeografia vem contribuindo com estudos evolutivos de diversas maneiras, revelando assim a sua multidisciplinariedade e seu grande poder analítico para diversos questionamentos científicos. Dentre estas contribuições, podemos destacar: (I) enfatizar os aspectos históricos e de não-equilíbrio da mudança microevolutiva, (II) esclarecer as conexões estreitas entre demografia populacional e genealogia e (III) construir pontes empíricas e conceituais entre genética populacional e filogenética (AVISE, 2013).

2. GBS + FILOGEOGRAFIA

A utilização de dados de sequenciamento de última geração apresenta-se cada vez mais acessível para abordar questões filogenéticas e biossistemáticas. As abordagens para gerar esses conjuntos de dados (MCCORMACK et al., 2013) variam em custo em termos das variáveis adicionadas ao processo de desenvolvimento do estudo como tempo e dinheiro, conhecimento genômico existente, tempo evolutivo aplicável e, portanto, escala taxonômica, e a qualidade e cobertura de amostra dos dados (ANDERSON et al., 2017). Nem sempre está claro qual abordagem será mais eficiente e eficaz para compreender e direcionar uma determinada hipótese a ser levantada em uma pesquisa.

A genotipagem por sequenciamento (Genotyping-by-sequencing GBS) é um método que quando bem empregado pode gerar informações extremamente ricas e de baixo custo para obtenção de dados de variabilidade do genoma de populações compostas por um grande número de indivíduos (CROSSA et al., 2013; MORRIS et al., 2013; SOTO et al., 2015). Essa abordagem permite que regiões específicas do genoma sejam sequenciadas, a partir do uso de enzimas de restrição, sondas ou pelo sequenciamento do transcriptoma (DAVEY et al., 2011). Possibilitando assim, a investigação de loci que foram sujeitos à seleção e evolução adaptativa, os quais podem identificar diferenciação significativa entre populações com base em fluxo gênico ou deriva (PARCHMAN et al., 2013).

O protocolo padrão de GBS inicia-se com uma digestão do DNA com uma ou mais enzimas de restrição, visando reduzir a complexidade do genoma (tamanho, regiões em tandem etc) a ser sequenciado, com consequente aumento da profundidade de reads sequenciadas por locus (BENTLEY et al., 2008) (Figura 3).

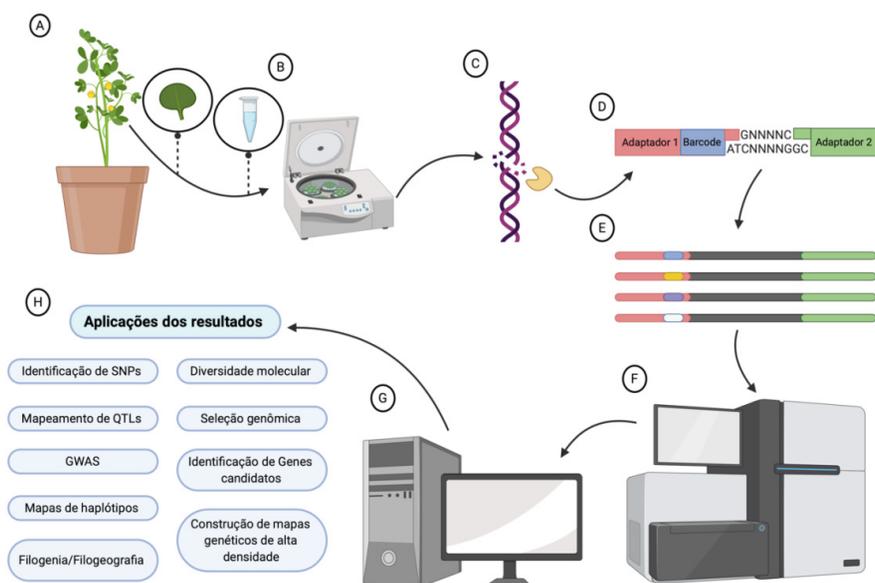


Figura 3 – Etapas simplificadas do protocolo de *Genotyping-by-sequencing* (GBS) em plantas. (A): o tecido da planta é obtido; (B): tecidos foliares para isolamento do DNA, quantificação de DNA; (C): digestão de DNA com enzimas de restrição; (D): ligações de adaptadores incluindo uma região de *barcode* no adaptador 1 em fragmentos de DNA aleatórios restritos a enzima de corte; (E): representação de diferentes fragmentos de DNA amplificados com diferentes *barcodes* de diferentes amostras (fragmentos representam a biblioteca GBS); (F): análise de seqüências da biblioteca em um sequenciador NGS; (G): análise de bioinformática dos dados de sequenciamento NGS; (H): possíveis aplicações dos resultados. Adaptado de He et al. 2014. Criado com BioRender.com.

Este tipo de sequenciamento vem sendo adotado por muitos pesquisadores que não possuem o equipamento ou protocolos para a preparação e sequenciamento de bibliotecas personalizadas, tornando-o relativamente acessível por estar disponível em prestadores de serviços comerciais. Ele pode ser usado para espécies não modelo ou em combinação com uma referência genômica (ALCAIDE et al., 2014; HE et al., 2014).

A análise de genomas obtidos por GBS apresentam alguns desafios em bioinformática. Dados brutos de GBS (frequentemente leituras Illumina HiSeq

single end de 100 bp) foram comumente montados usando o pipeline UNEAK (LU et al., 2013), outros estudos usaram outras abordagens com Stacks (CATCHEN et al., 2011; SEDEEK et al., 2014). Como os adaptadores de GBS não são específicos a qual extremidade de um fragmento de DNA eles se ligam, o que pode ocorrer é a duplicação de leitura e a montagem precisa estar atenta a este detalhe para gerar dados robustos e com informações coerentes. Valores de parâmetros apropriados para programas de montagem também precisam ser explorados e definidos para que se tenha uma direção a se tomar (ANDERSON et al., 2017; MASTRETTA-YANES et al., 2015) defendendo uma exploração que objetive maximizar os loci recuperados, minimizando as taxas de erro e distâncias genéticas intrapopulacionais. Com o conjunto de dados montado, a próxima etapa é identificar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em métodos de agrupamento/atribuição ou estatística básica (ALCAIDE et al., 2014; ANDERSON et al., 2017; BALDASSARRE et al., 2014; WHITE et al., 2013b).

Ainda com este conjunto de dados, é possível incluir uma abordagem coalescente e/ou um concatenar loci inteiros para inferência filogenética (ESCUADERO et al., 2014; GOHLI et al., 2015). Um desafio no momento da análise é lidar com a alta proporção de dados perdidos causados por sequenciamento de baixa cobertura. Em relação a outras abordagens como restriction site-associated DNA (RAD), o GBS provavelmente apresentará uma quantidade de dados perdidos devido a frequência de sequenciamento de baixa cobertura e ao abandono de alelos (allele dropout), uma vez que para os fragmentos serem compartilhados, eles precisam reter dois locais de restrição em vez de apenas um. Ainda não há uma maneira ideal para extrair informações filogenéticas desses conjuntos de dados. Algumas abordagens de reconstrução de árvores foram propostas (LIU; YU; EDWARDS, 2010; MIRARAB; WARNOW, 2015; VACHASPATI; WARNOW, 2015) e se baseiam em utilizar árvores de genes em vez de alinhamentos de sequência como entrada, porém, estas abordagens não foram aplicadas a conjuntos de como os de GBS, provavelmente porque essas abordagens requerem uma árvore de genes de cada locus e os loci recuperados dos sequenciamentos GBS e RAD tendem a ser curtos (ANDERSON et al., 2017; LEACHÉ et al., 2015).

Algumas metodologias foram desenvolvidas para justamente compreender esse questionamento. Anderson et al. (2017) reportaram que a montagem de dados

GBS e análises destes dados melhoram a resolução e relações filogenéticas no complexo *Triodia basedowii* em comparação com um estudo anterior baseado no sequenciamento Sanger das regiões gênicas (ITS, ETS e *rps16-trnK*).

3. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECAS GBS

Atualmente, existem duas estratégias principais para o GBS: realizar um sequenciamento do genoma completo, o que pode ter um custo relativamente alto, mesmo com os preços de sequenciamento se tornando cada vez mais acessíveis, ou reduzir a apresentação do genoma por meio de enriquecimento direcionado ou digestão enzimática antes do sequenciamento (ELSHIRE et al., 2011; ROWAN et al., 2017). Com a digestão enzimática, é mais provável que o mesmo protocolo possa ser facilmente aplicado em diferentes espécies, enquanto as estratégias de enriquecimento direcionadas são mais caras e menos flexíveis (ROWAN et al., 2017).

A redução da complexidade permite a análise de pequenas regiões buscando informações de diversidade e variação (POLAND et al., 2012). Para a redução da complexidade do genoma utiliza-se enzimas de restrição sensíveis a metilação, que podem variar de acordo com a espécie e são escolhidas levando em consideração o tamanho do genoma e a quantidade de sequências repetitivas (ELSHIRE et al., 2011). Após a digestão as extremidades do DNA ficam coesivas e liberadas para possibilitar a ligação dos adaptadores (ELSHIRE et al., 2011; POLAND et al., 2012).

Existem vários métodos para preparação de bibliotecas para genotipagem por sequenciamento, com pequenas alterações entre eles, como o número de enzima de restrição utilizada (ELSHIRE et al., 2011; MONSON-MILLER et al., 2012; PETERSON et al., 2012; POLAND et al., 2012; ROWAN et al., 2017; WALLACE; MITCHELL, 2017). Um ponto importante antes de se preparar a biblioteca é a normalização do DNA, é fundamental que o DNA esteja íntegro. A normalização do DNA têm início ao garantir que todas as amostras utilizadas estejam na mesma concentração, garantindo que a quantidade de dados gerados seja a mesma para cada uma.

O fluxo de trabalho básico para preparação da biblioteca GBS baseia-se na

digestão do DNA genômico com enzima de restrição, o produto da digestão de cada amostra é então ligado a um adaptador com código de barras (barcodes) e um adaptador específicos da tecnologia a ser utilizada para o sequenciamento. Os fragmentos de cada amostra são então reunidos em um único pool para cada espécie. Em seguida é realizados amplificado por PCR, para o enriquecimento dos fragmentos no pool. Após essa etapa as bibliotecas podem ser validadas e quantificadas para serem submetidas ao sequenciamento (ELSHIRE et al., 2011; PETERSON et al., 2012; POLAND et al., 2012) (Figura 4).

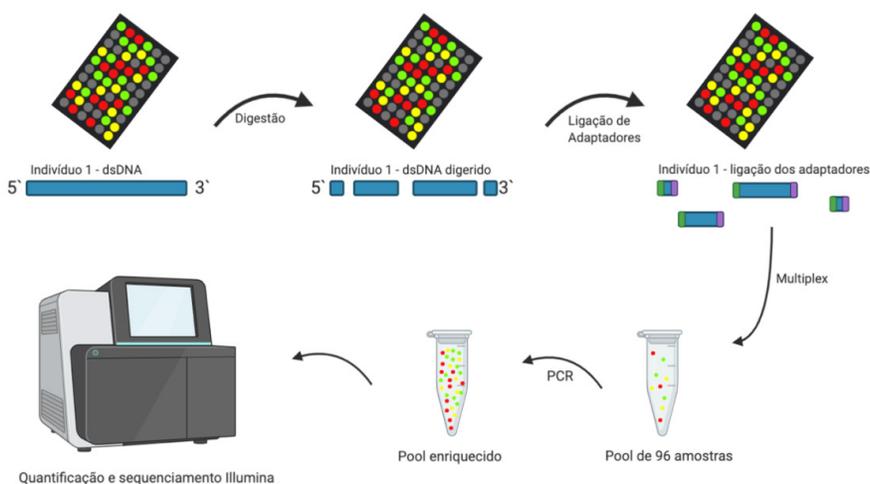


Figura 4: Esquema representando a metodologia de preparação de bibliotecas GBS de (POLAND et al., 2012). Criado com BioRender.com.

4. APLICAÇÃO DE GBS UTILIZANDO ABORDAGENS EVOLUTIVAS

Vários estudos demonstram a utilidade do GBS, em diferentes organismos, para estudos genômicos de estrutura populacional e filogeográficos (CATCHEN et al., 2013; HESS et al., 2013; HODEL et al., 2017; KÜPPER et al., 2018) (Tabela 1). Esses estudos descrevem a relevância do uso da genotipagem por sequenciamento e apresentam alguns desafios que o método ainda enfrenta.

Tabela 1: Artigos utilizando a abordagem de genotipagem por sequenciamento (GBS) para estudos genômicos de estrutura populacional, filogenéticos, diversidade e filogeográficos.

Organismo	Método	Loci/ SNP analisados	Amostras	Objetivo	Referência
<i>Populus tremuloides</i>	GBS (ELSHIRE et al., 2011)	34.796 SNP	189 indivíduos	Estrutura populacional	BAGLEY et al. (2020)
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	RAD-seq (BAIRD et al., 2008)	25.679 loci	9pop. 578ind.	Filogeografia	CATCHEN et al. (2013)
<i>Clupea harengus</i>	RAD-seq (BAIRD et al., 2008)	5.985 loci	2pop.	Diferenciação populacional	CORANDER et al. (2013)
<i>Haliotis rufescens</i>	Sequenciamento de transcriptoma	21.579 loci	3pop. 39ind.	Estrutura populacional	DE WIT & PALUMBI (2013)
<i>Entosphenus tridentatus</i>	RAD-seq (BAIRD et al., 2008)	4.439 loci	21pop. 518ind	Filogeografia	HESS et al. (2013)
<i>Rhizophora mangle</i>	RAD-seq (PETERSON et al., 2012)	25.198 loci	12pop. 96ind	Filogeografia	HODEL et al. (2017)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>S. paradoxu</i>	RAD-seq (BAIRD et al., 2008) ⁱ	5.425(S.c.); 9.809(S.p.) loci	8pop. 77ind.	Estrutura populacional	HYMA & FAY (2013)
<i>Xiphophorus spp.</i>	RAD-seq (PETERSON et al., 2012)	149.362 loci	26 espécies. 139ind.	Reconstrução filogenética	JONES et al. (2013)

(continua)

Tabela 1: Artigos utilizando a abordagem de genotipagem por sequenciamento (GBS) para estudos genômicos de estrutura populacional, filogenéticos, diversidade e filogeográficos. (conclusão)

Organismo	Método	Loci/ SNP analisados	Amostras	Objetivo	Referência
<i>Pundamilia spp. e Mbipia spp.</i>	RAD-seq (BAIRD et al., 2008) ⁱ	10.663 loci	5 espécies. 50ind.	Estrutura populacional	KELLER et al. (2013)
<i>Amaranthus palmeri</i>	RAD-seq (ELSHIRE et al., 2011) ⁱ	1.351 SNP	8 pop.	Estrutura populacional	KUPPER et al. (2018)
<i>Molossus</i>	GBS (Elshire et al., 2011)	55.350 SNP	189 espécimes	Filogenia	LOUREIRO et al., (2020)
<i>C. caudicinctus e Litoria spp.</i>	DArTseq	28960(<i>C.c.</i>); 48117(<i>L. spp</i>) SNPs	2 espécies. 180ind.	Filogeografia	(MELVILLE et al., 2017)
<i>Acipenser spp.</i>	RAD-seq (BAIRD et al., 2008) ⁱ	48.731 loci	4espécies	Estrutura populacional	OGDEN et al. (2013)
<i>Nematostella vectensis</i>	RAD-seq (BAIRD et al., 2008)	4.065 loci	4pop. 30ind.	Filogeografia	REITZEL ET AL. (2013)
<i>Senecio spp</i>	RAD-seq	29.307 loci	29pop.	Reconstrução filogenética	RODA et al. (2013)
<i>Myodes glareolus</i>	GBS (PETERSON et al., 2012)	5979 loci	14pop. 281ind	Diversidade genética	WHITE et al., (2013)

Fonte: Narum et al. (2013).

Nota: Adaptado pelo autor. Abreviação pop. para população. Abreviação ind. para indivíduos.

Küpper et al. (2018) utilizaram GBS para estudar a estrutura populacional da palmeira Amarantho (*Amaranthus palmeri*) relacionada a resistência de glifosato. Em outro estudo (HYMA; FAY, 2013) investigaram a diferenciação de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. paradoxus* em vinhedos devido ao fluxo gênico que ocorre onde se encontram. Keller et al. (2013) utilizaram SNPs oriundos de GBS para investigar a adaptação divergente de cinco espécies de peixes de dois gêneros, *Mbipi* e *Pundamilia*. Evidenciando a relevância da GBS utilizando SNPs, em relação a estudos anteriores com marcadores AFLP e microssatélites (SSR) (MAGALHAES et al., 2012; SEEHAUSEN et al., 2008), ao identificar como geneticamente distintos e atribuir os indivíduos corretamente aos cinco grupos em estudo, o que não foi possível antes (KELLER et al., 2013).

Em estudo com anêmona-do-mar (*Nematostella vectensis*), Reitzel et al. (2013) descreveram que a utilização de SNPs resultou em uma filogeografia altamente resolvida, melhor que anteriormente obtida por marcadores tradicionais (microssatélites e AFLPs). No trabalho de Hodel et al. (2017) demonstraram que SNPs oriundos de RAD-seq foram significativas para o cenário filogeográfico em estudo, ao contrário dos microssatélites para a espécie mangue vermelho (*Rhizophora mangle*). Anteriormente os SNPs só eram identificados em regiões de codificação, que certamente são importantes na evolução adaptativa, mas não identificavam SNPs em regiões não codificantes que também são de importância funcional (HODEL et al., 2017; RAFALSKI, 2002; REITZEL et al., 2013). Microssatélites fornecem muito mais informações, até uma ordem de magnitude a mais, por marcador do que SNPs (COATES et al., 2009; LIU et al., 2005). No entanto, os estudos de SNP normalmente usam marcadores de várias ordens de magnitude a mais do que um estudo SSR (HODEL et al., 2017). Evidências mostram que o grande número de loci em estudos de SNP pode efetivamente permitir inferências mais poderosas, mesmo que a informação em cada locus seja menor do que em marcadores microssatélites (SCHOPEN et al., 2008).

Ao estudar a estrutura populacional de nove populações de *Gasterosteus aculeatus* por SNPs oriundos de RAD-seq Catchen et al. (2013) encontraram níveis elevados de diversidade genética. A densidade de loci que pode ser analisada via RAD-seq é abundante, possibilitando descobrir regiões genômicas de estrutura populacional aumentada provenientes de processos evolutivos (NOSIL; FEDER,

2012). Entretanto, outros estudos relatam que muitos loci que mostram evidências de divergência adaptativa podem ser perdidos utilizando RAD-seq (HODEL et al., 2017; REITZEL et al., 2013). Devido ao fato de muitos loci estarem associados uns aos outros, e o sítio de restrição da enzima não se encontrar próximo. Além de que a profundidade de leitura pode não ser suficiente para esse locus ser genotipado em vários indivíduos por espécie (HODEL et al., 2017; KELLER et al., 2013; NARUM et al., 2013; REITZEL et al., 2013).

Reitzel et al. (2013) reportou que o número de marcadores RAD observado foi menor do que o esperado, assim como no trabalho de Hodel et al. (2017). Um dos problemas ao usar o RAD-Seq é que a baixa cobertura e as altas proporções de dados ausentes podem dificultar a inferência precisa de heterozigotos, mas vários estudos mostram que isso não influencia na inferência filogeográfica (HODEL et al., 2017; KELLER et al., 2013; REITZEL et al., 2013). Essa perda de dados está atribuída a presença de elementos repetitivos no genoma e regiões genômicas recentemente duplicadas, as quais são responsáveis por múltiplos alinhamentos ao genoma referência. Especificamente, os marcadores RAD de regiões repetitivas não podem ser adequadamente contabilizados com as metodologias atuais. Uma forma de minimizar essa perda seria aumentar os comprimentos de leitura.

Os estudos citados trabalham com espécies não-modelos, geralmente sem genoma referência disponível. Esta é uma outra vantagem do método de GBS, pois permite a identificação de SNPs sem a necessidade de um genoma referência. Nesse caso as próprias reads geradas são utilizadas para montar uma sequência mais completa do DNA e utilizadas posteriormente para serem mapeadas e identificar os SNPs. Reitzel et al. (2013) comparando o resultado da identificação de SNPs quando as reads eram montadas com genoma referência e sem, reportou que apesar das diferenças no número de loci e SNP os resultados das inferências demográficas foram geralmente idênticos.

A técnica de GBS tornou-se uma abordagem altamente confiável para identificar SNPs inter e intra-populacional, embora seja necessário avanços para aplicá-la para espécies poliploides, devido a suas várias cópias de alelos diferentes (NARUM et al., 2013). Embora SNPs tenham apenas quatro estados alélicos possíveis e uma baixa taxa de mutação, eles têm vantagens claras para acomodar diversas suposições de ligação ou independência de marcadores, modelos de

mudança evolutiva e potencial para papéis na evolução funcional. Além disso, os SNPs podem ser facilmente comparados entre os genomas (nuclear, mitocondrial, cloroplasto) para utilizar as escalas mutacionais subjacentes para caracterizar os processos evolutivos (PETIT et al., 2005).

Após a identificação dos SNPs uma etapa importante é a realização da filtragem desses dados, removendo loci com genótipos ausentes (dados perdidos). Essa etapa é um outro desafio da técnica em questão, pois para realizar esse processo não há critérios estabelecidos para todas as espécies e métodos, sendo necessário uma avaliação individual para cada estudo (NARUM et al., 2013).

Muitos problemas dos problemas apresentados pela técnica de GBS são resolvidos por várias etapas de PCR para uniformizar a cobertura de loci e por melhorias no software ao processar loci, mas permanecem as preocupações de que os métodos de representação reduzida baseados em enzima de restrição não capturam um instantâneo representativo do genoma (LOWRY et al., 2017). Uma outra preocupação com os loci RAD-seq é que a curadoria manual de dados é impossível e os erros podem passar despercebidos até pelos pesquisadores mais cuidadosos (GAUTIER et al., 2013; XU et al., 2014).

A utilização de dados obtidos de sequenciamento GBS é uma poderosa ferramenta para aumentar o sinal e a resolução filogenética/filogeográfica, principalmente de árvores de espécies crípticas e complexo de espécies. Apesar de demandar maior conhecimento em montagem de genomas e ferramentas de bioinformática não tão triviais como as utilizadas para o sequenciamento sanger, abordagens filogenéticas/filogeográficas com dados de GBS podem não só confirmar padrões já relatados em Sanger (hibridização entre espécies, taxa de evolução, relações entre espécies mal resolvidas etc), mas como resolver questionamentos ainda antes não compreendidos por falta de robustez ou sinal filogenético dos dados, como por exemplo, questões evolutivas em uma escala macroevolutiva quando a distância genética entre clados fenotipicamente identificáveis é baixa.

GLOSSÁRIO

Biossistemáticas: Relacionado ao estudo da biodiversidade e suas origens

Cobertura: A cobertura é um parâmetro matemático que indica quantos nucleotídeos

em média foram sequenciados em cada posição no genoma.

cpDNA: DNA situado nos cloroplastos

DArT (Diversity arrays technology)

DNA (desoxyribonucleic acid): Ácido desoxiribonucleico

Enzima de restrição: enzimas com função de clivagem (corte) do DNA em pontos específicos, em reconhecimento de determinadas sequências de nucleotídeos

Eventos de coalescência: Eventos que atuam para fortalecer a coalescência como ausência de fluxo de genética aleatória ou deriva genética de alelos

GBS (Genotyping by sequencing): Genotipagem por Sequenciamento

Inferências: Processo de derivar hipóteses de relações de parentesco a partir de métodos que possuam premissas assumidas como verdadeiras

Linhagens genealógicas: Sucessão de gerações evolutivas

Locus: é uma posição fixa e específica em um cromossomo, onde está localizado determinado gene ou marcador genético

Loci: plural de locus

mtDNA: DNA situado nas mitocôndrias

NGS (Next generation Sequencing): Sequenciamento de nova geração

PCR (Polymerase Chain Reaction): Reação em cadeia da polimerase

Profundidade: A profundidade do sequenciamento refere-se ao número de vezes que uma base é representada dentro de um conjunto de leituras geradas.

RAD-seq (Restriction-site associated DNA sequencing): Sequenciamento de fragmentos de DNA associados a sítios de restrição

Reads: sequências de nucleotídeos geradas a partir de um sequenciamento de NGS

Relações matrilineares: classificação ou organização de um povo, grupo populacional, família, clã ou linhagem em que a descendência é contada em linha materna.

SNPs (Single Nucleotide Polymorphism): Polimorfismo de nucleotídeo único

SSR (Simple Sequence Repeats): Sequências simples repetidas Teoria da coalescência: método matemático oriundo da genética de populações que permite a inferência da história demográfica da espécie, baseando-se em um ponto no tempo onde linhagens ou alelos possuem um ancestral comum no passado

Variantes Genéticas: Diferenças comuns nos genes

5. REFERÊNCIAS

ALCAIDE, M.; SCORDATO, E. S. C.; PRINCE, T.D.; IRWIN, D. E. Genomic divergence in a ring species complex. *Nature*, v. 511, p. 83-88, jul,2014.

ANDERSON, B. M.; THIELE, K.R.; KRAUSS, S. L.; BARRETT, M. D. Genotyping-by-Sequencing in a Species Complex of Australian Hummock Grasses (*Triodia*): Methodological Insights and Phylogenetic Resolution. *PLOS ONE*, v. 12, n. 1, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171053>, jan. 2017.

ARBOGAST, B. S. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. 2001. 134-135p

AVISE, J. C. ARNOLD, J., Ball, R.M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J.E., REEB, C.A., Saunders, N.C. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, doi: 10.1146/annurev.es.18.110187.002421, 1987.

AVISE, J. C. *Phylogeography : the history and formation of species*. Harvard University Press, 2000. 447p.

AVISE, J. C. *Phylogeography*. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. 2013.

BAGLEY, J. C. HEMING, N.M., GUTIÉRREZ, E.E., DEVISETTY, U.K., MOCK, K.E., ECKERT, A.J., STRAUSS, S.H. Genotyping-by-sequencing and ecological niche modeling illuminate phylogeography, admixture, and Pleistocene range dynamics in quaking aspen (*Populus tremuloides*). *Ecology and Evolution*, v. 10, n. 11, p. 4609–4629, 2020.

BAIRD, N. A. ETTER, P.D., ATWOOD, T.S., CURREY, M.C., SHIVER, A.L., LEWIS, Z.A., SELKER, E.U., CRESKO, W.A., JOHNSON, E.A. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, v. 3, n. 10, p. 1–7, 2008.

BALDASSARRE, D. T. WHITE, T.A., KARUBIAN, J., WEBSTER, M.S. Genomic and morphological analysis of a semipermeable avian hybrid zone suggests asymmetrical introgression of a sexual signal. *Evolution*, 2014. doi: 10.1111/evo.12457

BENTLEY, D. R. BALASUBRAMANIAN, S., SWERDLOW, H.P., SMITH, G.P., MILTON, J., BROWN, C.G., SMITH, A.J., et al. Accurate whole human

genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, v. 456, n. 7218, p. 53–59, nov. 2008.

CATCHEN, J. BASSHAM, S., WILSON, T., CURREY, M., O'BRIEN, C., YEATES, Q., CRESKO, W.A. Oregon threespine stickleback determined using RAD-seq. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2864–2883, 2013.

CATCHEN, J. M. AMORES, A., HOHENLOHE, P., CRESKO, W., POSTLETHWAIT, J.H. Stacks: Building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2011.

COATES, B. S. B.S., SUMERFORD, D. V., MILLER, N.J., KIM, K.S., SAPPINGTON, T.W., SIEGFRIED, B.D., LEWIS, L.C. Comparative performance of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for population genetic analysis. *Journal of Heredity*, v. 100, n. 5, p. 556–564, 2009.

CORANDER, J. MAJANDER, K.K., CHENG, L., MERILÄ, J. High degree of cryptic population differentiation in the Baltic Sea herring *Clupea harengus*. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2931–2940, 2013.

CROSSA, J. BEYENE, Y., SEMAGN, K., PÉREZ, P., HICKEY, J.M., CHEN, C., CAMPOS, G. DE L., BURGUEÑO, J., WINDHAUSEN, V.S., BUCKLER, E., JANNINK, J.L., CRUZ, M.A.L., BABU, R. Genomic prediction in maize breeding populations with genotyping-by-sequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2013.

DAVEY, J. W. HOHENLOHE, P.A., ETTER, P.D., BOONE, J.Q., CATCHEN, J.M., BLAXTER, M.L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, v. 12, n. 7, p. 499–510, 17 jul. 2011.

DE WIT, P.; PALUMBI, S. R. Transcriptome-wide polymorphisms of red abalone (*Haliotis rufescens*) reveal patterns of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2884–2897, 2013.

ELSHIRE, R. J. et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, 2011.

ESCUADERO, M. EATON, D.A.R., HAHN, M., HIPPI, A.L. Genotyping-by-sequencing as a tool to infer phylogeny and ancestral hybridization: A case study in *Carex* (Cyperaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2014.

GAUTIER, M. GHARBI, K., CEZARD, T., FOUCAUD, J., KERDELHUÉ, C., PUDLO, P., CORNUET, J.M., ESTOUP, A. The effect of RAD allele dropout on the estimation of genetic variation within and between populations. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 3165–3178, 2013.

GOHLI, J. Leder, E.H., Garcia-del-Rey, E., Johannessen, L.E., Johnsen, A., Laskemoen, T., Popp, M., Lifjeld, J.T. The evolutionary history of Afrocanarian blue tits inferred from genomewide SNPs. *Molecular Ecology*, v. 24, n. 1, p. 180–191, jan. 2015.

HE, J. ZHAO, X., LAROCHE, A., LU, Z.X., LIU, H.K., LI, Z. Genotyping-by-sequencing (GBS), An ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding *Frontiers in Plant Science*, 2014.

HESS, J. E. CAMPBELL, N.R., CLOSE, D.A., DOCKER, M.F., NARUM, S.R. Population genomics of Pacific lamprey: Adaptive variation in a highly dispersive species. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2898–2916, 2013.

HODEL, R. G. J. CHEN, S., PAYTON, A.C., MCDANIEL, S.F., SOLTIS, P., SOLTIS, D.E. Adding loci improves phylogeographic resolution in red mangroves despite increased missing data: Comparing microsatellites and RAD-Seq and investigating loci filtering. *Scientific Reports*, 2017.

HUANG, S. F. HWANG, S.Y., WANG, J.C., LIN, T.P. Phylogeography of *Trochodendron aralioides* (Trochodendraceae) in Taiwan and its adjacent areas. *Journal of Biogeography*, v. 31, n. 8, p. 1251–1259, 2004.

HYMA, K. E.; FAY, J. C. Mixing of vineyard and oak-tree ecotypes of *Saccharomyces cerevisiae* in North American vineyards. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2917–2930, jun. 2013.

JONES, J. C. FAN, S., FRANCHINI, P., SCHARTL, M., MEYER, A. The evolutionary history of *Xiphophorus* fish and their sexually selected sword: A genome-wide approach using restriction site-associated DNA sequencing. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2986–3001, 2013.

KELLER, I. WAGNER, C.E., GREUTER, L., MWAIKO, S., SELZ, O.M., SIVASUNDAR, A., WITTEW, S., SEEHAUSEN, O. Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria cichlid fishes. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2848–2863, 2013.

KINGMAN, J. F. C. On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability*, 1982. doi: 10.2307/3213548

KÜPPER, A. MANMATHAN, H.K., GIACOMINI, D., PATTERSON, E.L., MCCLOSKEY, W.B., GAINES, T.A. Population genetic structure in glyphosate-resistant and -susceptible palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) populations using genotyping-by-sequencing (GBS). *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. January, p. 1–14, 2018.

LEACHÉ, A. D., CHAVEZ, A.S., JONES, L.N., GRUMMER, J.A., GOTTSCHO, A.D., LINKEM, C.W. Phylogenomics of phrynosomatid lizards: Conflicting signals from sequence capture versus restriction site associated DNA sequencing. *Genome Biology and Evolution*, 2015.

LIU, L.; YU, L.; EDWARDS, S. V. A maximum pseudo-likelihood approach for estimating species trees under the coalescent model. *BMC Evolutionary Biology*, v. 10, n. 1, p. 302, 2010.

LIU, N., CHEN, L., WANG, S., OH, C., ZHAO, H. Comparison of single-nucleotide polymorphisms and microsatellites in inference of population structure. *BMC Genetics*, v. 6, n. SUPPL.1, p. 1–5, 2005.

LOTKA, A. J. Population analysis – the extinction of families – I. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, v. 21, p. 377–380, 1931.

LOUREIRO, L. O.; ENGSTROM, M. D.; LIM, B. K. Optimization of Genotype by Sequencing data for phylogenetic purposes. *MethodsX*, v. 7, p. 100892, 2020.

LOWRY, D. B. , HOBAN, S., KELLEY, J.L., LOTTERHOS, K.E., REED, L.K., ANTOLIN, M.F., STORFER, A. Breaking RAD: an evaluation of the utility of restriction site-associated DNA sequencing for genome scans of adaptation. *Molecular ecology resources*, v. 17, n. 2, p. 142–152, 2017.

LU, F. , LIPKA, A.E., GLAUBITZ, J., ELSHIRE, R., CHERNEY, J.H., CASLER, M.D., BUCKLER, E.S., COSTICH, D.E. Switchgrass Genomic Diversity, Ploidy, and Evolution: Novel Insights from a Network-Based SNP Discovery Protocol. *PLoS Genetics*, 2013.

MAGALHAES, I. S., LUNDSGAARD-HANSEN, B., MWAIKO, S., SEEHAUSEN, O. Evolutionary divergence in replicate pairs of ecotypes of Lake Victoria cichlid fish. *Evolutionary Ecology Research*, v. 14, n. 4, p. 381–401, 2012.

MASTRETTA-YANES, A. ARRIGO, N., ALVAREZ, N., JORGENSEN, T.H., PIÑERO, D., EMERSON, B.C. Restriction site-associated DNA sequencing, genotyping error estimation and de novo assembly optimization for population genetic inference. *Molecular Ecology Resources*, v. 15, n. 1, p. 28–41, jan. 2015.

MCCORMACK, J. E., HIRD, S.M., ZELLMER, A.J., CARSTENS, B.C., BRUMFIELD, R.T. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013.

MELVILLE, J., HAINES, M.L., BOYSEN, K., HODKINSON, L., KILIAN, A., SMITH DATE, K.L., POTVIN, D.A., PARRIS, K.M. Identifying hybridization and admixture using SNPs: Application of the DArTseq platform in phylogeographic research on vertebrates. *Royal Society Open Science*, v. 4, n. 7, 19 jul. 2017.

MIRARAB, S.; WARNOW, T. ASTRAL-II: Coalescent-based species tree estimation with many hundreds of taxa and thousands of genes. *Bioinformatics. Anais...*2015

MONSON-MILLER, J. , SANCHEZ-MENDEZ, D.C., FASS, J., HENRY, I.M., TAI, T.H., COMAI, L. Reference genome-independent assessment of mutation density using restriction enzyme-phased sequencing. *BMC Genomics*, v. 13, n. 1, p. 72, 2012.

MORRIS, G. P., RAMU, P., DESHPANDE, S.P., HASH, C.T., SHAH, T., UPADHYAYA, H.D., RIERA-LIZARAZU, O., BROWN, P.J., ACHARYA, C.B., MITCHELL, S.E., HARRIMAN, J., GLAUBITZ, J.C., BUCKLER, E.S., KRESOVICH, S. Population genomic and genome-wide association studies of agroclimatic traits in sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013.

NARUM, S. R., BUERKLE, C.A., DAVEY, J.W., MILLER, M.R., HOHENLOHE, P.A. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2841–2847, 2013.

NOSIL, P.; FEDER, J. L. Genomic divergence during speciation: Causes and consequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 367, n. 1587, p. 332–342, 2012.

OGDEN, R., GHARBI, K., MUGUE, N., MARTINSOHN, J., SENN, H., DAVEY, J.W., POURKAZEMI, M., MCEWING, R., ELAND, C., VIDOTTO, M., SERGEEV, A., CONGIU, L. Sturgeon conservation genomics: SNP discovery and validation using RAD sequencing. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 3112–3123, 2013.

PARCHMAN, T. L., Gompert, Z., Braun, M.J., Brumfield, R.T., McDonald, D.B., Uy, J.A.C., Zhang, G., Jarvis, E.D., Schlinger, B.A., Buerkle, C.A. The genomic consequences of adaptive divergence and reproductive isolation between species of manakins. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 12, p. 3304–3317, 2013.

PETERSON, B. K., WEBER, J.N., KAY, E.H., FISHER, H.S., HOEKSTRA, H.E. Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, 2012.

PETIT, R. J., DUMINIL, J., FINESCHI, S., HAMPE, A., SALVINI, D., VENDRAMIN, G.G. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, v. 14, n. 3, p. 689–701, 2005.

POLAND, J. A., BROWN, P.J., SORRELLS, M.E., JANNINK, J.L. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, 2012.

RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, n. 2, p. 94–100, 2002.

REITZEL, A. M., HERRERA, S., LAYDEN, M.J., MARTINDALE, M.Q., SHANK, T.M. Going where traditional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2953–2970, jun. 2013.

RODA, F., AMBROSE, L., WALTER, G.M., LIU, H.L., SCHAUL, A., LOWE, A., PELSER, P.B., PRENTIS, P., RIESEBERG, L.H., ORTIZ-BARRIENTOS, D. Genomic evidence for the parallel evolution of coastal forms in the *Senecio lautus* complex. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2941–2952, 2013.

ROWAN, B. A., SEYMOUR, D.K., CHAE, E., LUNDBERG, D.S., WEIGEL, D. Methods for Genotyping-by-Sequencing. In: WHITE, S. J.; CANTSILIERIS, S. (Eds.). *Genotyping: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2017. v. 1492p. 221–242.

SCHOPEN, G. C. B., BOVENHUIS, H., VISKER, M.H.P.W., VAN ARENDONK, J.A.M. Comparison of information content for microsatellites and SNPs in poultry and cattle. *Animal Genetics*, v. 39, n. 4, p. 451–453, 2008.

SEDEEK, K. E. M., SCOPECE, G., STAEDLER, Y.M., SCHÖNENBERGER, J., COZZOLINO, S., SCHIESTL, F.P., SCHLÜTER, P.M. Genic rather than genome-

wide differences between sexually deceptive *Ophrys* orchids with different pollinators. *Molecular Ecology*, 2014.

SEEHAUSEN, O., TERAJ, Y., MAGALHAES, I.S., CARLETON, K.L., MROSSO, H.D.J., MIYAGI, R., VAN DER SLUIJS, I., SCHNEIDER, M. V., MAAN, M.E., TACHIDA, H., IMAI, H., OKADA, N. Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature*, v. 455, n. 7213, p. 620–626, 2008.

SIGWART, J. *Coalescent Theory: An Introduction*. Systematic Biology, 2009.

SOTO, J. C., ORTIZ, J.F., PERLAZA-JIMÉNEZ, L., VÁSQUEZ, A.X., LOPEZ-LAVALLE, L.A.B., MATHEW, B., LÉON, J., BERNAL, A.J., BALLVORA, A., LÓPEZ, C.E. A genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with integrated physical mapping of immunity-related genes. *BMC Genomics*, 2015.

VACHASPATI, P.; WARNOW, T. ASTRID: Accurate Species TREes from Internode Distances. *BMC Genomics*, v. 16, n. S10, p. S3, dez. 2015.

WAKELEY, J. *Probability Theory for the Coalescent*. Coalescent Theory, 2000.

WALLACE, J. G.; MITCHELL, S. E. Genotyping-by-Sequencing. *Current protocols in plant biology*, v. 2, n. 1, p. 64–77, 2017.

WHITE, T. A., PERKINS, S.E., HECKEL, G., SEARLE, J.B. Adaptive evolution during an ongoing range expansion: The invasive bank vole (*Myodes glareolus*) in Ireland. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2971–2985, 2013a.

WHITE, T. A., Perkins, S.E., Heckel, G., Searle, J.B. Adaptive evolution during an ongoing range expansion: the invasive bank vole (*Myodes glareolus*) in Ireland. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 2971–2985, jun. 2013b.

XU, P., XU, S., WU, X., TAO, Y., WANG, B., WANG, S., QIN, D., LU, Z., LI, G. Population genomic analyses from low-coverage RAD-Seq data: A case study on the non-model cucurbit bottle gourd. *Plant Journal*, v. 77, n. 3, p. 430–442, 2014.

MARCADORES *SIMPLE SEQUENCE REPEATS* APLICADOS A UTILIZAÇÃO CONVENCIONAL E POR FLUORESCÊNCIA

Adelson Lemes da Silva Júnior
Fábio Demolinari de Miranda
Marcos Vinicius Winckler Caldeira

1. INTRODUÇÃO

A constante evolução das técnicas moleculares tem proporcionado avanços ao melhoramento genético aplicado ao conhecimento de características de interesse a nível de DNA, além de permitir o detalhamento dos genótipos prioritários à conservação (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Para isto, ferramentas conhecidas como marcadores moleculares, permitem acessar regiões específicas do genoma, sendo definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre os marcadores moleculares, os *Simple Sequence Repeats* (SSR) são mundialmente aceitos, englobando genomas de procariotos, eucariotos, nucleares ou organelares (ZANE et al., 2002). Diversos estudos descrevem a utilização dos marcadores SSR associados a diferentes métodos de detecção dos alelos, sendo estes de forma convencional ou por fluorescência. A detecção dos alelos de forma convencional é comumente conhecida pela utilização da eletroforese em gel de agarose (OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2019), ou por eletroforese em gel de poliacrilamida (WU et al., 2019; RAZA et al., 2020). Já a detecção dos alelos por fluorescência a partir dos marcadores SSR são realizadas pela eletroforese capilar (LIU et al., 2019; BALDONI et al., 2020).

Apesar da tecnologia utilizada para o desenvolvimento do marcador molecular, a qualidade da informação gerada pode ser influenciada pelos diferentes métodos eletroforéticos, podendo apresentar padrões de leitura dos *loci* e alelos

não correspondentes aos genótipos avaliados. Portanto, a perspectiva deste capítulo é abordar diferentes contextos para utilização dos marcadores *Simple Sequence Repeats*, de forma que o leitor/pesquisador tenha um referencial teórico no momento da adequação do experimento, levando em consideração as condições laboratoriais e de custeio.

2. MARCADORES *SIMPLE SEQUENCE REPEATS*

Os microssatélites, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats* (SSR), *Simple Sequence Length Polymorphism* (SSLP) e *Short Tandem Repeats* (STR), foram desenvolvidos inicialmente para o mapeamento genético em humanos (LITT & LUTY, 1989). Atualmente, a utilização desta classe de marcadores envolve diversas áreas da ciência e diferentes espécies, devido ao fato de ser uma técnica fácil em termos de reprodutibilidade, apresentar caráter multialélico, codominante e principalmente por serem abundantes no genoma (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Entretanto, apresentam uma limitação relacionada a obtenção dos *primers* SSR, por requerer a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas, o sequenciamento e o desenho dos *primers* (GUIMARÃES et al., 2009).

Apesar da limitação, as vantagens desta ferramenta fazem com que seja mais eficiente em análises de diversidade genética entre populações ou espécies, estrutura populacional, identificação de híbridos, estimativas de fluxo gênico, mapeamento genético, análise de parentesco, análises forenses, dentre outros (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Para isto, pares de *primers* são utilizados em reações de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com o objetivo de detectar variações de sequências repetitivas, ou seja, repetições em tandem de 1 a 6 nucleotídeos (BUSO et al., 2003).

Indivíduos da mesma espécie ou espécies correlacionadas possuem estas sequências de DNA conservadas que flanqueiam os microssatélites, permitindo a ligação de *primers* SSR complementares a esta região. Entretanto, mutações na região flanqueadora, onde se ligam os *primers*, podem ser responsáveis pela ocorrência de alelos nulos, sendo consequentemente um limitador no uso do marcador SSR (BAKER & DIBYA, 2010).

Em relação as regiões microssatélites, que são a sequência alvo em estudos

com SSR, estas por sua vez, também podem sofrer mutações devido a erros gerados pela enzima DNA polimerase durante a replicação, ou por eventos mutagênicos como o *crossing over*. Tais ocorrências, caracterizam as regiões microssatélites como altamente mutáveis, chegando a 1×10^{-7} a 1×10^{-3} mutações por loco por geração, garantindo elevadas taxas de polimorfismos. Em comparação com as regiões conservadas, a ocorrência de mutações nas regiões microssatélites são extremamente importantes por serem a única fonte natural de variabilidade genética (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

A mutação promove o surgimento ou alteração dos alelos a partir de *Indels* ou mesmo por trocas de nucleotídeos na sequência de DNA codificadora de proteína, alterando sua função na expressão de um determinado fenótipo. A importância da mutação como fonte de variabilidade genética abrange desde processos naturais de evolução até sua identificação como alelo potencialmente útil para o homem (SOUSA, 2002), sendo neste último caso, investigado por meio de marcadores moleculares como os SSR que garantem a leitura alélica dos genótipos por meio de técnicas eletroforéticas e posteriores análises genéticas.

3. A ELETROFORESE NA SEPARAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR GERADOS A PARTIR DOS MARCADORES SSR

A técnica da eletroforese foi primeiramente fundamentada por Michaelis em 1909, quando em estudos com proteínas, percebeu que se moviam quando submetidas a um campo elétrico, podendo ser separadas em frações. Porém, a base para a eletroforese realizada nos dias atuais, surgiu com os estudos envolvendo proteínas séricas do bioquímico sueco Arne Tiselius, ganhador do prêmio Nobel, em 1937 (OLIVEIRA et al., 2015). Por definição, eletroforese é o processo pelo qual moléculas de DNA migram por meio de um campo elétrico, sendo a velocidade e a direção desta migração determinada pelo campo elétrico aplicado e as cargas das moléculas (WESTERMEIER, 2005).

Atualmente existem diferentes métodos de separação dos produtos de PCR gerados a partir dos marcadores microssatélites, entre eles, a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (métodos convencionais), ou por eletroforese capilar utilizando fluoróforos (BAKER & DIBYA, 2010). Porém, existem vantagens e

desvantagens associadas a ambos os métodos.

A análise convencional para SSR é realizada por meio de géis, geralmente de poliacrilamida. Este tipo de gel é formado pela polimerização da acrilamida e bisacrilamida, induzida por catalizadores como a riboflavina ou o persulfato de amônio. A dimensão dos poros é determinada pela concentração da acrilamida, de forma que quanto maior for a concentração, menores serão os poros no gel. Em resposta à amplificação por SSR e eletroforese em gel, aparecerão fragmentos de diferentes tamanhos representando os alelos dos indivíduos ou espécie analisada (NAOUM, 2012).

A presença de apenas um fragmento com tamanho molecular conhecido indica que o indivíduo é homocigoto, por outro lado, a presença de dois fragmentos indica que o indivíduo é heterocigoto. Além disto, uma análise contendo vários indivíduos podem resultar em polimorfismos, ou seja, diferentes distribuições dos alelos, que devem ser analisados de acordo com o tamanho molecular (Figura 1).

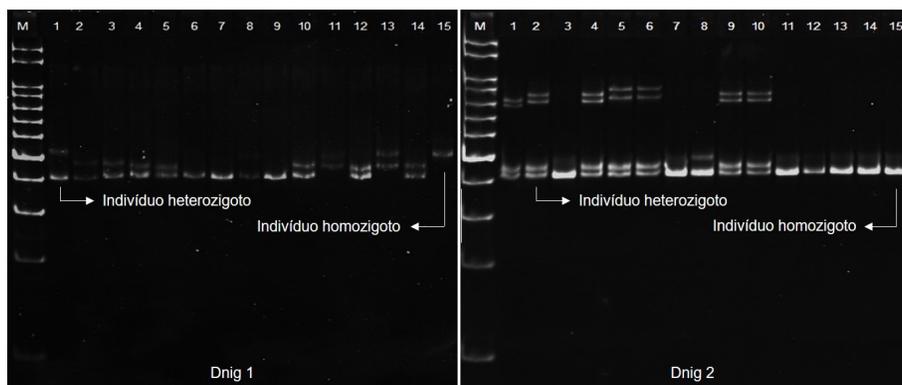


Figura 1: Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida para 15 indivíduos da espécie *Dalbergia nigra*, com utilização de dois *primers* SSR (Dnig 1 e Dnig 2) desenvolvidos por Ribeiro et al. (2009). Fonte: Os autores.

Os géis de poliacrilamida apresentam vantagens em relação ao método de eletroforese em gel de agarose, por possuírem a capacidade de separar fragmentos muito pequenos de DNA, de até 2 pares de bases (pb). Além disto, alguns laboratórios possuem apenas os equipamentos para a eletroforese em gel de

agarose, o que não descarta a utilização deste método, sendo neste caso, também indicado (BOMMI & FERGUSON, 2005). Apesar da efetividade na separação dos fragmentos, a toxicidade da poliacrilamida e a dificuldade da preparação dos géis são as desvantagens inerentes desta técnica (OLIVEIRA et al., 2015).

Outro método eletroforético crescente nos dias atuais é a eletroforese capilar, utilizando-se *primers* marcados com fluoróforos. Esta técnica se assemelha às técnicas convencionais por induzir a migração de moléculas sob ação de um campo elétrico, mas com mecanismos de separação diferentes, onde emprega-se um tubo capilar preenchido com um eletrólito. O resultado desta técnica são picos representando os alelos de diferentes tamanhos corados com fluorescência, comparados a um marcador de peso molecular calibrado ao programa, determinando o tamanho exato do fragmento (Figura 2) (QUEIROZ, 2001).

As principais desvantagens no uso da eletroforese capilar estão no alto custo associado a compra de reagentes, à necessidade de marcação dos oligonucleotídeos iniciadores com fluoróforos específicos de acordo com o equipamento a ser utilizado, compra e manutenção dos equipamentos (por exemplo, ABI 3700 Prism. Analyzer, ABI 3500 Genetic Analyzer, Fragment Analyzer, GelBot, dentre outros), envio de amostras para empresas especializadas e *softwares* disponíveis para as análises de amostras (MISSIAGGLIA & GRATTAPAGLIA, 2006; GUPTA et al., 2010).

No entanto, o crescimento da técnica está associado às vantagens como os curtos tempos de análises, baixa geração de resíduos para os mais variados tipos de amostras, separações com alta eficiência resultando em melhor qualidade na resolução dos resultados e, análise individual do tamanho de cada alelo pela adição do marcador de peso molecular fluorescente que gera uma curva para cada capilar (BAKER & DIBYA, 2010; VAZ et al., 2015). Segundo Goulart et al. (2011), a presença do padrão de peso molecular ROX ou LIZ calibrado para cada reação da eletroforese capilar, aumenta a precisão da análise em comparação ao marcador *Ladder*, muitas vezes utilizado na eletroforese convencional.

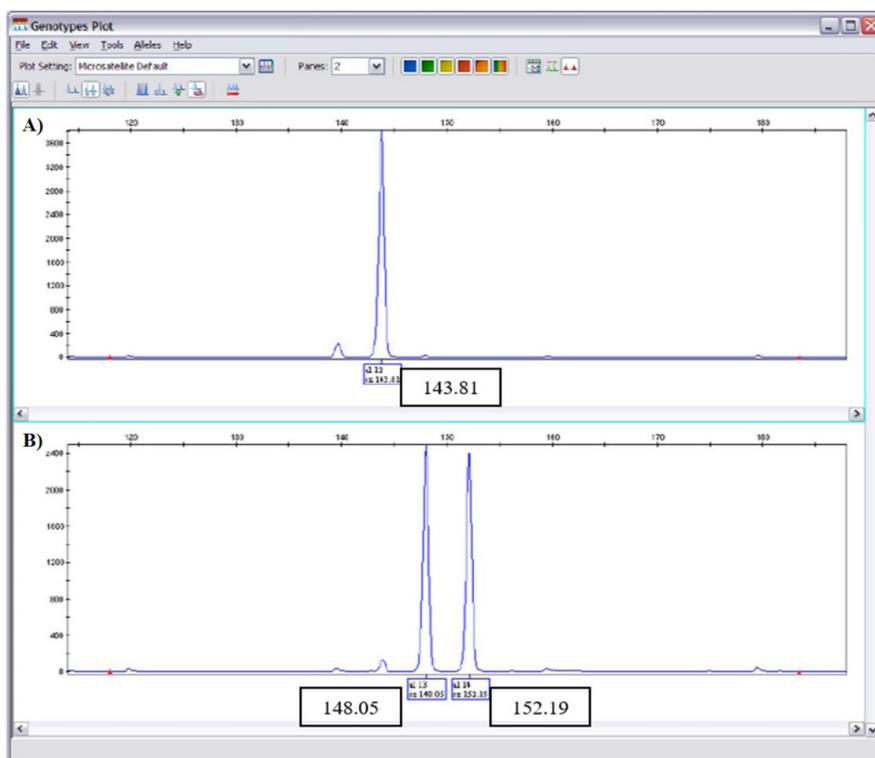


Figura 2: Amplificação de alelos por eletroforese capilar, com o tamanho molecular determinado pelo padrão de peso molecular calibrado ao *software* Genotypes Plot. A) Presença de um pico, indicando a ocorrência de indivíduo homocigoto. B) Presença de dois picos, indicando a ocorrência de indivíduo heterocigoto. Fonte: Thermo Fisher Scientific (2014).

A comparação entre a genotipagem em gel de poliácridamida e eletroforese capilar revela que esta última técnica apresenta maior eficiência e precisão, diferenciando fragmentos com apenas 1 pb, enquanto que em géis a diferença de alelos será de 2 pb (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017) (Figura 3). Em casos como este, a ineficiência da análise em gel de poliácridamida poderá interferir no momento da análise dos alelos, identificando indivíduos homocigotos ao invés de heterocigotos. Além das vantagens apresentadas, a utilização de *primers* com fluoróforos na eletroforese capilar permite o processo multiplex do PCR.

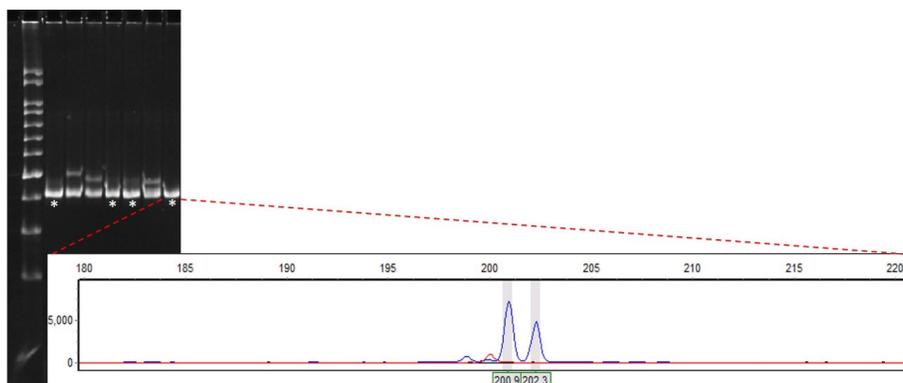


Figura 3: Análise comparativa entre a genotipagem por eletroforese em gel de poliacrilamida e capilar em indivíduos da espécie *Dalbergia nigra*, demonstrando a maior eficiência e precisão da técnica por capilar, permitindo diferenciar fragmentos com apenas 1 pb. (*) indica no gel apenas uma banda (homozigoto), porém, na eletroforese capilar são revelados dois alelos, separados por apenas 1 pb (heterozigoto). Fonte: Os autores.

4. PCR MULTIPLEX

A multiplexagem ou PCR *multiplex* é uma reação em que várias regiões do DNA são amplificadas ao mesmo tempo pela utilização simultânea de vários pares de *primers* específicos para cada loco a ser identificado (BUTLER et al., 2001). Desta forma, fica evidente que a utilização de géis na genotipagem por meio de vários *primers* amplificados numa mesma PCR seria insuficiente, podendo não apresentar resolução satisfatória e boa separação dos fragmentos, principalmente quando possuem o mesmo tamanho molecular (ZAROURI et al., 2015).

Em estudo com a espécie *Dalbergia nigra*, foram testados 10 marcadores microssatélites desenvolvidos por Ribeiro et al. (2009), dos quais 8 foram selecionados para compor o painel *multiplex* (Dnig 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10). A escolha dos 8 pares de *primers* levou em consideração a consistência na amplificação, o tamanho dos fragmentos observados e o fluorocromo associado. Em seguida, foram organizados em grupos de dois e três marcadores (*duplex* e *triplex*) com fragmentos não sobrepostos e, quando houve sobreposição dos fragmentos foram

utilizados os fluoróforos FAM e HEX, respectivamente. Os arranjos *multiplex* (*duplex* e *triplex*) foram primeiramente submetidos à genotipagem em gel de poliacrilamida para verificação da consistência da amplificação (Figura 4).

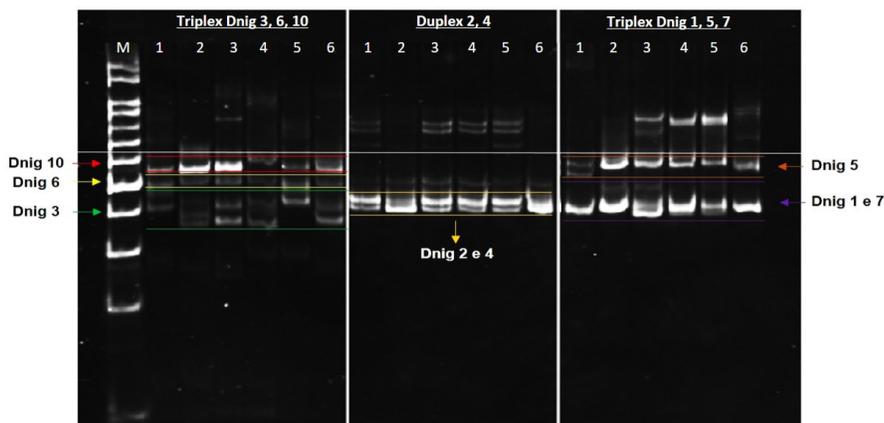


Figura 4: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida para amostras da espécie *Dalbergia nigra*, a partir da abordagem *multiplex*, organizados em grupos de três e dois marcadores SSR (*triplex* Dnig 3, 6 e 10; *duplex* Dnig 2, 4; *triplex* Dnig 1, 5, 7). Fonte: Os autores.

Na figura 4, a variação no tamanho molecular dos fragmentos no *triplex* Dnig 3, 6, 10 permitiu a nítida separação dos alelos de acordo com seus respectivos *primers*, apesar de terem sido marcados com diferentes fluoróforos. Já para o *duplex* Dnig 2, 4 e o *triplex* Dnig 1, 5, 7, a sobreposição de fragmentos influenciou negativamente a análise desta classe de dados, uma interferência ocorrente em técnicas de eletroforese em gel. Contudo, por meio da eletroforese capilar e a utilização de *primers* marcados com diferentes fluoróforos, foi possível a separação dos alelos com tamanhos semelhantes de acordo com a marcação fluorescente (Figura 5).

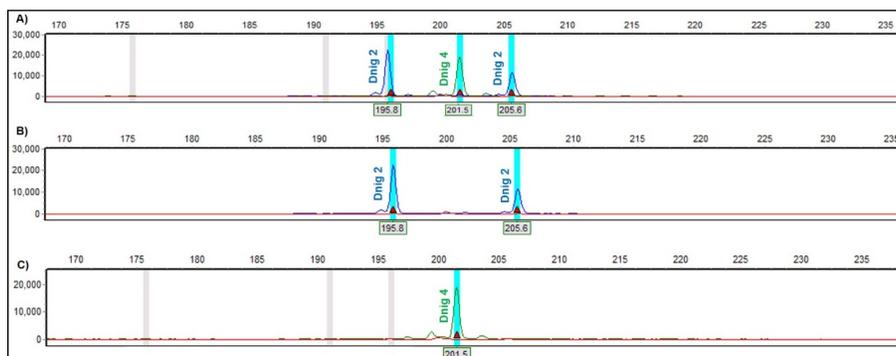


Figura 5: Genotipagem em mostra de *Dalbergia nigra* por eletroforese capilar em indivíduo da espécie *Dalbergia nigra*, evidenciando a separação por fluorescência do duplex. A) Duplex entre os *primers* Dnig 2 e Dnig 4, marcados com os fluoróforos FAM e HEX, respectivamente. B) *Primer* Dnig 2 marcado com FAM. C) *Primer* Dnig 4 marcado com HEX. Fonte: Os autores.

Além dos cuidados tomados quanto ao tamanho dos fragmentos observados e o fluorocromo associado em cada *primer*, para o bom funcionamento da técnica de PCR *multiplex*, é necessário também que a temperatura de anelamento dos diferentes *primers* seja semelhante. Por outro lado, o custo e o tempo, para obtenção dos resultados são reduzidos pela economia de reagentes e quantidade de informação obtida por unidade de tempo. Além disto, a amplificação simultânea de vários *loci* e alelos reduz a quantidade de DNA necessário para as análises, que por vezes pode ser um fator limitante (ROSSETI et al., 2006).

5. CAUDA M13: MÉTODO ALTERNATIVO PARA A MARCAÇÃO FLUORESCENTE EM PRODUTOS DE PCR

Em relação aos *primers* utilizados tanto em reações individuais quanto no *multiplex*, estes podem ser marcados diretamente com fluorescência ou utilizar a estratégia da cauda M13, que é um *primer* universal. A marcação direta com fluorescência geralmente possui custos elevados, no qual foi desenvolvido a inclusão da cauda M13 no oligonucleotídeo como um método alternativo e econômico para a marcação fluorescente de fragmentos de PCR (SCHUELKE,

2000). A incorporação direta do fluoróforo à síntese pode aumentar o custo em 500%, em relação a um *primer* não marcado, enquanto que a inclusão da cauda M13 marcada com fluoróforo teria o custo aumentado em 100% (MISSIAGGLIA & GRATTAPAGLIA, 2006).

A genotipagem pelo método M13 é realizada pela utilização de três *primers*: o *primer forward* sintetizado com adição da sequência M13 na extremidade 5', o *primer reverse* sintetizado normalmente sem adição da sequência M13 e o *primer* universal M13 sintetizado com fluoróforo. Em seguida, a PCR ocorrerá em duas etapas, sendo a primeira caracterizada pela amplificação rotineira, por meio dos *primers forward* e *reverse*, garantindo a inserção da região M13 às sequências amplificadas. Na segunda etapa, pela inclusão de ciclos adicionais de amplificação ao programa da PCR, a temperatura de anelamento será reduzida com o objetivo de inserir a sequência M13 sintetizada com fluoróforo aos fragmentos amplificados anteriormente (Figura 6) (SCHUELKE, 2000).

A principal vantagem do método é que apenas o *primer* M13 requer marcação com fluoróforo. Os resultados obtidos pela eletroforese capilar poderão ser vistos por meio de picos com diferentes cores, representando o fluorescente utilizado (SCHUELKE, 2000). Segundo Goulart et al. (2011), o método M13 não apresenta desvantagens, pelo contrário, caso haja disponibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos para as mais variadas espécies, associados a sequência M13 fluorescente, acarretará em ganhos relacionados à facilidade de execução e diminuição do custo operacional.

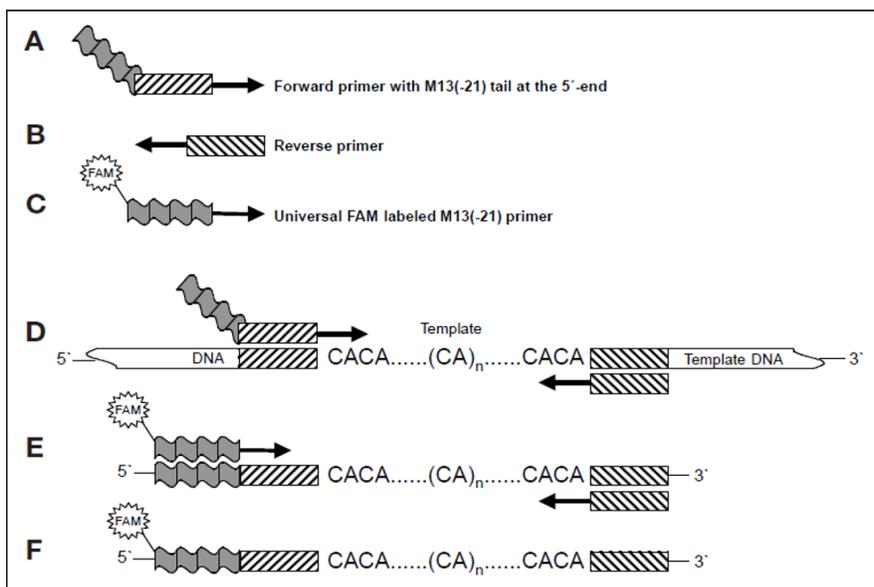


Figura 6: Amplificação via PCR pelo método M13. (A, B e C) O *primer forward* sintetizado com adição da sequência M13 na extremidade 5', o *primer reverse* sintetizado normalmente sem adição da sequência M13 e o *primer* universal M13 sintetizado com fluoróforo FAM. (D) Amplificação por meio dos *primers forward* e *reverse*, garantindo a inserção da sequência M13 às sequências amplificadas. (E e F) Inclusão de ciclos adicionais de amplificação ao programa da PCR, com redução da temperatura de anelamento por volta de 53 °C e inserção do *primer* M13 sintetizado com fluoróforo FAM aos fragmentos amplificados anteriormente. Fonte: Schuelke (2000).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção de alelos a partir dos marcadores SSR pode ser realizada tanto por métodos convencionais, quanto por fluorescência, sendo encontrados trabalhos atuais para ambos os métodos. Dentre as vantagens apresentadas, o método de eletroforese capilar utilizando-se *primers* marcados com fluoróforos permite diferenciar fragmentos com apenas 1 pb, além de analisar individualmente o tamanho de cada alelo. No entanto, ressalta-se o alto custo associado a este método,

tornando-o muitas vezes inadequado para ser reproduzido em alguns laboratórios ou experimentos. Neste caso, métodos convencionais são indicados por gerarem dados aceitáveis por um menor custo.

7. REFERÊNCIAS

BAKER, D.; DIBYA, D. Simple, High Throughput and Cost Effective Analysis of SSR (Microsatellite, STR) Fragments Using the AdvanCE™ FS96 System. South Loop Drive: Advanced Analytical Technologies, 2010, 5p.

BALDONI, A. B.; TEODORO, L. P.; TEODORO, P. E.; TONINI, H.; TARDIN, F. D.; BOTIN, A. A.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; BOTELHO, S. C. C.; LULU, J.; NETO, A. L. F.; AZEVEDO, V. C. R. Genetic diversity of Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) in Southern Brazilian Amazon. *Forest Ecology and Management*, v. 458, p. 1-7, 2020.

BOMMI, P.; FERGUSON, D. L. Soybean cultivar identification within a selected group using only an agarose gel system with simple sequence repeat DNA markers. *Soybean Genetics Newsletter*, v. 32, p.1-7, 2005.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 30, p. 1-6, 2003.

BUTLER, J. M.; RUITBERG, C. M.; VALLONE, P. M. Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 369, p. 200-205, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

GOULART, I. C. G. R.; MEROTTO JUNIOR, A.; NUNES, A. L.; BERED, F. Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. *Planta Daninha*, v. 29, p. 1175-1181, 2011.

GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. *Informe Agropecuário*, v. 30, p. 24-33, 2009.

GUPTA, V.; DORSEY, G.; HUBBARD, A. E.; ROSENTHAL, P. J.; GREENHOUSE, B. Gel versus capillary electrophoresis genotyping for categorizing treatment outcomes in two antimalarial trials in Uganda. *Malaria Journal*, v. 9, n. 19, p. 1-8, 2010.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, v. 44, p. 397-401, 1989.

LIU, F.; HONG, Z.; XU, D.; JIA, H.; ZHANG, N.; LIU, X.; YANG Z.; LU, M. Genetic Diversity of the Endangered *Dalbergia odorifera* Revealed by SSR Markers. *Forests*, v. 225, n. 10, p. 1-17, 2019.

MISSIAGGIA, A.; GRATTAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multi-tailed primers. *Genetic Molecular Research*, v. 5, n. 1, p. 72-78, 2006.

NAOUM, P. C. Eletroforese: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas e DNA. São Paulo: Editora Santos. 2012, 301p.

OLIVEIRA, E.; TRENTIN, T. C.; CAMARGO, F.; PINTO, Y. D. P.; MARTINS, D. B. Eletroforese: Conceitos e aplicações. *Enciclopédia Biosfera*, v. 11, n. 22, p. 1129-1149, 2015.

OLIVEIRA, M. S. P.; SANTOS, J. B.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, D. F. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, n. 5, p. 1253-1260, 2010.

QUEIROZ, S. C. N. Eletroforese capilar. *Chemkeys*, p. 1-9, 2001.

RAZA, Q.; RIAZ, A.; SAHER, H.; BIBI, A.; RAZA, M. A.; ALI, S. S.; SABAR, M. Grain Fe and Zn contents linked SSR markers based genetic diversity in rice. *Plos one*, v. 15, n. 9, p. 1-14, 2020.

RIBEIRO, A. R.; REZENDE, M. F. S.; RESENDE, L. C.; LEMOS-FILHO, J. P.; KALAPOTHAKIS, E.; LOVATO, M. B. Development of polymorphic microsatellite markers for *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology Resources*, v. 9, p. 203-206, 2009.

ROSSETI, M. L.; SILVA, C. M. D. D; RODRIGUES, J. J. S. Doenças infecciosas: diagnóstico molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v. 18, p. 233-234, 2000.

SILVA, B. S. R.; SANT'ANA, G. C.; CHAVES, C. L.; ANDROCIOLO, L. G.; FERREIRA, R. V.; SERA, G. H.; CHARMETANT, P.; LEROY, T.; POT, D.; DOMINGUES, D. S.; PEREIRA, L. F. P. Population structure and genetic relationships between Ethiopian and Brazilian *Coffea arabica* genotypes revealed by SSR markers. *Genetica*, v. 147, p. 205-216, 2019.

SOUSA, N. R. Processos genético-evolutivos e os recursos fitogenéticos. In: SOUSA, N. R.; SOUZA, A. G. C. (Eds.) Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental: Conservação, pesquisa e utilização. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2002, p. 19-26.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. Estados Unidos: Carlsbad, 2014, 220 p.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, A. M.; PASSAIA, G. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017, 181 p.

VAZ, F. A. S.; OLIVEIRA, C. L. M.; OLIVEIRA, M. A. L. Fundamentos da eletroforese capilar: Uma abordagem por animações. *Química Nova*, v. 38, n. 5, p. 732-737, 2015.

WESTERMEIER, R. Gel electrophoresis. *Encyclopedia of life sciences*, p. 1-6, 2005.

WU, X. X.; XU, X. F.; MA, D. X.; CHEN, R. Z.; LI, T. Y.; CAO, Y. Y. Virulence structure and its genetic diversity analyses of *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* isolates in China. *BMC Evolutionary Biology*, v. 183, n. 19, p. 1-11, 2019.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZAROURI, B.; VARGAS, A. M.; GAFORIO, L.; ALLER, M.; DE ANDRÉS, M. T.; CABEZAS, J. A. Whole-genome genotyping of grape using a panel of microsatellite multiplex PCRs. *Tree Genetics and Genomes*, v. 11, n. 2, p. 1-15, 2015.

MONTAGEM E ANOTAÇÃO DE GENOMA DE PLANTAS

Miquéias Fernandes

Dener Cezati Canal

Tiago Antônio de Oliveira Mendes

Adésio Ferreira

1. MONTAGEM E ANOTAÇÃO DE GENOMA DE PLANTAS

O tamanho do genoma de plantas varia dramaticamente - de 63 Mbp a 148,8 Gbp. Como existem vários desafios com relação a, por exemplo, sequências duplicadas, elementos repetitivos, ploidia e como estes desafios são proporcionais ao tamanho do genoma poucos genomas maiores que 10 Gbp foram montados até agora (LI; HARKESS, 2018).

Mesmo entre os organismos que possuem tamanho genômico menor que 10 Gbp o número de genomas montados não é grande, devido ao fato de que para ser considerado um genoma “montado” deve estar em nível cromossômico, sendo este um dos principais desafios em projetos que não utilizam tecnologias de sequenciamento de terceira geração combinadas com mapas óticos por exemplo (BELSER et al., 2018) . Com isso, vários genomas de plantas são publicados com milhares de sequências denominadas *scaffolds*, que são fragmentos cromossômicos obtidos pela junção de sequências contíguas.

Por outro lado, avanços nas tecnologias de sequenciamento aliado a ferramentas de bioinformática tem permitido obter sequências de pseudomoléculas em escala cromossômica, estas por sua vez, são os *scaffolds* ancorados ao seu devido cromossomo com ordem e orientação refinada por mapas óticos (MUKHERJEE et al., 2018), físicos e genéticos (YOU et al., 2018).

Neste sentido, o desenvolvimento de sequenciamentos de *high-throughput* revolucionou a genética e a genômica com baixos custos, permitindo incremento de projetos de sequenciamento de genoma completo (WGS) de várias espécies

diferentes. Hoje existem diferentes tecnologias de sequenciamento de segunda e terceira geração e algoritmos para montagem de genoma que podem ser utilizadas ou combinadas para obter uma montagem de genoma de alta qualidade (PAAJANEN et al., 2019). As abordagens híbridas de sequenciamento de segunda e terceira geração são atualmente o estado da arte em montagem de genomas. Enquanto para o sequenciamento de segunda geração é possível obter alta cobertura viabilizado pelo baixo custo ainda com baixo erro de leitura, o tamanho longo de leitura é um diferencial do sequenciamento de terceira geração. Combinadas essas características em abordagem híbrida obtém-se genomas menos fragmentados e de maior qualidade.

Enquanto o sequenciamento de nova geração (NGS) estabeleceu-se como principal tecnologia de análise genômica, *workflows* e *pipelines* de análises destes dados exigem expertise dos bioinformatas para seleção de ferramentas apropriadas em consideração a uso de paralelização, solução de armazenamento de dados e desenvolvimento de estratégias customizadas e automatizadas para máxima exploração dos resultados que envolvem múltiplas condições experimentais (KULKARNI; FROMMOLT, 2017). Assim, referências como LANTZ et al. (2018) que descrevem as principais etapas para um bom projeto de montagem e anotação de genomas são referências indispensáveis para o desenvolvimento de projetos de montagem de genoma. Para LANTZ et al. (2018) os bioinformatas e outros envolvidos no projeto devem levar em consideração os dez tópicos a seguir:

1. Investigar propriedades do genoma em estudo, entre elas:
 - 1.1. tamanho do genoma;
 - 1.2. regiões repetitivas;
 - 1.3. heterozigotidade;
 - 1.4. ploidia;
 - 1.5. conteúdo GC.
2. Extrair amostras de DNA com qualidade, considerando:
 - 2.1. a modalidade de novo;
 - 2.2. pureza química;
 - 2.3. integridade estrutural do DNA.

3. Escolher a tecnologia de sequenciamento ideal, entre:
 - 3.1. sequenciamento de primeira geração (FGS);
 - 3.2. sequenciamento de segunda geração (SGS);
 - 3.3. sequenciamento de terceira geração (TGS);
 - 3.4. abordagens híbridas.
4. Estimar os recursos computacionais necessários.
5. Montar o genoma.
 - 5.1. montagem de reads curtas;
 - 5.2. montagem de reads longas;
 - 5.3. montagem de scaffolds e preenchimento de gaps;
 - 5.4. realizar controle de qualidade da montagem.
6. Identificar e anotar elementos repetitivos e transponíveis.
7. Anotar genes com evidência experimental.
8. Escolher formatos de arquivos de saída e persistir em bancos de dados.
9. Verificar se os métodos utilizados são repetíveis e reproduzíveis
10. Investigar, analisar e anotar novamente.

Nesta revisão, esta referência será amplamente utilizada por cobrir toda a parte desde a amostragem do DNA até a análise dos dados genômicos, que inclui: genes, anotações, *scaffolds* etc. Os itens 5, 6 e 7 desta referência podem ser organizados como proposto na **Figura 1**.

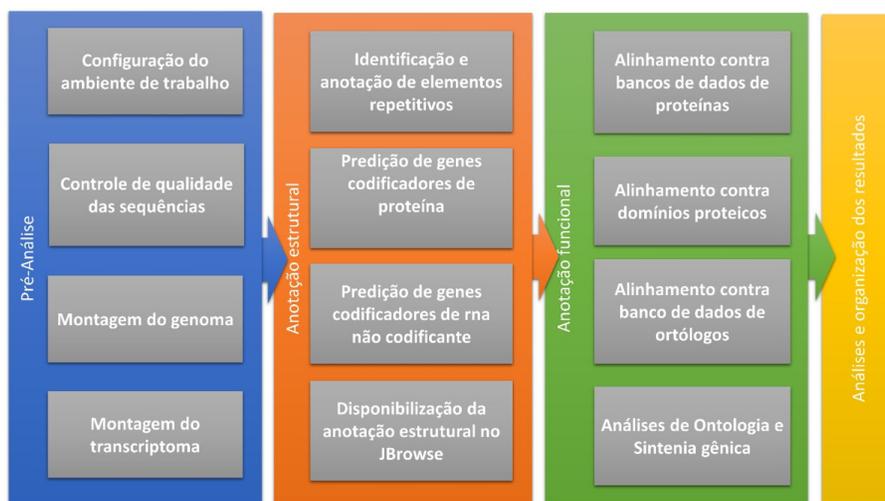


Figura 1 - Definição do fluxo de trabalho em processos básicos de montagem de genomas. Iniciando com obtenção do rascunho do genoma na primeira análise, seguido de análises anotação estrutural e funcional.

1.1. Montagem do Genoma

A montagem de um genoma pode ser comparada a um quebra-cabeça, com algumas peculiaridades como: número de peças extraordinariamente grande, peças de tamanho variável e repetidas. Dessa forma, montar um genoma é uma das etapas mais onerosas para os recursos computacionais. Nesse sentido, vários algoritmos, heurísticas e meta-heurísticas tem sido projetados e aperfeiçoados levando em consideração melhoria de desempenho e o avanço nas tecnologias de sequenciamento (SOHN; NAM, 2018).

Apesar do aprimoramento dos algoritmos ter importância significativa na realização da montagem do genoma há outras tarefas indispensáveis antes e após a montagem que devem ser realizadas, conforme apresentado por LANTZ et al. (2018) na Figura 2. Nesta figura é possível conferir ainda os formatos de arquivos esperados em cada etapa envolvida na montagem de genomas. Pela Figura 2 compreende-se que a etapa de montagem deve ser precedida por outras duas que são: controle de qualidade e filtragem, e sucedida por validação da montagem.

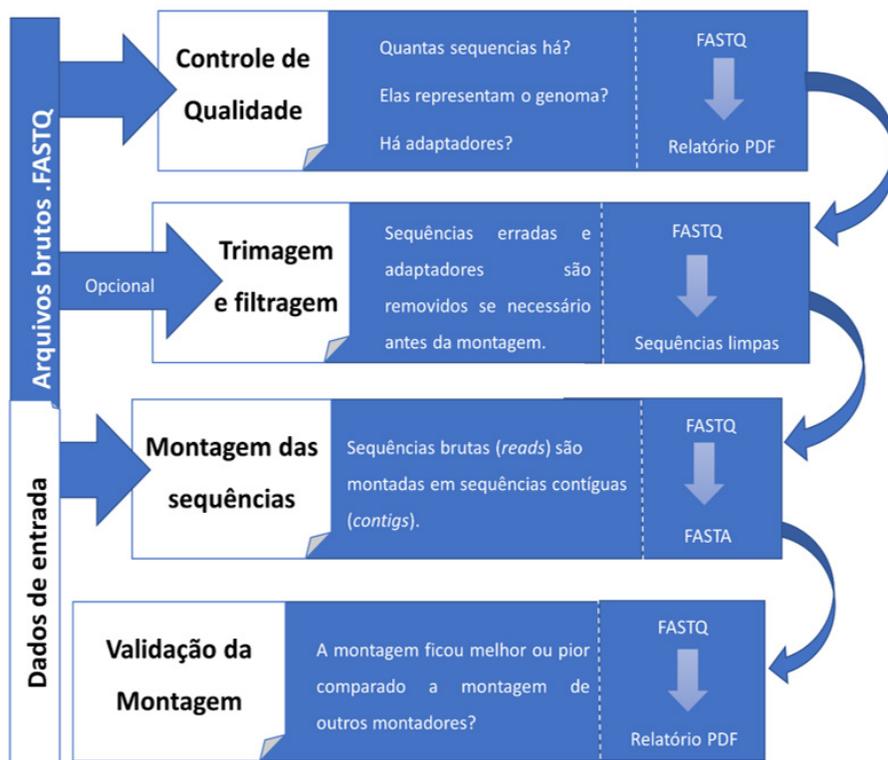


Figura 2 - Etapas da montagem de genomas adaptado de LANTZ et al (2018) que facilita a compreensão da ordem de softwares que devem ser executados para se obter o genoma montado a partir do sequenciamento e os respectivos arquivos gerados por cada um deles em cada etapa.

Nas etapas precedentes à montagem pode ser utilizado softwares como o Trimmomatic (BOLGER, A. M.; LOHSE; USADEL, 2014) ou NGS QC Toolkit (PATEL; JAIN, 2012) que são suítes para realização de várias etapas envolvidas no controle de qualidade do sequenciamento, que inclui mas não se limita a: remoção de adaptadores, remoção de reads sem qualidade de sequenciamento, corte de início ou fim de reads que possuem pares de base lidos com baixa qualidade, remoção de contaminações e remoção de reads não pareadas. Nesse momento o bioinformata deve levar em consideração a real necessidade de remoção de reads de baixa qualidade, pois de fato remover pode ser discutível (YANG et al.,

2019). Consecutivamente, a qualidade pode ser atestada com auxílio de softwares como FastQC ou FQC Dashboard (BROWN; PIRRUNG; MCCUE, 2017) para visualização geral das reads que serão submetidas a montagem.

Com as reads limpas deve-se proceder a montagem, nesse momento o bioinformata deve decidir entre vários montadores existentes, não só o mais adequado, mas também o mais eficiente levando em consideração o recurso computacional disponível. Há montadores mais rápidos, mas que exigem mais memória RAM, por exemplo. Isto ocorre devido as diferenças entre os algoritmos implementados por cada software, sendo que os algoritmos mais conhecidos utilizados por programas de montagem são: Overlap-Layout-Consensus (OLC), grafos de Brujin e caminhos eulerianos; entretanto devido à pouca sensibilidade por erros de sequenciamento este último não é muito utilizado (KYRIAKIDOU et al., 2018). O MASURCA (ZIMIN et al., 2013) é um exemplo de montador que utiliza o algoritmo OLC em combinação com grafos de Brujin para obter scaffolds.

Em geral, as sequências curtas precisam ser sobrepostas para obter contigs, que então devem ser unidos em scaffolds (scaffolding) até alcançar o nível cromossômico, com o fechamento de lacunas entre os scaffolds (gap filling) e ancoragem e orientação deles em cromossomos com mapas óticos/físicos/genéticos para obtenção de pseudo-moléculas ou no melhor caso a sequência completa de cada cromossomo. Considerando duas máquinas configuradas com 2 Xeon 2Ghz 24 threads, com 32GB e 128GB de RAM DDR3 cada, a Tabela 1 apresenta uma estimativa de tempo necessário para montagem de um genoma de 400mb. Para esta estimativa deve-se considerar que o tempo pode variar drasticamente a depender do conteúdo repetitivo do genoma, aqui considerado cerca de 50%.

Tabela 1 - Estimativa do tempo necessário para execução das análises de bioinformática de montagem de um genoma de 400mb a partir de 60x de cobertura de dados brutos Illumina.

Descrição	Semanas
Configuração do ambiente de trabalho	3
Controle de qualidade dos dados	2
Montagem do genoma	2
Ancoragem da montagem do genoma	1
Montagem do transcriptoma	2
Identificação dos elementos repetitivos	3
Predição de genes	2
Predição de NC-RNA	2
Alinhamento com blastp	5
Anotação com InterproScan 5	2
Anotação com eggNOG-mapper	2
Análises de transcriptômica	3
Construção do banco de dados	15
Total	44

Após a montagem, conforme a Figura 2, deve-se realizar uma validação da montagem. Nesta etapa deve ser verificado métricas como N50, quantidade de N's, tamanho acumulado por sequência, número e média de tamanho de sequências. Para isso pode ser utilizado softwares como Quast (GUREVICH et al., 2013) que valida comparativamente montagens de genoma e permite além de visualizar, reportar as métricas da montagem em diversos formatos de arquivo e o BUSCO (WATERHOUSE et al., 2018) que valida a completude da montagem quanto a genes cópia única que espera-se encontrar em uma montagem. Como o BUSCO depende da predição de genes o ideal executá-lo após o processo apresentado a seguir, entretanto ele permite utilizar o genoma e realiza a predição dos genes.

1.2. Anotação de Genomas

A anotação de genomas é o processo que identifica a estrutura e função de elementos e regiões ao longo da molécula de DNA. O momento ideal para

realização deste processo é após todas as etapas do processo de montagem: scaffolding, gap filling e ancoragem em pseudo-moléculas. Isto porque na anotação estrutural, algumas coordenadas de elementos identificados (como genes por exemplo) dependem de atributos da molécula onde foi identificado.

A primeira etapa da anotação de genomas é a anotação estrutural, onde são identificados os elementos repetitivos desde microssatélites a segmentos duplicados e elementos gênicos não funcionais (NC-RNA: tRNAs, rRNA, miRNAs entre outros) e funcionais (genes codificadores de proteínas). Após a anotação estrutural é possível visualizar os elementos identificados com navegadores de genoma como JBrowse (BUELS et al., 2016).

1.3. Anotação Estrutural

Há dois tipos de regiões no genoma que são: de baixa ou alta complexidade. A complexidade de uma região é dada pelo número de pares de base que compõe um motivo que se repete, se não há motivo a região é dita de alta complexidade. Assim: “AAAA” tem motivo A e complexidade 1 (baixa), já ATATATAT tem motivo AT e complexidade 2 (maior que a primeira). Para identificação desses elementos repetitivos podem ser utilizados três softwares em paralelo: MISA (BEIER et al., 2017), REPET (FLUTRE et al., 2011) e SEDEF (NUMANAGIĆ et al., 2018) pois os processos são independentes. A identificação de microssatélites com motivos de mono a hexa podem ser realizadas com o software MISA que é de fácil utilização, apenas um script em Perl com possibilidade ainda de execução em serviço web. Já o pacote REPET é escrito em Python2 e exige conhecimentos avançados para instalação e configuração dele e suas dependências. Por outro lado, o REPET reúne vários softwares especializados em predição de elementos transponíveis permitindo identificar com alta sensibilidade, agrupar e anotar várias classes de elementos transponíveis. Ele possui vários filtros para remoção de falsos positivos. Os segmentos duplicados são regiões repetitivas com tamanho superior a mil pares de base (NUMANAGIĆ et al., 2018), denotando teoricamente o maior tipo de elemento repetitivo no genoma. Para identificação destas regiões o SEDEF é uma boa opção por ser de fácil instalação, melhor usabilidade e possuir melhor desempenho comparado aos softwares legados.

A predição de genes é uma das mais importantes etapas do processo de anotação de genomas, de modo que vários softwares e pipelines foram desenvolvidos com diferentes abordagens para realização da predição de genes. Em geral essa etapa sucede a identificação de elementos repetitivos por depender do genoma com as regiões de baixa complexidade mascaradas, a fim de facilitar a execução do preditor de genes, visto que uma região de baixa complexidade como: AAA...AAA (apenas A) não inclui genes.

Nesse contexto, o pipeline Seqping (CHAN et al., 2017) foi apresentado como uma solução consenso ao unir em si os mais prestigiados preditores para eucariotos, que são GlimmerHMM (MAJOROS; PERTEA; SALZBERG, 2004), SNAP (KORF, 2004) e AUGUSTUS (STANKE; WAACK, 2003) para combinar com auxílio do MAKER2 (HOLT; YANDELL, 2011) os genes preditos por cada um dos três softwares baseado na evidencia de transcritos de RNA-Seq montado. Apesar dessa estratégia, abordagens ab initio dificilmente identificam todas as regiões transcritas e não traduzidas (UTR) de todos os genes preditos em organismos não modelo. Isso acontece porque o Augustus tem dificuldade em identificar essas regiões para aqueles organismos cujo modelo de predição destas regiões não foi treinado (HOFF; STANKE, 2018).

Para predizer os genes codificadores de tRNA podem ser utilizados os softwares ARAGORN (LASLETT; CANBACK, 2004), o tRNAscan-SE (LOWE; EDDY, 1997) ou o consenso de ambos. Já para predizer os genes codificadores de rRNA pode ser utilizado o software RNAMMER (LAGESEN et al., 2007). Outros RNAs podem ser preditos com o software INFERNAL (NAWROCKI; EDDY, 2013) contra o sequências que podem ser obtidas do banco de dados RFAM (SWEENEY et al., 2019) e RNACentral (SWEENEY et al., 2019).

1.4. Anotação Funcional

Após a anotação estrutural pode-se proceder a anotação funcional para identificação da função biológica dos genes codificadores de proteínas (BOLGER, M. E.; ARSOVA; USADEL, 2018). Nesta etapa as proteínas são analisadas alinhando-as contra vários bancos de dados para identificação domínios, famílias e relações evolutivas (ortólogos e grupos de ortólogos) entre elas conforme

apresentado na Figura 3. Para isso podem ser utilizados os softwares Diamond (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2014), InterproScan5 (JONES et al., 2014) e EggNOG-mapper (HUERTA-CEPAS et al., 2017) contra bancos de dados como NR RefSeq (O’LEARY et al., 2016), Uniprot SWISS/TREMBL (BATEMAN, 2019), EGNORG (JENSEN et al., 2008), PANTHER (MI et al., 2019), PFam (EL-GEBALI et al., 2019) entre outros.

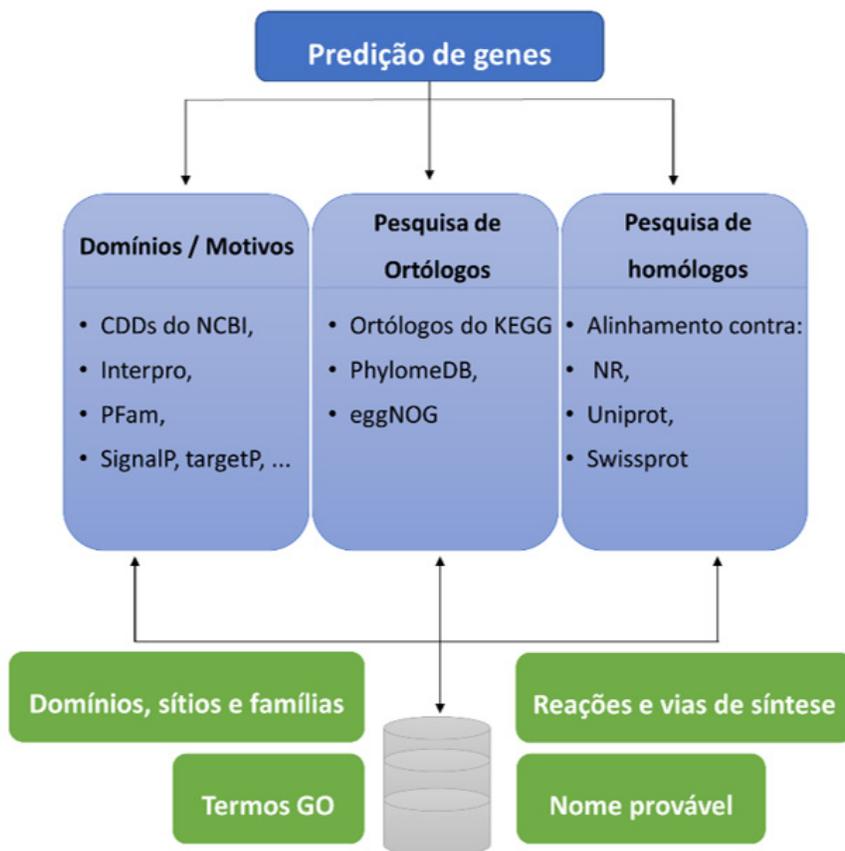


Figura 3 - Três abordagens da anotação funcional adaptado de LANTZ et al. (2018) que permite identificar com maior sensibilidade pelos softwares implícitos na figura: o Diamond, o EggNOG-mapper e InterproScan.

As análises podem ser executadas localmente ou em serviços web, sendo que existem ainda pipelines automatizados para anotação funcional como Blast2GO e

KAAS (BOLGER, M. E.; ARSOVA; USADEL, 2018). Com a anotação funcional realizada é possível atribuir funções e nomes aos genes cuja proteína foi anotada. Em geral um dos atributos mais importantes inferido a um gene é a ontologia.

O consórcio Gene Ontology (GO) (ASHBURNER et al., 2000) é a maior convenção de pesquisadores para gerência dessas ontologias. Eles definem um código para cada ontologia que pode ser atribuída a um gene. Uma vez que um gene tem seu nome como código alfanumérico pode ser validado facilmente e portado para diferentes softwares e análises sem qualquer preocupação que a informação possa não ser entendida pelo outro lado. Apesar de vantajoso o GO pode ser considerado complexo de modo que outras ontologias para anotação, como MapMan4 BIN (SCHWACKE et al., 2019), tem sido criadas.

A etapa de anotação funcional no processo de anotação do genoma é ilimitada. Apesar de um gene ser anotado por homologia com alta identidade contra outro gene e/ou por similaridade de seu produto polipeptídico contra o de outro gene, ainda assim, análises mais profundas como de vias de síntese ou de redes de interação de proteínas podem apresentar outras funções mais importantes do gene para o organismo. Nesse sentido, é necessária validação experimental e curadoria manual para determinar com certeza anotações dos genes.

2. CONCLUSÃO

A montagem do genoma não é trivial, mas é base para outros estudos que dependem do conhecimento genômico do organismo no contexto estrutural e funcional. Se a pesquisa dispensa estrutura ou função, abordagens alternativas como transcriptômica (LEEBENS-MACK et al., 2019) ou pseudo-genoma (KOWALSKI; GRABOWSKI; DEOROWICZ, 2015) por exemplo, podem ser realizadas para contornar os desafios de montar e anotar. Como esses desafios restringem a quantidade de dados genômicos disponíveis para um número resumido, projetos envolvendo múltiplos genomas (CHENG et al., 2018; GOODSTEIN et al., 2012) vem surgindo e são referenciados de alto valor para a comunidade científica.

3. REFERÊNCIAS

ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics*. [S.l.: s.n.]. , maio 2000.

BATEMAN, A. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D506–D515, 2019.

BEIER, S. et al. MISA-web: a web server for microsatellite prediction. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2017.

BELSER, C. et al. Chromosome-scale assemblies of plant genomes using nanopore long reads and optical maps. *Nature Plants*. [S.l.]: Palgrave Macmillan Ltd. , nov. 2018.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, ago. 2014.

BOLGER, M. E.; ARSOVA, B.; USADEL, B. Plant genome and transcriptome annotations: from misconceptions to simple solutions. *Briefings in bioinformatics*, v. 19, n. 3, p. 437–449, 2018.

BROWN, J.; PIRRUNG, M.; MCCUE, L. A. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics (Oxford, England)*, jun. 2017.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , jan. 2014.

BUELS, R. et al. JBrowse: A dynamic web platform for genome visualization and analysis. *Genome Biology*, v. 17, n. 1, abr. 2016.

CHAN, K. L. et al. Seqping: Gene prediction pipeline for plant genomes using self-training gene models and transcriptomic data. *BMC Bioinformatics*, v. 18, jan. 2017.

CHENG, S. et al. 10KP: A phylodiverse genome sequencing plan. *GigaScience*, v. 7, n. 3, 1 mar. 2018.

EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, v. 47, n. D1, p. D427–D432, jan. 2019.

FLUTRE, T. et al. Considering transposable element diversification in de novo annotation approaches. *PloS one*, v. 6, n. 1, p. e16526, jan. 2011.

GOODSTEIN, D. M. et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. D1, p. D1178–D1186, 1 jan. 2012.

GUREVICH, A. et al. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 29, n. 8, p. 1072–5, abr. 2013.

HOFF, K. J.; STANKE, M. Predicting Genes in Single Genomes with AUGUSTUS. *Current Protocols in Bioinformatics*, p. e57, nov. 2018.

HOLT, C.; YANDELL, M. MAKER2: An annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects. *BMC Bioinformatics*, v. 12, n. 1, dez. 2011.

HUERTA-CEPAS, J. et al. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. *Molecular Biology and Evolution*, v. 34, n. 8, p. 2115–2122, ago. 2017.

JENSEN, L. J. et al. eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes. *Nucleic acids research*, v. 36, n. Database issue, p. D250-4, jan. 2008.

JONES, P. et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 2014.

KORF, I. Gene finding in novel genomes. *BMC bioinformatics*, v. 5, p. 59, maio 2004.

KOWALSKI, T.; GRABOWSKI, S.; DEOROWICZ, S. Indexing Arbitrary-Length k-Mers in Sequencing Reads. *PLOS ONE*, v. 10, n. 7, p. e0133198, 16 jul. 2015.

KULKARNI, P.; FROMMOLT, P. Challenges in the Setup of Large-scale Next-Generation Sequencing Analysis Workflows. *Computational and structural biotechnology journal*, v. 15, p. 471–477, 2017.

KYRIAKIDOU, M. et al. Current Strategies of Polyploid Plant Genome Sequence Assembly. *Frontiers in plant science*, v. 9, p. 1660, 2018.

LAGESEN, K. et al. RNAmmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. 9, p. 3100–3108, maio 2007.

LANTZ, H. et al. Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation. *F1000Research*, v. 7, 2018.

LASLETT, D.; CANBACK, B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic acids research*, v. 32, n. 1, p. 11–6, 2004.

LEEBENS-MACK, J. H. et al. One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. *Nature*, v. 574, n. 7780, p. 679–685, 2019.

LI, F.-W.; HARKESS, A. A guide to sequence your favorite plant genomes. *Applications in plant sciences*, v. 6, n. 3, p. e1030, mar. 2018.

LOWE, T. M.; EDDY, S. R. tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 5, p. 955–964, mar. 1997.

MAJOROS, W. H.; PERTEA, M.; SALZBERG, S. L. TigrScan and GlimmerHMM: two open source ab initio eukaryotic gene-finders. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 20, n. 16, p. 2878–9, nov. 2004.

MI, H. et al. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nature protocols*, v. 14, n. 3, p. 703–721, 2019.

MUKHERJEE, K. et al. Error correcting optical mapping data. *GigaScience*, v. 7, n. 6, jun. 2018.

NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS*, v. 29, n. 22, p. 2933–2935, 2013.

NUMANAGIĆ, I. et al. Fast characterization of segmental duplications in genome assemblies. set. 2018, [S.l.]: Oxford University Press, set. 2018. p. i706–i714.

O’LEARY, N. A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D733–D745, 2016.

PAAJANEN, P. et al. A critical comparison of technologies for a plant genome sequencing project. *GigaScience*, v. 8, n. 3, jan. 2019.

PATEL, R. K.; JAIN, M. NGS QC toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, fev. 2012.

SCHWACKE, R. et al. MapMan4: A Refined Protein Classification and Annotation Framework Applicable to Multi-Omics Data Analysis. *Molecular Plant*, v. 12, n. 6, p. 879–892, jun. 2019.

SOHN, J.-I.; NAM, J.-W. The present and future of de novo whole-genome assembly. *Briefings in bioinformatics*, v. 19, n. 1, p. 23–40, 2018.

STANKE, M.; WAACK, S. Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. 2003, [S.l.: s.n.], 2003.

SWEENEY, B. A. et al. RNAcentral: A hub of information for non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D221–D229, 2019.

WATERHOUSE, R. M. et al. BUSCO Applications from Quality Assessments to Gene Prediction and Phylogenomics. *Molecular biology and evolution*, v. 35, n. 3, p. 543–548, mar. 2018.

YANG, S.-F. et al. To Trim or Not to Trim: Effects of Read Trimming on the De Novo Genome Assembly of a Widespread East Asian Passerine, the Rufous-Capped Babbler (*Cyanoderma ruficeps* Blyth). *Genes*, v. 10, n. 10, p. 737, set. 2019.

YOU, F. M. et al. Chromosome-scale pseudomolecules refined by optical, physical and genetic maps in flax. *The Plant Journal*, v. 95, n. 2, p. 371–384, jul. 2018.

ZIMIN, A. V. et al. The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics*, v. 29, n. 21, p. 2669–2677, nov. 2013.



Apoio:

