UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Gilberto Luiz Dalagnol

CARACTERIZAÇÃO DA VARIAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA EM PLANTAS DE MACIEIRA E MORANGUEIRO OBTIDAS POR MEIO DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA CONVENCIONAL E MICROPROPAGAÇÃO

Florianópolis
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Gilberto Luiz Dalagnol

CARACTERIZAÇÃO DA VARIAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA EM PLANTAS DE MACIEIRA E MORANGUEIRO OBTIDAS POR MEIO DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA CONVENCIONAL E MICROPROPAGAÇÃO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências
Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari
Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Florianópolis

2010

Catalogação na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

D136c Dalagnol, Gilberto Luiz
Caracterização da variação genética e epigenética em plantas de macieira e morangueiro obtidas por meio de propagação vegetativa convencional e micropropagação [tese]
/ Gilberto Luiz Dalagnol ; orientador, Rubens Onofre Nodari. - Florianópolis, SC, 2010.
156 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1.Recursos genéticos vegetais. 2.Agricultura. 3.Plantas - Mutação. 4.Morango. 5.Maçã. I. Nodari, Rubens Onofre. II.Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.
III. Título.

CDU 631

Gilberto Luiz Dalagnol

Caracterização da variação genética e epigenética em plantas de macieira e morangueiro obtidas por meio de propagação vegetativa convencional e micropropagação

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de "Doutor em Ciências" e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis, 29 de junho de 2010.

_____
Prof. Maurício Sedrez do Reis, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

_____
Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.
Orientador
CCA – UFSC

_____
Prof. Miguel Pedro Guerra, Dr.
CCA – UFSC

_____
Prof. Maurício Sedrez do Reis, Dr.
CCA – UFSC

_____
Haroldo Tavares Elias, Dr.
Epagri

_____
Mário Angelo Vidor, Dr.
Epagri

Mary e Karine,
dedico a vocês, que foram minha inspiração maior na realização deste trabalho e meu porto sempre seguro.
Com amor.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Mary e minha filha Karine, pelo constante companheirismo, apoio e otimismo que nos motivavam sempre que o cansaço e a ansiedade vinham nos fazer companhia. Vocês foram a motivação maior na busca do "nosso" objetivo;

Ao Eng. Agrônomo Éder Petry pelo incentivo e otimismo constante,

Aos meus pais Antonio (in memorian) e Dorvalina e toda a nossa família, pelo incentivo e apoio incondicional;

Ao irmão, Méd. Vet. Celso A. Dalagnol, pelo incentivo e otimismo constante;

À Adriane Borges, pela confiança e incentivo externados constantemente;

Ao Iran Kroich (AMIGO com letras maiúsculas) e sua família, pelo incentivo, apoio e companheirismo;

Ao Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari, pela dedicação, "paciência" e pela valorosa contribuição na orientação deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra pela valiosa contribuição na co-orientação deste trabalho e participação na banca avaliadora;

Ao Dr. Antonio O. Lessa pela participação na idealização do projeto e na co-orientação nos trabalhos de micropropagação;

Ao Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis, pelo apoio na Coordenação do Curso e participação na banca avaliadora;

Aos colegas da Epagri Dr. Mário A. Vidor e Haroldo T. Elias pela atuação como pareceristas e participação na banca avaliadora;

Ao Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva, pela participação na avaliação do projeto, qualificação e atuação como parecerista;

Ao Dr. Rubens Marschalek, pela participação na avaliação do projeto;

Ao Dr. Valdir Stefenon e ao Dr. Leocir Welter, pelas inúmeras discussões, apoio e incentivo na execução das análises genéticas;

Aos colegas contemporrâneos da Biologia Molecular do LFDGV, especialmente ao Lírio Dal Vesco pela co-participação nas etapas experimentais e ao Gustavo Klabunde na execução das análises com o seqüenciador;

Aos colegas da Epagri que participaram e/ou incentivaram nosso trabalho;

À Epagri, pela oportunidade e pelo apoio financeiro, especialmente ao Diretor Dr. Edson Silva;

À Thabata (estagiária), pelo grande apoio na fase de extração de DNA;

À Cida e ao Rech, pelo apoio no Laboratório de Biotecnologia;

Aos Produtores Rurais Clóvis Camargo (Urupema) e Dalcir Pilatti (Lages) pela cessão do material vegetal utilizado neste trabalho;

Ao Alessandro Muniz (Urupema) e aos Eng. Agrônomos Ulisses de Arruda Córdova e Paulo Moacir Lunardi Baggio (Ext. Exp. Lages) que viabilizaram o acesso ao material vegetal junto aos citados produtores;

Ao Aleksander W. Muniz e Murilo Dalla Costa (companheiro de batalha), colegas do Laboratório de Biotecnologia, pelo incentivo, pelas constantes discussões e pelo apoio na revisão desta tese;

À UFSC/CCA/PPGRGV, pela oportunidade, pela confiança e pelo apoio financeiro na realização deste trabalho;

À FAPESC, pelo apoio financeiro;

A todos que participaram, com sugestões, opiniões ou mesmo com palavras de apoio e incentivo.

RESUMO

A ocorrência de variações genéticas e epigenéticas foi avaliada em clones de macieira e de morangueiro obtidos por via vegetativa convencional e micropropagação, em três ciclos de cultivo consecutivos. As plantas multiplicadas pelas duas modalidades foram caracterizadas quanto à fidelidade genotípica através de marcadores AFLP, visando detectar mutações, com a utilização de uma combinação de enzimas de restrição e uma combinação de iniciadores e MSAP, visando estimar o padrão de metilação, com a utilização de duas combinações de enzimas de restrição e uma combinação de iniciadores, bem como sua evolução ao longo dos ciclos de cultivo, comparando-as com a planta matriz. Foram feitas observações visuais em plantas de macieira com relação a: *i)* coloração pela antocianina na folha em crescimento; *ii)* posição folhas em relação ao caule; *iii)* comprimento folha; *iv)* largura folha; *v)* conformação da margem da folha; *vi)* flexibilidade dos ramos e em morangueiro, com relação a: *i)* forma dentes dos folíolos; *ii)* cor da folha; *iii)* posição da inflorescência em relação a folhagem, visando detectar a ocorrência de variações fenotípicas, nas duas modalidades de propagação. Os resultados obtidos indicam a ocorrência de variações genéticas, tanto na propagação vegetativa convencional como na micropropagação, variando de 3,7 a 100% das plantas analisadas e ainda, modificações no padrão de metilação, variando de 25 a 96,2% das plantas analisadas. Entretanto, estas variações não tiveram reflexo no fenótipo das plantas propagadas. O presente estudo indica que variações genéticas e epigenéticas são passsíveis de ocorrência quando plantas são submetidas à propagação vegetativa, seja via convencional, seja via micropropagação, com maior probabilidade de ocorrência quanto maior o número e a variação dos métodos envolvidos.

Palavras-chave: amplified fragments length polymorphism (AFLP), metilação, mutação, *Fragaria* x *ananassa*, *Malus prunifolia*.

ABSTRACT

The occurrence of genetic and epigenetic changes was evaluated in clones of apple and strawberry plants obtained by vegetative conventional and micropropagation in three consecutive crop cycles. The plants multiplied by the two methods were characterized as the genotypic fidelity by AFLP markers, to detect mutations, using a combination of restriction enzymes and a combination of primers and MSAP, to estimate the methylation pattern, with the use of two combinations of restriction enzymes and a combination of primers, as well as its evolution through the cycles of cultivation, comparing them with the mother plant. Visual observations were made on apple plants with respect to: i) staining anthocyanin in the leaf growth, ii) leaves position compared to stem iii) leaf length; iv) leaf width, v) leaf edge conformation vi) flexibility of the branches; and on strawberry, with respect to: i) tooth of leaflets form; ii) color sheet, iii) position of inflorescence in relation to foliage. All those observations were done to detect the occurrence of phenotypic variation in both propagation methods. The results indicate the occurrence of genetic variations, both in the vegetative propagation as in conventional micropropagation, ranging from 3.7 - 100% of plants tested and also changes in the pattern of methylation, ranging from 25 to 96.2% of the plants analyzed. No phenotypic variation was detected among plants propagated in relation to the mother plant. This study indicates that genetic and epigenetic changes are occurring when plants are subjected to vegetative propagation, whether conventional or micropropagation, are more likely to ocurrence, as much as the number ant the variation of methods involved.

Keywords: amplified fragments length polymorphism (AFLP), methylation, mutation, *Fragaria* x *ananassa*, *Malus prunifolia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do processo de propagação de macieira e morangueiro. 69

Figura 2 – Número total de plantas avaliadas (n) e percentual (%) de plantas mutantes e não mutantes de macieira, com relação a planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores AFLP. 83

Figura 3 – Número total de bandas analisadas (n), percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de mutação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação a partir fragmentos gerados por AFLP.. 85

Figura 4 – Número de fragmentos analisados (n), percentual de fragmentos polimórficos e não polimórficos detectados na análise de mutação dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação de plantas de macieira, a partir de fragmentos gerados por AFLP. 87

Figura 5 – Número total de plantas de macieira avaliadas (n) e percentual (%) de plantas com variação e sem variação no padrão de metilação, com relação à planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II**.** 90

Figura 6 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos polimórficos (que diferiram da planta matriz) e não polimórficos (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II**.** 91

Figura 7 – Número total de bandas analisadas (n) e percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II**.** 93

Figura 8 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos demetilados (que diferiram da planta matriz) e não demetilados (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II. 94

Figura 9 – Número total de plantas de macieira avaliadas (n) e percentual (%) de plantas com variação e sem variação no padrão de metilação, com relação à planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I. 97

Figura 10 – Número total de bandas analisadas (n) e percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I. 98

Figura 11 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos polimórficos (que diferiram da planta matriz) e não polimórficos (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I. 99

Figura 12 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos demetilados (que diferiram da planta matriz) e não demetilados (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I. 102

Figura 13 – Número total de plantas avaliadas (n) e percentuais (%) de plantas mutantes e não mutantes em morangueiro, com relação a planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores AFLP. .105

Figura 14 – Número total de bandas analisadas (n), percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de mutação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação a partir de fragmentos gerados por AFLP.....106

Figura 15 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos polimórficos (que diferiram da planta matriz) e não polimórficos (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de mutação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por AFLP. 108

Figura 16 – Número total de plantas avaliadas (n) e percentual (%) de plantas de morangueiro com alterações e sem alterações no padrão de metilação, com relação a planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores MSAP e digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II.....110

Figura 17 – Número total de bandas analisadas (n) e percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II. 112

Figura 18 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos polimórficos (que diferiram da planta matriz) e não polimórficos (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+ *Hpa*II.....113

Figura 19 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos demetilados (que diferiram da planta matriz) e não demetilados (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II. 114

Figura 20 – Número total de plantas avaliadas (n) e percentual (%) de plantas de morangueiro com alterações e sem alterações no padrão de metilação, com relação a planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores MSAP e digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I. 116

Figura 21 – Número total de bandas analisadas (n) e percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I.....118

Figura 22 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos polimórficos (que diferiram da planta matriz) e não polimórficos (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I. 119

Figura 23 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos demetilados (que diferiram da planta matriz) e não demetilados (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I. 120

Figura 24 – Folha de macieira em crescimento mostrando ausência de antocianina e bordas dentadas. 122

Figura 25 – Folhas abertas - disposição das folhas no ramo de macieira. 123

Figura 26 – Folhas de morangueiro micropropagado mostrando forma arredondada dos dentes dos folíolos. M - planta matriz, A - ciclo 1, B - ciclo 2, C - ciclo 3. 125

Figura 27 – Posição da inflorescência em relação ao caule de morangueiro. . 125

Figura 28 – Plantas de morangueiro de propagação convencional - forma arredondada dos dentes dos folíolos e coloração verde-escura. 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes utilizados na reação de digestão do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise AFLP. 74

Tabela 2 - Componentes utilizados na reação de ligação dos adaptadores no DNA genômico de macieira e morangueiro para reação AFLP. 74

Tabela 3 - Componentes utilizados na reação de pré-amplicação do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise AFLP. 75

Tabela 4 - Componentes utilizados na reação de amplificação seletiva do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise AFLP. 75

Tabela 5 - Componentes utilizados na reação de digestão do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise MSAP..... 76

Tabela 6 - Componentes utilizados na reação de ligação de adaptadores no DNA genômico dee macieira e morangueiro para análise MSAP. 77

Tabela 7 - Componentes utilizados na reação de pré-amplificação do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise MSAP..... 77

Tabela 8 - Componentes utilizados na reação de amplificação seletiva do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise MSAP. 78

Tabela 9 – Número de plantas mutantes e nível de significância pelo teste de x2, em três ciclos de cultivo em plantas de macieira obtidas por propagação convencional e micropropagação, digeridas com as enzimas *Eco*RI+*Mse*I. 81

Tabela 10 – Número de plantas com padrão de metilação alterado e nível de significância pelo teste de x2, em três ciclos de cultivo em plantas de macieira obtidas por propagação convencional e micropropagação, digeridas com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II..... 89

Tabela 11 - Número de plantas com padrão de metilação alterado e nível de significância pelo teste de x2, em três ciclos de cultivo em plantas de macieira obtidas por propagação convencional e micropropagação, digeridas com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I 95

Tabela 12 – Número de plantas mutantes e nível de significância pelo teste de x2, em três ciclos de cultivo em plantas de morangueiro obtidas por propagação convencional e micropropagação.....103

Tabela 13 - Estimativa da variação no padrão de metilação de DNA em plantas de morangueiro obtidas via propagação vegetativa convencional e micropropagação e digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI+*Hpa*II. 109

Tabela 14 – Estimativa do padrão de metilação de DNA em plantas de morangueiro obtidas via propagação vegetativa convencional e micropropagação e digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI+*Msp*I.....115

Tabela 15 - Descritores morfológicos* utilizados na caracterização fenotípica das plantas de macieira obtidas por propagação convencional e micropropagação (três ciclos de cultivo). 122

Tabela 16 - Descritores morfológicos* utilizados na caracterização fenotípica das plantas de morangueiro obtidas por propagação convencional e micropropagação (três ciclos de cultivo). 124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTAB – brometo de cetiltrimetilamonio
DNA – ácido desoxiribonucleico
EDTA – Ethylene DiamineTetrAcetic acid
DTT - dithiothreitol
***Eco*RI** – enzima de restrição extraída da *Escherichia coli*
***Mse*I** - enzima de restrição extraída da *Micrococcus* sp
***Hpa*II** - enzima de restrição extraída da *Hemophilus parainfluenza*
***Msp*I** – enzima de restrição extraída da *Moraxella* sp
AFLP – Amplified Fragments Length Polymorphism
MSAP – Methylation Sensitive Amplified Fragments
A - adenina
T - timina
C - citosina
G - guanina
5mC – citosina metilada
CpG – representação da ligação fosfodiester entre uma citosina e uma guanina
RFLP - Restriction Fragments Length Polymorphism
PCR – reação da polimerase em cadeia
RAPD – Random Amplified Polymorphirm DNA
SCARs - Sequence characterized amplified regions
5'-mCCGG-3' - metilação da citosina externa na referida seqüência de bases
5'-CmCGG-3' – metilação da citosina interna na referida seqüência de bases
g L^{-1} – grama por litro
mg L^{-1} – miligrama por litro
$\mu Molm^{-2}s^{-1}$ – micromol por metro quadrado por segundo
AIA – ácido indolacético
MS – meio de cultura Murashige & Skoog (1962)
GA_3 – ácido giberélico
ANA – ácida naftalenoacético
BAP - benzilaminopurina
NaCl – cloreto de sódio
mM - milimolar
PVP - polivinilpirolidona
CIA – clorofórmio:álcool isoamílico
rpm – rotações por minuto
mg mL^{-1} – miligrama por mililitro
TE – tampão [10 ml Tris-Cl 1 M)ph = 8,0), 2 ml EDTA 0,5 M (pH = 8,0), água milli-Q até 1000 ml]
TBE 1X – tampão composto por [10,8 g Tris base, 5,5 g ácido bórico, 4,0 ml EDTA 0,5 M (pH = 8,0), água milli-Q até 1000 ml]
Tampão 10 X – tampão para eletroforese [100 mM Tris HCl (pH = 8,3), 15 mM MgCl2, 500 mM KCl, água milli-Q até 1000 µl]

µl - microlitro
pmol – picomol
dNTPs - deoxyribonucleotide triphosphate
BSA – albumina bovina
ng µL^{-1} – nano grama por microlitro
ATP – adenosine triphosphate
$MgCl_2$ – cloreto de magnésio
TrisHAc – tampão tris acetato [1 M Tris HCl (pH = 8,3), 10 mM ATP, 1 M MgAc, 1 M KAc, 250 mM DTT, 10 mg/ml BSA, água milli-Q até 50 ml].

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 27

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 29

2.1. A cultura da macieira 29
2.2. A cultura do morangueiro 29
2.3. Propagação de plantas 31
2.3.1. Propagação vegetativa convencional 31
2.3.2. Micropropagação 32
2.4. Mutação em plantas regeneradas 35
2.5. Fatores associados à ocorrência de variação genética e epigenética 40
2.6. Eventos epigenéticos 44
2.6.1. Metilação do DNA 44
2.6.2. Demetilação do DNA 52
2.7. Epigênese e herdabilidade 53
2.8. Variação fenotípica 57
2.9. Dinamismo genômico 59
2.10. Detecção da variação genética e epigenética através de marcadores genéticos 61

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS 67

4. OBJETIVOS 67

4.1. Objetivo geral 67
4.2. Objetivos específicos 67

5. MATERIAL E MÉTODOS 68

5.1. Propagação vegetativa convencional 68
5.1.1. Macieira 68
5.1.2. Morangueiro 69
5.2. Micropropagação 70
5.2.1. Macieira 70
5.2.2. Morangueiro 71
5.3. Caracterização genética e epigenética 72
5.3.1. Extração de DNA 72
5.3.2. Estimativa da variação genética através de detecção de mutação no DNA 73
5.3.2.1. Digestão do DNA genômico com enzimas *Eco*RI+*Mse*I 73
5.3.2.2. Ligação de adaptadores 74
5.3.2.3. Reação de pré-amplificação 74
5.3.2.4. Reação de amplificação seletiva 75

5.3.3. Caracterização da variação epigenética através da alteração do padrão de metilação do DNA 76
5.3.3.1. Reação de digestão do DNA genômico com enzimas *Eco*RI+*Hpa*II/*Msp*I....76
5.3.3.2. Ligação de adaptadores....77
5.3.3.3. Reação de pré-amplificação....77
5.3.3.4. Reação de amplificação seletiva 78
5.3.4. Eletroforese de fragmentos de DNA....78
5.3.5. Variáveis analisadas e análise estatística 79
5.4. Avaliação fenotípica....80
5.4.1. Macieira....80
5.4.2. Morangueiro 80

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 81

6.1. Mutação em plantas de macieira obtidas via propagação vegetativa convencional e micropropagação 81
6.2. Padrão de metilação em macieira obtida via propagação vegetativa convencional e micropropagação 88
6.3. Mutação em plantas de morangueiro obtidas via propagação vegetativa convencional e micropropagação 103
6.4. Padrão de metilação de morangueiro obtido via propagação vegetativa convencional e micropropagação 109
6.5. Avaliação fenotípica....121
6.5.1. Macieira....121
6.5.2. Morangueiro 124

7. CONCLUSÕES 128

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS 129

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 132

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras culturas comerciais têm a via vegetativa como seu principal método de multiplicação, em função da baixa viabilidade ou esterilidade de suas sementes ou para assegurar a fidelidade genotípica. Isto ocorre na maioria das frutíferas, incluindo a macieira e o morangueiro. Ao longo dos anos, a propagação vegetativa convencional vem sendo utilizada nestas culturas, permitindo multiplicar genótipos com características desejáveis, sejam elas referentes a aparência, sabor, precocidade, valor nutricional, resistência a condições climáticas adversas, pragas e doenças, dentre outras.

Além disso, esta estratégia permite a clonagem de genótipos fixando ganhos genéticos pela captura dos componentes totais da variância genética. É prática largamente utilizada na área florestal, fruticultura, forrageiras, dentre outras, seja por meio de estacas, estolões, fracionamento de touceiras, enxertia ou outras modalidades.

A micropropagação de plantas, definida como a propagação clonal de um genótipo selecionado por técnicas de cultura in vitro, permite a obtenção de grande quantidade de matrizes/mudas em curto espaço de tempo e a multiplicação de materiais de difícil obtenção através de meios tradicionais. Outra vantagem é a possibilidade de realizar a desinfecção e indexação do material vegetal antes da multiplicação, permitindo assim, que se obtenham clones livres de patógenos (viroses, principalmente), com reflexo direto na produtividade da lavoura comercial cultivada com estes genótipos.

Teoricamente, esta clonagem é altamente fidedigna. Contudo, mutantes (ou variantes) podem ocorrer durante o processo (CHUANG et al., 2009).

A caracterização genética dos materiais produzidos nas sucessivas gerações de cultivo não é prática rotineira na maioria dos sistemas de produção de mudas, não tendo um monitoramento de possíveis variações que ocorram durante o processo e, portanto, sem definição quanto ao número de gerações de multiplicação que podem ser executadas sem que o material vegetal resultante tenha modificações nas suas características. Estas variações podem ter maior ocorrência na micropropagação, em função das condições de cultivo as quais as plantas são submetidas.

Nos métodos tradicionais, espera-se menor probabilidade de ocorrência de variações, não sendo, no entanto, descartado o aparecimento das mesmas, principalmente quando se executa sucessivos ciclos de clonagem a partir de uma única fonte. Por outro lado, a propagação

clonal massal constitui-se em importante ferramenta no melhoramento genético e tem se mostrado de grande utilidade na promoção de características desejáveis, sobretudo no que diz respeito à uniformização de atributos e a velocidade com que o melhoramento das espécies é desenvolvido.

O conceito de propagação clonal implica na seleção de genótipos com graus variados de heterozigose e sua fixação nas gerações subseqüentes. Clones são empregados no melhoramento de plantas para capturar os componentes aditivos e não-aditivos da variância genética. Os componentes aditivos da variância genética baseiam-se no efeito independente dos alelos, enquanto que os efeitos não-aditivos, muitas vezes perdidos nos cruzamentos sexuais, baseiam-se na interação dos alelos, dentro ou entre locos.

Uma das maiores vantagens da propagação clonal é a possibilidade de se explorar a variância genética total, ao invés do componente aditivo apenas. Enquanto no melhoramento convencional a fixação dos ganhos genéticos tende a ocorrer nas gerações subseqüentes, na micropropagação a exploração da variação genética ocorre em uma geração, através da clonagem de genótipos superiores (GUERRA & NODARI, 2003).

A caracterização molecular dos materiais produzidos nas sucessivas gerações de cultivo é fundamental na produção de mudas por propagação vegetativa, uma vez que permite monitorar as variações que porventura venham ocorrer durante o processo, permitindo definir o número de gerações que um determinado genótipo possa ser multiplicado sem perder a identidade genética.

A fidelidade genotípica é um dos fatores considerados quando se analisa a qualidade das mudas. Assim, conhecer este fenômeno tem não só um apelo científico, como também, uma aplicação prática, de grande importância, uma vez que diversas espécies cultivadas, especialmente no Estado de Santa Catarina são multiplicadas desta forma, as quais são responsáveis por considerável volume da produção e renda do setor agrícola, dentre as quais estão as culturas da macieira e do morangueiro, cuja importância econômica e social é acentuada no setor produtivo catarinense.

A utilização de marcadores moleculares possibilitou estimar o nível da variação genética e epigenética, que aliadas a caracterização fenotípica, permitiram avaliar a fidelidade genotípica dos materiais vegetais de macieira e morangueiro obtidos por meio de propagação vegetativa convencional e micropropagação ao longo de três ciclos de cultivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura da macieira

A maçã ocupa lugar de destaque no cenário nacional em função da popularidade que adquiriu, devido ao seu atrativo visual e sabor e a campanhas publicitárias de que foi alvo, visando valorizar o produto nacional frente as constantes importações.

A cultura da macieira (Malus prunifolia Willd, Borkh) é cultivada principalmente nas áreas subtropicais do Brasil, o que justifica sua presença na região Sul do Brasil, especialmente nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, abrangendo cerca de 96,6% da área cultivada no Brasil. Os dados obtidos com a produção brasileira na safra 2008/2009 alcançaram 1.220.449 toneladas da fruta, numa área colhida de 38.041 hectares (IBGE, 2010).

O estado de Santa Catarina contribuiu com uma produção em torno de 622.501 toneladas, representando cerca de 51,0% da produção nacional, numa área colhida de 19.817 hectares. Já o estado do Rio Grande do Sul, aparece como segundo produtor nacional da fruta, com uma produção de cerca de 556.560, representando cerca de 45,6% da produção nacional, provinda de uma área de 16.278 hectares (IBGE, 2010).

Tomando-se como base o preço médio praticado no CEAGESP no período de janeiro a junho de 2009, juntos, os dois estados arrecadaram cerca de R$ 1.131.894,00 com a comercialização do volume produzido (IBGE, 2010).

Juntando-se a isto os recursos referentes a gastos com insumos, mão-de-obra, transporte, impostos, dentre outros, pode se ter idéia do volume monetário que esta cultura movimenta anualmente no país. Outro grande benefício que esta cultura traz é o alto contingente de mão-de-obra exigido, dando a oportunidade de emprego a um elevado número de trabalhadores.

2.2. A cultura do morangueiro

Na cultura do morangueiro (Fragaria x ananassa Duchesne) o Brasil ainda não aparece nas estatísticas entre os grandes produtores mundiais, mas começa a se destacar, devido às condições naturais favoráveis para o cultivo e pela produção em quase todos os meses do ano.

Em 2006, o País produziu cerca de 100 mil toneladas, provindas de uma área aproximada de 3.500 hectares (ANTUNES & REISSER JÚNIOR, 2007). Esta produção é quase toda voltada para o mercado doméstico, sendo cerca de 70% destinada ao consumo in natura e 30% ao processamento. No Brasil, a cultura do morangueiro é uma importante atividade de famílias de pequenos e médios agricultores. No Estado do Rio Grande do Sul, embora cultivado há muitos anos, a partir da década de 1990 passou a ter importância comercial, ocupando grande contingente de mão-de-obra, sendo de grande importância econômica e social (FERLA et al., 2007). O Rio Grande do Sul é o terceiro produtor nacional, onde são cultivados 420 hectares (ANTUNES & REISSER JUNIOR, 2007) se tem registrado crescimento na área plantada e na produção. Na safra 2005/2006 o Estado produziu cerca de 10 mil toneladas e na safra 2006/2007, cerca de 16.000 toneladas (MADAIL, 2008).

Em Santa Catarina, sexto produtor nacional (MADAIL, 2008), num levantamento coordenado por Nesi et al. (2006) observou-se que, comercialmente, a cultura está distribuída em 29 municípios, que somam 363 produtores e cultivam 128,6 ha. A produtividade média de frutos no Estado varia entre 12 e 60 t/ha, com média de 28,4 t/ha, variando em função do clima das regiões e do sistema de cultivo adotado. Os municípios de Rancho Queimado (210 produtores e 55 ha), Águas Mornas (80 produtores e 25 ha), e Água Doce (01 produtor e 21ha), respondem por 78,5% da área com morangos no estado, com uma produtividade média de frutos acima de 45 t/ha. Produtores com áreas inferiores a 1ha totalizam menos de 5 ha, correspondem a 14,3% do total.

Uma das principais cultivares exploradas no Estado é a Aromas (NESI et al. 2006).

Segundo Antunes & Reisser Junior (2007) esta cultivar ocupa cerca de 4% da área cultivada no Brasil. A referida cultivar foi obtida na Universidade da Califórnia, em 1997. Cultivar muito produtiva, com hábito de crescimento ereto, frutos de tamanho grande, coloração vermelha-escura, sabor agradável e qualidade excelente para consumo in natura e também para industrialização. A cultivar é medianamente resistente ao oídio e à antracnose, e moderadamente suscetível à verticilose. Apresenta boa resistência às variações nas condições ambientais (SHASTA NURSERY, 2004; UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 2005a).

2.3. Propagação de plantas

2.3.1. Propagação vegetativa convencional

A propagação vegetativa apresenta como principal vantagem a possibilidade de ganhos genéticos maiores do que na reprodução via semente (GRAÇA et al., 1990). O plantio de mudas produzidas via propagação vegetativa apresentam grande uniformidade, quando as condições de solo e clima são semelhantes às da origem do material genético selecionado, possibilitando maiores produtividades e uniformidade de crescimento, além de uma série de características desejáveis, como resistência a pragas e doenças, melhor aproveitamento de recursos hídricos e nutricionais do solo, entre outros (ELDRIGE et al., 1994).

A propagação vegetativa ou clonagem consiste em multiplicar assexuadamente partes das plantas (células, tecidos, órgãos ou propágulos), de modo a gerar indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz (FERRARI ET AL., 2004). Baseia-se na capacidade que certas estruturas vegetativas possuem de formar um novo indivíduo completo (WENDLING et al., 2005).

Um clone se define como um material geneticamente uniforme derivado de apenas um indivíduo e propagado exclusivamente por meios vegetativos (HARTMANN et al., 2002). Todas as características da planta-matriz são transferidas para a nova planta, no entanto, fatores ambientais, tipo de solo e ataque de enfermidades podem modificar a morfologia da planta, flores e frutos produzidos.

Existem vários métodos para a clonagem de plantas, dentre os quais se destaca a estaquia, a miniestaquia, a microestaquia, a mergulhia, a enxertia e a micropropagação. A escolha do método varia de acordo com o objetivo, a espécie envolvida, a época do ano, a habilidade do executor, o tipo e a quantidade de material disponível, as condições ambientais, a disponibilidade de recursos físicos, financeiros e humanos, dentre outros (WENDLING et al., 2005).

A estaquia apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos, como a rapidez, a simplicidade (não necessita técnicas especiais), o baixo custo, não ocasiona incompatibilidade, proporciona maior uniformidade e possibilita maior número de plantas por matriz (HIGA, 1983).

Como a técnica de estaquia proporciona homogeneidade dos genótipos, o manejo é facilitado por meio do entendimento da competição, além de permitir a definição de parâmetros genéticos e estudos nutricionais e fenológicos da espécie (FERRARI et al., 2004).

O conhecimento dos fatores que afetam a regeneração e, conseqüentemente, a formação de raízes são importantes para a explicação da dificuldade ou facilidade de enraizamento de estacas de uma espécie. O adequado manejo desses fatores pode proporcionar maiores chances de sucesso na produção de mudas por estaquia (PICHET, 1997).

Biswas et al. (2008) enfatizam as limitações da propagação vegetativa convencional de plantas, especialmente o morangueiro, principalmente quanto a presença de patógenos no material a ser propagado, cuja infecção seria mantida através dos ciclos de cultivo, tendendo a acentuar e degenerar gradualmente a performance das cultivares.

Alternativamente, a micropropagação viria como uma opção viável, propiciando a eliminação deste tipo de contaminantes, através de termoterapia, aplicada antes da propagação, permitindo obter regenerantes com alto nível sanitário.

2.3.2. Micropropagação

A micropropagação é uma técnica de grande aplicação na agricultura e tem proporcionado grandes benefícios na propagação de plantas. É feita a partir de um explante, o qual pode ser um fragmento de folha, raiz, caule ou outro tecido, que responda as condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração in vitro. Essa regeneração fundamenta-se na capacidade das células vegetais proliferarem-se e organizarem-se em tecidos e, eventualmente em plantas completas (MANTELL et al., 1994; KERBAUY, 1997).

A base celular desta capacidade regenerativa se fundamenta na totipotência das células das plantas, significando que as células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados. Todavia, a capacidade regenerativa de muitas espécies ainda não foi evidenciada na prática (KERBAUY, 1999).

As rotas regenerativas utilizadas na micropropagação são a organogênese e a embriogênese somática. A organogênese é uma via de desenvolvimento, na qual órgãos vegetais (brotos, raízes) são induzidos à diferenciação a partir de uma ou várias células. A organogênese pode ser direta ou indireta. Na organogênese direta, também chamada de adventícia, o órgão vegetal é induzido e desenvolvido diretamente de um explante, normalmente a partir de tecidos meristemáticos. Na indireta, há a fase inicial de proliferação e crescimento de calo (massa celular com crescimento desordenado) seguido pela indução de brotos ou raí-

zes. A vantagem da via direta é que, além da economia de tempo, elimina-se o risco de ocorrência de variação somaclonal, que é associada a longos períodos de cultura de calos (MANTELL et al., 1994).

Quando segmentos de plantas são transferidos para meio nutritivo, novos brotos, raízes, embriões somáticos e primórdios florais são freqüentemente formados sem a formação de calos. Muitas espécies dão origem a brotos adventícios nos explantes oriundos de vários órgãos, incluindo aqueles derivados de pecíolos, caules, raízes, folhas e cotilédones. Em contraste, embriões adventícios formados de maneira direta são menos freqüentes. Eles são produzidos nas folhas de algumas espécies (poucas) e mais freqüentemente no tecido nucelar ou embriões somáticos pré-formados (GEORGE, 1993).

O desenvolvimento de um protocolo para organogênese in vitro será facilitado se forem seguidos alguns princípios fisiológicos. A fonte de explante é um fator importante no sucesso da regeneração, pois a capacidade de regeneração depende da maturidade, do estádio fisiológico e do tecido utilizado. Melhores resultados tendem a ser alcançados se forem utilizados tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogenética (PEREZ, 2002.

Explantes que contém tecidos meristemáticos são preferidos e eles são encontrados em gemas apicais e axilares. As raízes constituem uma ampla fonte de tecidos meristemáticos, as quais possuem tecidos meristemáticos nos ápices, além do próprio periciclo ser um tecido meristemático. Um fator limitante para sua utilização deve-se ao fato de algumas espécies parecem ter raízes com extrema determinação para continuar se desenvolvendo como raízes, sendo difícil, nestas, a formação de gemas caulinares (PEREZ, 2002).

Diferentemente da organogênese, a embriogênese somática é definida como o processo no qual uma estrutura bipolar semelhante a um embrião zigótico desenvolve-se de uma célula não zigótica sem a conexão vascular com o tecido original (CHAKRABARTY et al., 2003). A embriogênese somática pode ser natural e in vitro ou induzida. No primeiro caso, células dos tecidos embrionários podem ser direcionadas para esta rota de desenvolvimento morfogenético, como é o caso do sistema da embriogenia adventícia ou nucelar em *Citrus* sp, onde os embriões apomíticos originam-se por gemação a partir de células do nucelo que representam o genoma materno.

Na embriogênese somática in vitro ou induzida, células haplóides ou diplóides (somáticas) em diferentes estágios de diferenciação podem ser adequadamente induzidas por estímulos ambientais ou químicos, serem reprogramadas e adquirirem novas competências morfogenéticas.

A embriogênese somática in vitro é um método importante para propagação massal clonal de genótipos superiores. Além disto, é uma técnica de grande aplicabilidade para os estudos básicos relacionados com a fisiologia, genética e bioquímica do desenvolvimento embrionário (GUERRA et al., 1999).

A embriogênese somática desempenha um significativo papel na transformação genética, hibridização somática e variação somaclonal, considerando-se que a expressão diferencial de um gene em células somáticas envolve a mudança na programação de desenvolvimento dessas células, conferindo-lhes a capacidade de manifestar o potencial embriogênico (ZENG et al., 2006).

Dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática são comumente observados in vitro. O primeiro corresponde ao modelo direto no qual embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários de calos. Este padrão ocorre, por exemplo, em células nucelares de variedades poliembriônicas de citrus. O segundo padrão corresponde ao modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário (calo), que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação e consequentemente, com diferentes graus de determinação. Estas células podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (GUERRA et al., 1999). A reprogramação de tecidos somáticos para diferenciação é acompanhada por reprogramação da expressão gênica necessária para o desenvolvimento (HECHT et al., 2001).

A indução de embriogênese somática consiste na suspensão do padrão de expressão gênica ocorrente no explante do tecido e sua substituição por um programa de expressão embriogênica. e a caracterização da expressão gênica durante a germinação, maturação e desenvolvimento do embrião têm levado à identificação de diversos genes que regulam o desenvolvimento (von ARNOLD et al., 2002).

.Tem sido proposto que os reguladores de crescimento desempenham um papel fundamental na mediação dos sinais de transdução, levando à reprogramação da expressão gênica (von ARNOLD et al., 2002).

É interessante notar que variedades de uma mesma espécie respondem de maneira diferente as condições de cultivo. No entanto, alguns autores consideram que toda espécie e toda cultivar são capazes de responder as condições de cultivo in vitro, desde que seja utilizada uma combinação correta dos demais fatores que afetam a regeneração in vitro (MANTELL et al., 1994).

As condições de cultivo, principalmente o meio de cultura, são também decisivas para o sucesso da regeneração in vitro. O tipo, concentração e combinação de reguladores de crescimento no meio de cultura podem afetar grandemente a formação e subsequente indução da brotação (MITHILA et al. 2003; THAO et al. 2003).

O meio de cultura é constituído de sais minerais (micro e macronutrientes), nitrogênio reduzido, uma fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento, necessários para manter a divisão celular e a proliferação de explantes. A combinação adequada destes componentes, associada às demais condições de cultivo, como luz (intensidade, qualidade e fotoperíodo), temperatura e recipiente (tamanho, permeabilidade a trocas gasosas) são a base da tecnologia da micropropagação de vegetais (KERBAUY, 1997). Contudo, os componentes mais críticos adicionados ao meio são os hormônios vegetais, especialmente as auxinas e citocininas (PEREZ, 2002).

2.4. Mutação em plantas regeneradas

É constante a busca por novos genótipos no melhoramento genético, pois a necessidade de melhorar determinadas características é crescente, sejam elas relativas a aparência, sabor, valor nutricional, produtividade, dentre outras.

Uma vez identificado um genótipo com as características desejadas, a propagação vegetativa clonal (assexual) é um método recomendado para manter e multiplicar o genótipo desejado para implantação de áreas de cultivo. Embora a propagação clonal vegetativa esteja associada à estabilidade genética, a ocorrência de mutações somáticas pode dar origem a plantas “da mesma cultivar” com características diferentes (REVERS, 2007).

De acordo com Cullis (2005), o surgimento de variantes somaclonais pode não ser um processo exclusivo da micropropagação, mas, pode ocorrer de maneira natural em plantas e tecidos reprodutivos.

Uma célula é dita ter sofrido uma mutação quando sua composição genética é expontânea e inesperadamante alterada sem a formação e fusão de gametas sexuais. Mutações podem ocorrer através de alterações no cariótipo, envolvendo um ou mais cromossomos ou através de pequenas mudanças na estrutura ou posição de um ou mais genes (GEORGE, 1993).

Diversas cultivares comerciais de macieira é resultado de mutações espontâneas de cultivares utilizadas em pomares comeciais. A

cultivar Royal Gala é uma mutação espontânea da 'Gala', apresentando frutos de coloração vermelho-estriada brilhante. A cultivar Suprema é uma mutação somática de um ramo de 'Fuji', apresenta frutos bastante vermelhos, sendo que esta coloração cobre mais de 80% da superfície do fruto (CAMILO & DENARDI, 2002).

Em 1982, em um dos pomares de macieira enxertado sobre o porta-enxerto MM-106, na Estação Experimental de Videira/Epagri, observou-se que uma planta da cultivar Gala apresentava um ramo com frutos de coloração vermelho-sólida, sem estrias. Após testes para verificar a estabilidade deste material, conclui-se ser fruto de uma mutação espontânea e isto culminou com o lançamento da cultivar Epagri 407-Lisgala (DENARDI et al., 1997).

Em 1999 no município de Monte Castelo, Santa Catarina detectou-se um ramo de uma planta da cultivar Gala com brotação precoce. Após testes de estabilidade deste material concluiu-se ser uma mutação espontânea, com exigência em torno de 380 horas de temperatura menor ou igual a 7,2°C e colheita antecipada de 20 – 25 dias com relação a Gala, a qual foi denominada Castel Gala (DENARDI & SECCON, 2005).

Outra descoberta foi a videira cultivar Redimeire, originária de mutação somática espontânea da cultivar Rubi, que apresenta as mesmas características da planta que a originou e bagas mais longas (NACHTIGAL & CAMARGO, 2005).

A micropropagação é reconhecida como uma ferramenta eficiente para multiplicação clonal massal. Quando protocolos de multiplicação são empregados para a clonagem de genótipos, espera-se que todas as plantas obtidas tenham o mesmo genótipo, mas, a idéia de que a micropropagação seria apenas uma técnica para propagar rapidamente plantas de maneira clonal e estável não é apropriada, pois traz a possibilidade da ocorrência de variação somaclonal (ILLG, 1990).

Para Phillips et al. (1994), a micropropagação parece ser uma técnica claramente mutagênica.

Embora alguns regenerantes obtidos pareçam normais, uma proporção significativa das plantas pode ter características alteradas, com relação ao explante. Larkin & Scowcroft (1981) detalharam várias fontes de variação em plantas regeneradas. Estes autores consideraram que plantas derivadas da micropropagação poderiam ser chamadas somaclones e a variação genética produzida nestes clones poderia ser chamada de variação somaclonal.

A micropropagação de plantas pode induzir ou manifestar diferenças entre células, tecidos ou órgãos criando desse modo variação

dentro das culturas ou entre plantas derivadas destas. Algumas ou todas as plantas regeneradas podem ser fisicamente diferentes da qual derivaram (GEORGE, 1993).

Variações deste gênero, as quais normalmente ocorrem de maneira espontânea e dificilmente podem ser controladas ou dirigidas, podem ser de duas formas; aquelas causadas por células que sofreram mudanças genéticas persistentes e aquelas causadas por mudanças temporárias em células ou tecidos, as quais são induzidas geneticamente ou pelo ambiente (GEORGE, 1993).

Ocasionalmente variantes genéticos podem ocorrer a partir de qualquer forma de micropropagação. Algumas mudanças são epigenéticas (LARKIN & SCOWCROFT, 1981), não herdáveis, causadas pelas próprias condições de estresse fisiológico, as quais são submetidas tanto as células em cultura, quanto as plantas regeneradas in vitro (ILLG, 1990); enquanto outras são hereditárias e então denominadas de variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981).

Variação somaclonal é um fenômeno comum em cultivo de células de plantas e inclui variações entre plantas ou células oriundas de cultura de tecidos (SKIRVIN et al., 1993).

A variação somaclonal se origina basicamente de alterações no número de cromossomos, duplicação gênica, quebras de cromossomos, deleções, rearranjos do genoma e substituição de nucleotídeos (KAEPPLER et al. 2000; KAWATA et al., 1995; PHILLIPS et al. 1994; PESCHKE & PHILLIPS 1992; LARKIN & SCOWCROFT, 1981;).

Movimentação de transposons e mudanças na metilação do DNA (KOUKALOVA et al. 2005, KUBIS et al. 2003, SMULDERS et al. 1995), possivelmente através da ação de RNA de interferência (LIPPMAN et al. 2003), também tem sido apontados como potenciais mecanismos de variação somaclonal.

Essa variação é manifestada por meio de anormalidades citológicas, mutações fenotípicas qualitativas e quantitativas, mudanças na seqüência, ativação e silenciamento de genes (KAEPPLER et al., 2000).

A ativação de transposons e retrotransposons indica que mudanças epigenéticas ocorrem no processo de micropropagação. Além disso, a ativação epigenética de elementos do DNA sugere que mudanças epigenéticas podem também estar envolvidas na instabilidade citogenética, decorrentes de modificação na cromatina e como base da variação fenotípica pela modulação da função gênica (KAEPPLER et al., 2000).

A heterogeneidade espacial, a instabilidade temporal, a transmissão sexual não Mendeliana e a ausência de defeito detectável na organização do DNA são algumas das anormalidades observadas que supor-

tam a hipótese de uma alteração epigenética na expressão genômica, proposta para explanar a origem de variantes em plantas (RIVAL et al., 2002).

As células não utilizam todas as informações genéticas ao mesmo tempo. Alguns genes podem funcionar constitutivamente e outros, somente em ocasiões específicas (GEORGE, 1993).

A expressão gênica é regulada pelo ambiente no qual as células se encontram. Muitas mudanças ocorrem temporariamente, em resposta a um estímulo e desaparecem quando este é suspenso. Estas variações freqüentemente resultam da expressão de genes em algumas células, os quais não estão normalmente ativos. Isto pode ocorrer também devido as substâncias reguladoras de crescimento de um subcultivo para outro ou de material em cultivo para plantas estabelecidas em casa de vegetação ou a campo (GEORGE, 1993).

Não é esperado que ocorra instabilidade genética na estimulação do desenvolvimento de gemas axilares, uma vez que esta técnica utiliza a rota ontogênica normal para crescimento dos ramos dos meristemas laterais. Entretanto, a regeneração de plantas produzidas por micropropagação de secções sem a formação prévia de meristema (origem adventícia) (PHILLIPS et al., 1994) ou derivadas de calos ou culturas celulares (origem de novo) (DAMASCO et al., 1996); é mais suscetível à variação somaclonal (FINNEGAN et al., 1996), do que a propagação vegetativa por métodos convencionais.

Quando o processo de micropropagação passa pela fase de calo existe o risco da ocorrência de variação somaclonal, embora não seja usual para todas as plantas regeneradas de calos ou culturas em suspensão serem geneticamente diferentes da planta que lhe deu origem (GEORGE, 1993).

Em algumas ocasiões, uma espécie pode manter a integridade genética, enquanto em outras, parte pode ser composta por células alteradas geneticamente. Células com cariótipos não modificados são mais prováveis de ter maior potencial para organogênese que aquelas que são mutadas (GEORGE, 1993).

O “background” genético de uma planta tem forte influência no grau de variação resultante da micropropagação. Mesmo genótipos extremamente relacionados podem diferir quanto a este aspecto (GEORGE, 1993).

Variação na metilação do DNA induzida pela micropropagação tem sido sugerida como um mecanismo molecular básico para variação somaclonal (KAEPPLER et al., 2000).

Müller et al. (1990) relatam que a maioría das variações somaclonais estariam direta ou indiretamente relacionadas à variação do estado de metilacão do DNA. Certas seqüências mostram mais variação que outras, sugerindo que a variação pode não ser ao acaso entre seqüências de cópia simples.

Deve-se determinar se a mudança na metilação do DNA é a causa base da variação induzida pela micropropagação ou somente outro sintoma (KAEPPLER & PHILLIPS, 1993b).

A micropropagação através da embriogênese somática tem sido aplicada por diversos anos para a multiplicação de genótipos elite de palma oleífera (Elaeis guineensis Jacq.) (RIVAL et al., 1996). Entretanto, o uso desta técnica tem sido dificultada pela ocorrência de genótipos apresentando uma anormalidade no florescimento, conhecida como "mantled", o qual é observado em aproximadamente 5 – 10% dos clones regenerados (TREGEAR et al., 2002).

Segundo Rival et al. (1998b), esta variação pode exibir uma heterogeneidade marcante na sua ocorrência e intensidade entre diferentes linhas clonais, entre plantas da mesma linha clonal e entre diferentes flores do mesmo indivíduo e isto pode resultar em esterilidade parcial ou total, dependendo da severidade da anormalidade, afetando diretamente a produção de óleo.

Um aspecto interessante é que ao longo do tempo, tem sido detectada a reversão desta anormalidade, levando a reconversão de 100% para o fenótipo normal, quando os indivíduos são levemente "mantled" e de 50% quando os indivíduos são severamente "mantled", após nove anos de cultivo a campo (RIVAL et al., 1998b).

A metilação tem sido utilizada para discriminar regenerantes com variações dos regenerantes normais em palmas adultas. Foram investigadas as taxas de metilação do DNA genômico em plantas derivadas de embriões somáticos, comparando regenerantes normais e regenerantes com variações dentro da mesma linha clonal, onde se detectou taxas de metilação variando de 20 a 25%. Em algumas linhas clonais a análise de DNA foliar revelou substancial demetilação em palmas severamente "mantled". Posteriormente, clones originados de calos nodulares compactos exibiram fenótipos "mantled" numa taxa média de 5%, enquanto que plantas derivadas de calos de crescimento rápido atingiram 100%. Uma hipometilação significativa foi detectada em calos de crescimento rápido quando comparada a taxa observada em calos nodulares compactos da mesma linha clonal (RIVAL et al., 2000).

A variação somaclonal está presente na maioria das espécies estudadas e afeta inúmeras características, sendo que as principais são as

alterações do padrão morfológico, pigmentação, taxa de crescimento, produção de alcalóides e mudanças na produção e habituação a auxinas e citocininas (LARKIN & SCOWCROFT, 1981), albinismo, sensibilidade ao fotoperíodo e produção (KARP & BRIGHT, 1985).

É difícil prever a ocorrência de variação somaclonal e pouco se sabe sobre formas de prevení-la. Devem-se buscar metodologias adequadas para identificar tais variações na micropropagação das culturas de interesse, desenvolvendo protocolos que permitam minimizar seu surgimento, quando se deseja estabilidade ou, para quantificá-la, quando se deseja utilizá-la em programas de melhoramento genético.

2.5. Fatores associados à ocorrência de variação genética e epigenética

A seleção do explante, idade da cultura, genótipo, tempo e número de subcultivos, uso de fitormônios, composição do meio, condições de cultivo e método de regeneração são aspectos de grande importância na estabilidade genética de plantas regeneradas através da micropropagação (SILVAROLLA, 1992; ROUT et al., 2006).

Em micropropagação de *Chrysanthemum* o genótipo tem sido apontado como o mais importante fator ligado a variação (MARTIN et al. 2002; MINANO et al. 2009). Conclusões similares foram obtidas em outras culturas, como em espécies de *Solanum* (BORDALLO et al., 2004; AVERSANO et al., 2009).

Singh & Pandey (2004) micropropagando cultivares de morangueiro, observaram que a capacidade organogenética variou entre genótipos, confirmando as informações obtidas por Roy (1980), o qual detectou que calos de duas espécies de *Allium* (A.tuberosum e A. cepa) responderam de maneira diferente à pressão seletiva em condições similares de cultivo.

A susceptibilidade a variações genéticas pode diferir entre variedades dentro das espécies. Em variedades de aipo de polinização aberta, por exemplo, a proporção de células diplóides, aneuplóides e poliplóides em cultura de calos variou entre aquelas oriundas de diferentes plantas mãe (BROWERS & ORTON, 1982).

Distúrbios genéticos têm sido detectados em células e cultivo de calos de uma grande variedade de plantas, mas sua ocorrência e extensão dependem da constituição genética das células em cultivo. As plantas regeneradas de calos geneticamente variáveis são mais prováveis de serem variantes do que aquelas derivadas de linhagens estáveis. A pro-

porção de plantas alteradas geneticamente, obtidas via morfogênese indireta é altamente dependente do genótipo. A extensão da mutação pode também depender da linhagem de calos que é cultivada, mostrando que algumas mudanças genéticas têm maior probabilidade de gerar variações que outras (GEORGE, 1993).

Em plantas regeneradas através de protoplastos, as poliplóides apresentavam maior instabilidade genética (FISH & KARP, 1986).

Plantas foram regeneradas a partir protoplastos de batatas dihaplóides e tetraplóides. Todos os regenerantes de dihaplóide mostraram variação no número de cromossomos, enquanto somente parte destas apresentaram variação na morfologia da planta. Em batata tetraplóide, 60 % dos regenerantes mostraram variação no número de cromossomos e todos exibiram mudanças fenotípicas (RAMULU et al., 1986).

Em cevada, poliploidia, aneuploidia e quebras cromossômicas foram descritas em calos derivados de embrião imaturo (Singh, 1986), mas as plantas regeneradas apresentavam marcante uniformidade, com pouca ou nenhuma variação (GAPONENKO et al., 1988).

Baixas freqüências de poliploidia e aneuploidia foram constatadas em outros cereais diplóides como arroz (SUN et al., 1983) e *Pennisetum americanum* (SWEDLUND & VASIL, 1985).

Em espécies diplóides, particularmente aquelas com baixo número de cromossomos, é possível manter o nível de ploidia durante muitos subcultivos, sendo menor a probabilidade de ocorrência de mudanças cariotípicas. Subcultivos freqüentes e/ou o isolamento e subcultivo de nódulos meristemáticos parecem oferecer a melhor maneira de precaver quanto a mudanças no número de cromossomos (GEORGE, 1993).

Verhoeven et al. (2010) utilizaram o método MSAP para detectar mudanças no padrão de metilação na formação de novas linhagens triplóides de dente-de-leão, resultantes de cruzamento de linhagens diplóides e triplóides. Segundo os autores, as progênies resultantes mostraram diferentes mudanças no padrão de metilação em cada linhagem triplóide, gerando novas variações entre linhagens que foram transmitidas estavelmente através das gerações.

A fonte de explante é considerada um dos fatores críticos para variação somaclonal. Uma vez que os explantes podem apresentar taxas de regeneração diferentes, procedimentos de seleção podem diferir entre diferentes tipos (DE JONG & CUSTERS (1986). Estes autores observaram diferenças na variação somaclonal em plantas derivadas de pétalas e pedicelos de *Chrysanthemum*, sendo que as derivadas de pétalas apresentavam maior taxa de variação genética que as derivadas de ápices.

Kasperbauer & Collins (1972) verificaram que plantas de tabaco regeneradas de nervuras centrais de folhas jovens (não totalmente expandidas) eram todas haplóides enquanto que de folhas mais velhas (3 – 4 semanas) eram diplóides. Wheeler et al. (1985) observaram maior freqüência de aneuploidia em plantas de batatas regeneradas de secções de tubérculos do que a partir de outros tipos de explantes.

Prado et al., 2007, testaram dois genótipos de kiwi utilizando lâminas foliares e pecíolos como fonte de explante, variando a composição do meio de cultura e número de subcultivos e detectaram que o percentual de calos (organogênese indireta) emitindo brotação foi sempre maior que 80%, enquanto o número de brotos formados por calo foi diferente dependendo da escolha do genótipo, meio de cultura, explante e número de subcultivos.

Zhang et al. (2009) relatam que há acentuada diferença no grau de estabilidade genética e epigenética em regenerantes híbridos F1 e seus parentais (linhas puras) em regenerantes micropropagados de *Sorghum bicolor* L., sendo altamente estáveis nos híbridos e altamente mutável nas linhas puras parentais. Esta instabilidade genômica diferencial em híbridos F1 versus linhas puras parece altamente correlacionada com a habilidade de sintonizar a expressão de um grupo de genes responsáveis pela manutenção e perpetuação do estado de metilação das citosinas de maneira coordenada, nos hibridos F1 e não nas linhas puras, durante o período de micropropagação.

De acordo com Tanurdzic et al. (2008), este estudo sugere que as diferenças epigenéticas entre linhas puras e o hibrido resultante tem papel importante na manutenção da integridade genômica sob certas condições de estresse. Isto é consistente com as descobertas feitas em culturas em suspensão de células de Arabdopsis, as quais estabelecem que a desregulação dos mecanismos epigenéticos sob as condições de cultivo são responsáveis pela variação somaclonal.

Reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura servem de instrumento de indução de mudanças genéticas e alteração no estado da metilação do DNA (GEORGE, 1993).

Em alguns casos os reguladores de crescimento podem aumentar a taxa de divisão daquelas células que já são geneticamente anormais (BAYLISS, 1980).

A presença de auxinas e citocininas no meio de cultura regula vários aspectos da desdiferenciação e diferenciação celular em plantas (WOODWARD & BARTEL, 2005; SAKAKIBARA, 2006).

Normalmente, auxinas são utilizadas para indução e proliferação de calos, e auxinas e citocininas são necessárias para rediferenciação de calos para células organizadas (WANG et al., 2008).

Uma auxina é quase invariavelmente adicionada ao meio de cultura para induzir a formação, manutenção e crescimento de calos desorganizados e suspensões celulares e mudanças genéticas são altamente prováveis de ocorrer em cultivos mantidosas nesta condição (GEORGE, 1993).

Assim, talvez não seja coincidência a detecção de que as auxinas aumentam a taxa de metilação do DNA (LO SCHIAVO et al., 1989).

A composição do meio no qual a cultura está crescendo também pode influenciar o nível de ploidia e a proporção relativa de células com diferente número de cromossomos (GEORGE, 1993).

Células mitóticas de segmentos radiculares de Pisum eram todas diplóides quando o tecido foi cultivado em meio simples. A adição de extrato de levedura, leite de côco ou cinetina aumentou a taxa de divisão celular e resultou em tecidos onde células em divisão eram diplóides, tetraplóides e octaplóides (GEORGE, 1993).

A temperatura na qual as culturas são incubadas pode influenciar a taxa de mutação. Calos de fumo incubados a 35 ^{0}C permaneceram predominantemente diplóides, enquanto o mesmo tecido cultivado a 25 ^{0}C mostrou instabilidade cariotípica e tornou-se tetraplóide (BINNS & MEINS, 1980).

Arruda et al. (2006) identificaram variação somaclonal ao nível molecular mesmo a baixas concentrações de BAP (6-Benzilaminopurina), em um único subcultivo.

Chaturvedi et al. (2001) relatou mudanças no padrão morfogenético de diferenciação na regeneração de plantas de *Citrus grandis* utilizando gemas apicais, passando pela fase de calos e mantidas em meio de cultura por períodos mais longos.

Hirochika et al. (1996) relataram aumento no número de cópias do transposon Tos 17 em arroz, quando submetido a longo período de incubação. Bordallo et al. (2004) avaliando cinco cultivares de batata em meio MS suplementado com picloran e 2,4-D, em dois períodos de formação de calos (setenta e noventa dias) concluiram que a interação entre explante, reguladores de crescimento e longos períodos de cultivo aumentam a variabilidade.

Phillips et al. (1990) propuseram que a maioria dos eventos mutacionais ocasionados pela micropropagação estariam direta ou indiretamente relacionados ao estado da metilação do DNA. Quando o DNA está altamente metilado (hipermetilado), a atividade gênica é suprimida.

Um decréscimo na metilação (hipometilação) estaria correlacionado com aumento da atividade gênica.

De acordo com esta hipótese, um aumento ou decréscimo na metilação do DNA poderia justificar mutações qualitativas, tais como aquelas controladas por genes individuais recessivos; por aumento na atividade de transposons, por mudanças simultâneas em caracteres quantitativos e por mutações ocasionadas por quebras cromossômicas (GEORGE, 1993).

2.6. Eventos epigenéticos

2.6.1. Metilação do DNA

A epígenética estuda as mudanças herdáveis na expressão e função de um gene, as quais não podem ser explicadas por mudanças nas seqüências do DNA (RICHARDS, 2006; BIRD, 2007).

Estas mudanças epigenéticas são baseadas num conjunto de processos moleculares que podem ativar, reduzir ou desabilitar completamente a atividade os genes: (i) metilação de citosinas no DNA, (ii) remodelação da estrutura da cromatina através de modificações químicas, em particular a acetilação ou metilação das histonas e (iii) regulação de expressão gênicas mediados por pequenas ou micro moléculas de RNA (RNA interferência). Estas diferentes classes de processos não são independentes, mas, normalmente regulam a atividade gênica em um complexo, agindo interativamente (GRANT-DOWNTON & DICKINSON, 2005; BERGER, 2007). O mecanismo corrente mais estudado é a metilação do DNA (JAENISCH & BIRD, 2003; BENDER, 2004), o qual envolve a adição de um grupo metil na citosina do sítio CpG, uma citosina seguida por uma guanina na seqüência do DNA. Além das quatro bases normais, A, T, C e G, o DNA contém quantidades variáveis de bases metiladas. Destas bases, a 5-metilcitosina (5mC) tem recebido maior atenção (DOERFLER, 1983).

A adição de um grupo metil na posição 5’ da citosina é a modificação mais comum no DNA de plantas e animais. Este evento tem sido associado com numerosos processos biológicos, incluindo “imprinting” genômico, regulação da transcrição de genes e transposons, silenciamento de genes (FINNEGAN et al., 2000; PASZKOWSKI & WHITHAM, 2001), expressão diferencial dos genes, diferenciação celular, inativação da cromatina, carcinogênese (GONZALGO & JONES, 1997a) e inativação gênica (PALMGREN et al., 1991).

Em eucariotos, geralmente há uma correlação negativa entre a metilação do DNA e a expressão gênica (HOLLIDAY, 1987) e com a atividade transcricional de genes endógenos, tais como aqueles codificando proteínas de reserva (BIANCHI & VIOTTI, 1988), proteínas fotossintéticas (NGERNPRASIRTSIRi et al., 1989) e diversos transgenes (DINANT et al., 1995).

Uma ampla metilação do genoma tem efeito pleiotrópico na morfologia (FINNEGAN et al., 2000) particularmente para a regulação do processo de desenvolvimento em tecidos específicos ou estágios do desenvolvimento (CHAKRABARTY et al., 2003). Está freqüentemente correlacionada com a inativação de DNA invasivo, como os transgenes (LINNE et al., 1990) ou transposons (YODER et al., 1997) e é responsável pela manutenção mitótica do modelo de expressão gênica (PRADHAN et al., 1999).

Em plantas, há provavelmente uma função adicional da metilação do DNA, que é a proteção contra possíveis danos durante o estágio de pólen (JANOUSEK et al., 2000).

Existem pelo menos dois diferentes grupos funcionais de DNA-metiltransferases. Metiltransferases de manutenção estão ativas no DNA hemimetilado (PRADHAN et al., 1998), enquanto que metiltransferases de novo são capazes de modificar um molde não metilado (OKANO et al., 1999). Klaas & Amasino (1989) mostraram que regiões sensíveis a DNase I, as quais são geralmente eucromáticas, são submetiladas no genoma da ervilha, cevada e milho.

A metilação do DNA é um dos possíveis mecanismos de regulação da expressão gênica corrente (LO SCHIAVO et al., 1989), hipótese esta, baseada na freqüência da metilcitosina e na transmissão proposta do modelo de metilação através dos ciclos de replicação do DNA (RIGGS, 1975).

Em células somáticas da maioria dos genomas de mamíferos, as seqüências relacionadas aos transposons estão profundamente metiladas e transcricionalmente silenciadas (BIRD, 2002).

O silenciamento pós-transcricional que afeta trangenes e genes homólogos endógenos, está também associado com a metilação do transgene, mas dentro da seqüência codificada e não na promotora (SMITH et al., 1994).

A expressão gênica é regulada pela interação do DNA com fatores de transcrição, mas, a metilação nos resíduos de citosina pode afetar a acessibilidade para seqüências regulatórias específicas do DNA, de maneira direta, quando citosinas metiladas estiverem dentro destas seqüências ou indiretamente, pela mudança na estrutura da cromatina, a

qual modifica a interação normal dos fatores de transcrição (EHRLICH & EHRLICH, 1993).

A transcrição é regulada pelo estado da cromatina, distinguidos como transcricionalmente ativo (eucromatina) e silenciado (heterocromatina). Nas plantas o silenciamento está associado com hipermetilação do DNA e modificações covalentes das histonas H_3 (VAILLANT et al., 2007).

Várias linhas de evidências sugerem que a manutenção dos padrões de metilação do DNA em seqüências CG é responsável pela forma dos estados estáveis e ativamente herdáveis chamados epialelos. Em contrapartida, modificações das histonas e metilação do DNA fora das seqüências CG conferem a flexibilidade na regulação transcricional, necessária para o desenvolvimento das plantas e as respostas adaptativas ao ambiente (VAILLANT et al., 2007).

Estudos recentes têm refinado o entendimento quanto à significância biológica e os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre metilação do DNA e metilaçao de histonas H_3 (VAILLANT et al., 2007).

O interesse pela metilação do DNA tem se acentuado em função da suspeita de que a perda estratégica do grupo metil durante o desenvolvimento poderia levar à ativação de genes específicos (BIRD, 2002).

Segundo Finnegan et al. (1998), há muitos exemplos em plantas de genes que são transcricionalmente inativos dentro do promotor e/ou seqüências codificadoras. Isto não deixa claro, entretanto, se a metilação do DNA é a causa primária da inativação ou uma conseqüência secundária de algum outro processo que resultou na inativação transcricional.

Uma característica ligada com o efeito da metilação na expressão gênica pode ser a presença das ilhas ricas em CpG na região 5’ de alguns genes. Estas ilhas têm um conteúdo médio de GC de aproximadamente 60%, comparado com a média de 40% no genoma todo. Elas tomam a forma de segmentos de DNA com centenas de pares de bases (LEWIN, 2004).

Muitos dos efeitos biológicos da metilação do DNA conhecidos estão associados às ilhas CpG. Tem sido discutido que sua metilação em estágios iniciais da formação do embrião é seguida por eventos de silenciamento que, provavelmente, sejam independentes da metilação do DNA (BIRD, 2002).

Se o silenciamento transcricional realmente aciona a metilação, o promotor da atividade inicial no desenvolvimento poderia criar uma ilha CpG livre da metilação. Estas ilhas CpG não metiladas poderiam ser marcas da atividade promotora na embriogênese. Uma predição óbvia

deste modelo é que todas as ilhas CpG não metiladas, incluindo aquelas promotoras dos genes altamente expressados em tecidos específicos, poderiam conter promotores que funcionariam durante o desenvolvimento inicial, quando o “sistema de memória” da metilação é mais intensivo (BIRD, 2002).

Experimentos com a droga 5-azacytidine evidenciaram que a demetilação pode resultar na expressão gênica. A droga é incorporada no DNA no lugar da cytidine, e não pode ser metilada, pois a posição 5’ é bloqueada. Isto leva ao aparecimento dos sítios de DNA demetilados (LEWIN, 2004).

Segundo este autor, o efeito fenotípico da 5-azacytidine inclui a indução de mudanças no estado da diferenciação celular. Um exemplo deste evento seriam células musculares serem induzidas a desenvolver-se de celulas precursoras não musculares. A droga também ativa genes silenciados no cromossomo X, o que traz a possibilidade de que o estado da metilação poderia estar conectado com a condição de inatividade cromossômica.

A função da metilação da citosina no desenvolvimento de plantas tem sido demonstrada em pelo menos três tipos de evidências: expressão parental específica de alguns genes no desenvolvimento de sementes, controle do tempo de florescimento e morfogênese floral e correlação com silenciamento de seqüências de DNA intrusivo (transposons ou transgenes) (ZLUVOVA et al., 2001).

A primeira indicação de que a metilação do DNA poderia regular o desenvolvimento se originou dos trabalhos sobre a base molecular da vernalização, isto é, a promoção do florescimento após a exposição a baixas temperaturas. Este fenômeno não ocorre em plantas insensíveis a vernalização (FINNEGAN et al., 1998).

O sinal para a vernalização é percebido na atividade mitótica que formará o meristema da inflorescência, e este é herdado através das divisões mitóticas, mas não é transmitida através da meiose (DENNIS et al., 1996).

Com base nestas propriedades, Burn et al. (1993) propuseram que a vernalização é mediada pela demetilação nos genes promotores, fundamentais para o início do florescimento e que a subseqüente expressão destes genes provocaria o início deste evento.

Diferenças significativas na metilação de citosinas têm sido observadas entre vários tipos de tecidos em diversas espécies de plantas como arroz (DHAR et al., 1990); tomate (MESSENGUER et al., 1991) e milho (LUND et al., 1995). Entretanto, há dificuldades em afirmar que

o estado de metilação forneceria um significado geral para o controle da expressão gênica.

Em plantas superiores as seqüências repetidas são reconhecidas como preferencialmente metiladas (VONGS et al., 1993) e constatou-se estarem sujeitas a metilação induzida pela micropropagação (PERAZA-ECHEVERRIA et al., 2001).

Investigações com endonucleases de restrição diferencialmente sensitivas para reconhecer sítios metilados têm demonstrado freqüentes mudanças na metilação após micropropagação de células somáticas (PHILLIPS et al., 1994).

Lo Schiavo et al. (1989) afirmaram que a metilação do DNA é influenciada pelas auxinas e possivelmente atue como um mecanismo de regulação da expressão gênica. Estes autores detectaram uma correlação positiva entre adição de auxina exógena e metilação da citosina em cenoura. Um alto grau de metilação da citosina ocorreu durante a indução da embriogênese por auxinas endógenas. Conforme se aumentava a concentração dos reguladores de crescimento, aumentava a metilação de DNA, e, após a indução e com a remoção da auxina, o grau de metilação decresceu rapidamente.

Assim, a remoção da auxina provoca um decréscimo na metilação seguida pelo desenvolvimento do embrião; aumentando novamente a metilação em estágios posteriores (LO SCHIAVO et al., 1989; MUNKSGAARD et al., 1995). Entretanto, a correlação positiva entre o nível de auxina e a alta porcentagem de 5-metilcitosina (5mC) (KAEPPLER & PHILLIPS, 1993a) não permite distinguir metilação basal (específica por estado da diferenciação) da metilação resultante do tratamento com auxina (LELJAK-LEVANIC et al., 2004).

A observação que o padrão de metilação do DNA é altamente variável entre plantas regeneradas e suas progênies evidencia que modificações no DNA são menos estáveis em meio de cultura que em plantas originadas de sementes (KAEPPLER et al., 2000).

A embriogênese somática pode ser a responsável pela alteração no padrão de metilação do DNA. A hipermetilação do DNA em calos não embriogênicos realça a expressão desta característica molecular, a qual pode contribuir para a expressão gênica (CHAKRABARTY et al., 2003).

Estes autores detectaram mudanças na metilação do DNA durante embriogênese somática de ginseng siberiano (*Eleutherococcus senticosus*), utilizando calos embriogênicos e não embriogênicos, provenientes do mesmo genótipo e vindos das mesmas condições de cultivo e por esta razão, diferenças nos níveis de metilação podem ser um reflexo dos

diferentes processos envolvidos no desenvolvimento. Entretanto, não há relatos de monitoramento do padrão de metilação do DNA passando por distintas rotas de diferenciação celular (organogênese versus embriogênese).

Kaeppler & Phillips (1993b), analisando 21 linhas de milho derivadas de micropropagação de dois embriões (calos embriogênicos), encontraram uma alta freqüência de variação de metilação entre famílias derivadas de regenerantes do mesmo embrião. Mudanças na seqüência de bases não foram detectadas e todas as mudanças foram resultantes do decréscimo da metilação. Segundo os autores, seria importante entender se estas mudanças são dirigidas para certas seqüências ou são respostas ao acaso para condições de estresse detectadas igualmente em todas as seqüências.

Em *Arabdopsis*, o nível reduzido de metilação provoca uma série de anormalidades, incluindo perda da dominância apical, estatura reduzida, alteração na forma e tamanho das folhas, redução no comprimento das raízes e redução da fertilidade (Finnegan et al., 1996).

Em Arabdopsis e milho, a metilação de transposons e outras seqüências repetidas aumentou durante o desenvolvimento, talvez para assegurar que estas seqüências sejam armazenadas na cromatina antes da formação de gametas (Finnegan et al., 1998).

Em *Silene latifolia* (planta da família *Cariofilaceae*) ocorreu um rápido decréscimo na metilação global do DNA durante a germinação das sementes, primeiro no tecido do endosperma e posteriormente no hipocótilo. Esta demetilação acontece antes do início da divisão celular. No início do período pós-germinação detectou-se um decréscimo na metilação em cotilédones, também antes da divisão celular. A zona central do meristema apical da parte aérea permanece altamente metilada durante todo o período de crescimento vegetativo e, nesta região, foi detectada baixa atividade de divisão celular (ZLUVOVA et al., 2001).

Segundo estes autores, na transição de meristema apical para gema floral o estado de alta metilação do meristema decresce e começa a divisão celular e indica que a zona do meristema apical pode representar uma linhagem celular relativamente quiescente, a qual é ativada no florescimento para formar esporos e gametas.

Alguns genes em mamíferos e angiospermas estão sujeitos ao “imprinting” parental, um processo pelo qual, diferentes sinais epigenéticos são impostos aos gametas masculinos e femininos, de tal maneira que ocorre o silenciamento de um grupo de cromossomos cedidos pela mãe e outro cedido pelo pai e sendo assim, cada genoma contribui com um grupo de alelos ativos diferentes para a descendência, a qual desen-

volve anormalidades se o balanço dos genomas parentais não estiver correto (ADAMS et al., 2000).

A metilação do DNA é um componente essencial no mecanismo de “imprinting” parental em mamíferos, mas há menos evidências para ocorrência em plantas (ADAMS et al., 2000).

“Imprinting” parental tem uma importante função na biologia reprodutiva de mamíferos (BARTOLOMEI & TILGHMAN, 1997) e no florescimento de plantas (KERMICLE & ALLEMAN, 1990; HAIG & WESTOBY, 1991). Afeta primariamente a expressão gênica do endosperma e o desenvolvimento é prejudicado quando o balanço entre genomas maternal e paternal é perturbado, levando freqüentemente ao aborto da semente (LIN, 1984).

Para locos com “imprinting”, o nível de expressão de um alelo depende do seu parental de origem, devido a modificações epigenéticas diferenciais impostas durante a gametogênese no macho e na fêmea. Metilação associada ao “imprinting” requer modificação de novo dos locos, tanto durante a gametogênese como na propagação pós-fertilização dos “imprintings”, pela enzima que mantém a metilação, através de diversos estágios da mitose (ADAMS et al., 2000)

Os genomas maternal e paternal não são funcionalmente equivalentes no desenvolvimento do endosperma (KERMICLE & ALLEMAN; 1990; HAIG & WESTOBY, 1991). O endosperma de muitas angiospermas é triplóide, tendo duas cópias do genoma maternal e uma cópia simples do genoma paternal (LIN, 1984). Quando este balanço não ocorre, o desenvolvimento não é pareado, levando freqüentemente à falta de maturação das sementes (FINNEGAN et al., 1998).

Um modelo para a perpetuação dos sítios metilados é supor que a DNA metilase atue no DNA hemimetilado, quando a replicação de uma dupla CG metilada produz duplas irmãs hemimetiladas e a enzima reconhecendo os sítios hemimetilados poderia convertê-los para o estado completamente metilado (LEWIN, 2004).

Tal modelo está de acordo com a observação de que, quando DNA metilado é introduzido na célula, ele continua metilado por infinitos ciclos de replicação, com uma fidelidade em torno de 95%. Se o DNA não metilado é introduzido, este não é metilado de novo. Isto implica que a enzima reconhece somente os sítios hemimetilados, permitindo a condição de uma dupla CG - metilada ou hemimetilada - ser perpetuada (LEWIN, 2004).

Segundo este autor, se este modelo está correto, uma atividade enzimática inteiramente diferente poderia estar envolvida na criação de novos sítios de metilação (por exemplo, se a condição metilada de um

gene é restaurada quando a transcrição cessa). A condição metilada poderia ser perdida de duas formas: grupos metil poderiam ser ativamente removidos pela enzima demetilase - nenhuma ação da metilase foi ainda descoberta – ou metilação poderia simplesmente deixar de acontecer num sítio hemimetilado gerado por replicação.

A metilação de novo juntamente com a demetilação do DNA provavelmente estabeleça um modelo de metilação específico durante a gametogênese e embriogênese (LO SCHIAVO et al., 1989; GAVAZZI et al., 1997). A demetilação poderia ser um resultado da replicação do DNA, a qual não é seguida pela ação da metiltransferase de manutenção na nova fita de DNA sintetizada ou, como recentemente mostrada em animais, poderia ser um processo enzimático ativo não dependente da replicação do DNA (ZHU et al. 2000b).

A identificação de múltiplas DNA metiltransferases em plantas levanta a questão se as proteínas reconhecem as citosinas metiladas em diferentes seqüências, se as diferentes enzimas catalizam a manutenção ou a metilação de novo, ou se elas são ativas em diferentes tecidos ou estágios do desenvolvimento (FINNEGAN et al., 1998). Há evidências que as metiltransferases em plantas podem diferir em especificidade de alvos. Duas metiltransferases atuantes em ervilha, as quais seriam originadas de um gene simples, diferem em especificidade de alvo (PRADHAN & ADAMS, 1995).

Em fumo, metilação de citosinas no dinucleotídeo CpG e em seqüências CpNpG mostraram sensibilidade diferencial para o inibidor de metilação 5-azacytidine (5-azaC) e etionina, sugerindo que diferentes enzimas podem catalizar a metilação de sítios CpG e CpNpG (KOVARIC et al., 1994).

A maioria das metiltransferases conhecidas, que atuam na transcrição em plantas é expressa tanto em tecidos vegetativos como reprodutivos, mas geralmente mostram maior expressão em células meristemáticas (BERNACCHIA et al., 1998).

Elementos móveis e outras seqüências repetidas são metiladas no genoma de plantas, justificando a idéia de que a metilação do DNA também desempenha função importante na defesa do genoma em plantas. A observação de que a metilação de novo pode ser estimulada pela demetilação global e por agentes mutagênicos sugere que as plantas utilizam a metilação do DNA como defesa contra fatores que tem potencial para interferir na organização normal do genoma. É possível que mudanças na estrutura da cromatina causadas por demetilação, mutagênese ou inserção de transposons ou trangenes estimulem a ocorrência de metilação densa (FINNEGAN et al., 1998).

A plasticidade da metilação do DNA é o grande fator envolvido no desenvolvimento e resposta da micropropagação. A demetilação normalmente precede o início de um novo programa de diferenciação, tal como a embriogênese sexual e assexual, iniciação do florescimento e revigoração (VALLEDOR et al., 2007).

A metilação aumenta com a idade, mudança de fase no ciclo ou período de cultivo e normalmente está associada com a falta de potencial organogenético. A metilação é estável, porém, não estática, sendo a base da plasticidade celular. O controle da metilação e demetilação permite dirigir as funções e o crescimento das células, com a possibilidade de direcionar os mecanismos celulares para funcionalidades aplicadas (VALLEDOR et al., 2007).

A ocorrência de metilação/demetilação do DNA influenciada por fatores exógenos e endógenos indica que este mecanismo está envolvido no desenvolvimento das plantas, controlando a expressão gênica in vivo e in vitro (FINNEGAN, 2000).

A metilação do DNA desempenha papel fundamental no controle epigenético do genoma e expressão gênica. Além das modificações covalentes nas histonas (acetilação e metilação), metilação do DNA leva a mudanças herdáveis e/ou reversíveis na estrutura da cromatina e expressão gênica que não implicam em mudanças na seqüência de nucleotídeos e contribui para o “imprinting” genômico (LI, 2002), no silenciamento gênico (MARTIENSSEN & COLOT, 2001).

Assim, é importante explorar as conseqüências da metilação na diversidade de espécies e evolução. Surpreendentemente, poucos estudos têm abordado esta questão (RAPP & WENDEL, 2005). A maioria deles tem analisado a metilação no genoma como um todo, considerando diferentes eventos indutores de estresse como a alopoliploidização (LUKENS, 2001; LIU et al. 2001), hibridização intraspecifica (XIONG et al., 1999), micropropagação (BARDINI et al., 2003) ou interações bióticas (SHA et al., 2005). Por outro lado, poucas informações são disponíveis referentes a polimorfismos na metilação natural intraespecífica.

2.6.2. Demetilação do DNA

O estudo da demetilação do DNA tem sido pesquisado em plantas, onde é claro que uma rota de reparo do DNA é adotada para remoção da 5-metilcitosina do DNA. A rota estudada em plantas, a qual é fortemente suportada biológica e bioquimicamente, fornece um quadro

para um exame critico dos possíveis mecanismos da demetilação em mamíferos (GEHRING et al., 2008)

A metilação pode ser perdida passivamente, quando a manutenção da metilação, que normalmente segue a replicação do DNA é inibida ou por um processo mais ativo, quando a 5-metilcitosina é enzimaticamente removida (REIK et al., 2001).

Demetilação ativa tem emergido como um importante mecanismo no genoma de plantas para modulação do padrão de metilação. Neste processo, a DNA glicosilase, a qual está normalmente associada com reparo do DNA, reconhece e remove a 5-metilcitosina, levando à substituição por citosina. Mudanças extensivas no nível de metilação ocorrem durante a reprogramação epigenética ao longo do genoma, associada com a reprodução, em mamíferos (REIK et al., 2001).

A rápida perda da metilação do DNA que ocorre no período de um ciclo celular indica a presença de enzimas que removem ativamente a 5-metilcitosina do DNA. As enzimas responsáveis ainda não são claramente conhecidas e as 5-metilcitosinas DNA glicosilases parecem não ter homólogas em animais. Mesmo os mecanismos básicos relacionados à demetilação e metilação do DNA, incluindo desenvolvimento reprodutivo, progressão de câncer e reprogramação epigenética (MORGAN et al., 2005) ainda não apresentam suficiente entendimento.

Demetilaçao ativa do DNA está envolvida em dois processos em angiospermas: “imprinting” de genes durante a reprodução e manutenção normal do padrão de metilação na planta (GEHRING & HENIKOFF, 2008).

Pequenas moléculas de RNA dirigem o estabelecimento do processo de metilação do DNA em plantas. Estes surgem principalmente de seqüências repetitivas como os transposons, as quais são altamente metiladas, comparativamente as seqüências gênicas (ZILBERMAN et al., 2007).

Uma demetilação ativa parece remover marcas que invadem o espaço gênico (LISTER et al., 2008; PENTERMAN et al., 2007). Neste caminho, plantas utilizam um robusto sistema de metilação como defesa, silenciando transposons, sem afetar negativamente genes próximos.

2.7. Epigênese e herdabilidade

No passado, o termo “epigenética” foi utilizado num sentido amplo, para incluir todos os processos que determinam como o genótipo é

traduzido em fenótipo, englobando a maioria dos campos da biologia do desenvolvimento.

Entretanto, esta definição, relacionada ao conceito de epigenêse sugerido por Waddington, foi sendo modificada e hoje a epigenética é definida como o estudo das mudanças herdáveis na expressão e função gênica que não podem ser explicadas por mudanças nas seqüências do DNA (RICHARDS, 2006; BIRD, 2007).

Padrões alternativos de expressão gênica em eucariotos são baseados em uma variedade de diferentes mecanismos epigenéticos, incluindo modificações covalentes do DNA (metilação da citosina) (KLOSE & BIRD, 2006), modificações covalentes das histonas (BHAUMIK et al., 2007) e o surgimento de populações extracromossomicas de moléculas de RNAs regulatórios e RNA não-codificante (RASSOULZADEGAN et al., 2006).

Estas marcas epigenéticas constituem um mecanismo de silenciamento transcricional (transposons, por exemplo) e estabilizam os programas de expressão gênica reversível, levando a propagação da atividade gênica alternativa através da divisão celular mitótica. Na maioria dos casos, o apagamento dessas marcas epigenéticas em um ou mais momentos do ciclo de vida bloqueia a herança adquirida, acumulada (RICHARDS, 2008).

No entanto, um número crescente de exemplos de herança epigenética transgeracional tem sido relatado em animais, fungos e plantas (RAKYAN & BECK, 2006; RICHARDS, 2006) indicando que o apagamento epigenético em certos locos não ocorre ou pode ser incompleto.

Após estudos extensivos realizados nas últimas décadas, quanto a estabilidade das modificações epigenéticas, hoje há fortes evidências de que estas podem ser herdadas através das gerações (CHONG & WHITELAW, 2004; RICHARDS, 2006). Herança meiótica de alelos epigenéticos (epialelos) tem sido demonstrada em linaria (CUBAS et al., 1999), *Arabidopsis thaliana* (MITTELSTEN SCHEID et al., 2003; RANGWALA et al., 2006; VAUGHn et al., 2007) and camundongos (RAKYAN et al., 2003; BLEWITT et al., 2006).

Em plantas a herança transgeracional da metilação do DNA parece estar ligada a uma enzima metiltransferase que replica o padrão de metilação durante a mitose e a meiose (TAKEDA & PASZKOWSKI, 2006).

É importante salientar que na literatura de Biologia Molecular o termo “herança epigenética” é utilizado para herança mitótica e meiótica das modificações epigenéticas. Isto pode vir a ser uma fonte potencial

de confundimento, uma vez que na genética clássica e na biologia evolutiva o termo “herança” normalmente é restritivo a descrição de herança transgeracional através da meiose (BOSSDORF et al., 2008).

Uma importante questão levantada em recentes pesquisas epigenéticas é que pode haver variação natural nas modificações que são, ao menos parcialmente, independentes da variação na seqüência do DNA (CUBAS et al., 1999; CERVERA et al., 2002; RIDDLE & RICHARDS, 2002; KEYTE et al., 2006; SHINDO et al., 2006; VAUGHN et al., 2007).

Cervera et al. (2002) and Vaughn et al. (2007) detectaram níveis consistentes de variação na metilação do DNA em ecótipos de *Arabdopsis thaliana* que não estavam correlacionados com variação genética. Keyte et al. (2006) exploraram polimorfismo de metilação de DNA em acessos de algodão e detectaram que os níveis de variação epigenética excediam acentuadamente as estimativas de variação genética.

O que faz os processos epigenéticos fundamentalmente diferentes dos processos genéticos é que em alguns casos, mudanças epigenéticas induzidas pelo ambiente podem ser herdadas pelas gerações futuras (RICHARDS, 2006; WHITELAW & WHITELAW, 2006; JIRTLE & SKINNER, 2007). FIELDES & AMYOT (1999) alteraram experimentalmente o nível de metilação em linho e mostraram que isto afetou significativamente o fenótipo de pelo menos quatro gerações da progênie.

Em experimentos com camundongos, toxinas ambientais (ANWAY et al., 2005; CREWS et al., 2007) e suplementação na dieta (CROPLEY et al., 2006) induziram mudanças na metilação do DNA que foram herdadas por diversas gerações.

Há uma carência de estudos que abordem questões epigenéticas no contexto do mundo atual (KALISZ & PURUGGANAN, 2004; RICHARDS, 2006). Conhecer qual a importância da variação e a herança epigenética no mundo real é de suma importância e para entender estes processos é imperativo colocá-los numa perspectiva ecológica e estudar suas conseqüências em populações naturais. Isto, somente aconteceria se ecologistas evolucionários começassem a incorporar a epigenética em suas idéias e juntassem esforços com geneticistas e biólogos moleculares em suas pesquisas empíricas (BOSSDORF et al., 2008).

Do ponto de vista ecológico há várias razões que poderiam fazer da epigenética uma área de pesquisa excitante; 1) processos epigenéticos poderiam explicar algumas das variações fenotípicas herdáveis que não podem ser explicadas por diferenças na seqüência do DNA. Estudos nesta linha melhorariam o entendimento dos mecanismos envolvidos na

variação natural de características ecológicas importantes; 2) estudos epigenéticos permitiriam prospector mecanismos os quais permitem que organismos respondam ao ambiente; 3) processos epigenéticos estão no centro de diversos tipos de plasticidade fenotípica, tal como a transcrição para o florescimento em plantas induzido pelo ambiente (BASTOW et al., 2004; HE & AMASINO, 2005), e aparentemente mediam alguns tipos de efeitos maternais relacionados ao ambiente (ROSSITER, 1996; ANWAY et al.,, 2005; CROPLEY et al., 2006).

Crews et al. (2007) demonstraram que variações epigenéticas herdáveis podem afetar o comportamento animal. Quando camundongos foram tratados uma única vez com toxinas que alteram a metilação do DNA, isto ainda afetou significativamente o comportamento quanto a escolha do parceiro até a geração F_3.

Como o comportamento freqüentemente é o aspecto mais responsivo do comportamento do fenótipo animal (WEST-EBERHARD, 2003), tais efeitos epigenéticos poderiam ter profundas conseqüências evolutivas.

De forma geral, processos epigenéticos podem aumentar o potencial evolutivo dos organismos em resposta ao estresse abiótico e outras mudanças ambientais, as quais seriam potencialmente relevantes no contexto das mudanças ambientais globais (BOSSDORF et al., 2008).

Há também, evidências crescentes de que processos epigenéticos são um importante componente dos eventos de hibridação e poliploidização, e podem desta forma, desempenhar um papel chave na especiação e na biologia de muitas espécies invasivas (ELLSTRAND & SCHIERENBECK, 2000; LIU & WENDEL, 2003; RAPP & WENDEL, 2005; SALMON et al. 2005; CHEN & NI 2006).

Diversos artigos recentes tem ressaltado a importância dos processos epigenéticos para a questões evolutivas (JABLONKA & LAMB 1998, 2005; KALISZ & PURUGGANAN, 2004; GRANT-DOWNTON & DICKINSON, 2005, 2006; RAPP & WENDEL, 2005; RICHARDS, 2006), mas estas revisões tem mencionado ocasionalmente a necessidade da condução de experimentos associando epigenética a ecologia.

Há duas maneiras pelas quais os processos epigenéticos podem contribuir para a microevolução em populações naturais. Primeiro, se a variação epigenética herdável é traduzida em variação fenotípica e em diferenças de ajustamento entre indivíduos, então os processos epigenéticos podem fornecer um segundo sistema de variação herdável para seleção natural atuar, semelhante ao baseado na variação genética. Por outro lado, a variação epigenética, ao contrário da variação genética, pode ser alterada diretamente pelas interações ecológicas (FIELDES &

AMYOT, 1999; ANWAY et al., 2005; CROPLEY et al., 2006; RICHARDS, 2006; WHITELAW & WHITELAW, 2006) e conseqüentemente fornecer uma rota adicional para aceleração das mudanças evolutivas.

Como uma alternativa para estudar os resultados da seleção, pode-se optar para estudar evolução epigenética em ação. Um adequado delineamento experimental a ser utilizado geralmente deve envolver três passos: (i) genótipos da mesma planta ou animal são submetidos a ambientes distintos, (ii) os seus descendentes são criados em um ambiente comum por várias gerações; após o que (iii) as diferenças fenotípicas e epigenéticas são quantificadas e comparadas estatisticamente. Se encontrarmos que os descendentes dessas linhagens que experimentaram diferentes ambientes permanecem fenotipicamente diferentes, e ao mesmo tempo, eles mostram um desvio significativo em padrões de metilação do DNA, o gene ou a expressão da proteína, apesar de ser ainda idênticos em nível do DNA, este vai ser a evidência para uma evolução rápida baseada na epigenética.

A realização de experiências sobre várias gerações permitirá discernir entre os efeitos transitórios e mudanças epigenéticas permanentes (Bossdorf et al., 2008).

2.8. Variação fenotípica

Apesar das vantagens que a micropropagação oferece espécies propagadas por esta modalidade tem apresentado instabilidade fenotípica (FEUSER et al., 2003; SAHIJRAM et al., 2003).

Às vezes, um padrão particular de expressão gênica pode ser induzido e persistir por um longo período, mesmo após a suspensão das condições indutivas e pode passar de uma geração de células para outra. Se essa mudança ocorrer durante a micropropagação o fenótipo das células, tecidos ou órgãos podem ser alterados ou atípicos. Variação fenotípica deste tipo, que também é em última instância reversível e não é sexualmente, é chamada de variação epigenética (GEORGE, 1993).

As mudanças morfológicas induzidas por variações epigenéticas podem influenciar a classificação de algumas espécies de batatas. Se a variabilidade observada na metilação, como é o caso do híbrido natural rzl (*S. kurtzianum* x *S. chacoense*), é comum a outras espécies de batatas isto poderia ser uma explicação alternativa para muitas variações intraespecificas encontradas em *S. chacoense*, *S.sparsipilum*, *S. spegazzinii* and *S. stoloniferum*. Plantas classificadas como diferentes espécies po-

deriam ser uma variação epigenética da mesma espécie (MARFIL et al., 2009).

As alterações morfológicas podem surgir após alguns anos de cultivo. Na cultivar de tulipa Blue Parrot constatou-se aparência variegada em 1% das flores de plantas mantidas in vitro durante quatro anos e 1,7% em plantas mantidas in vitro durante seis anos, após sua implantação em ambiente natural. Na cultivar Pr-D ocorreu o florescimento em 1,5% das plantas cultivadas a campo após permanência de 4 anos *in vitro* e estas apresentavam fenótipo nornal. No entanto, plantas mantidas durante 5 anos in vitro apresentaram uma taxa de 30,8% de florescimento e cerca de 50% destas tinham apresentavam fenótipo anormal (PODWYSZYNSKA, 2005).

Calvete et al. (2009) avaliaram duas cultivares de morangueiro (Oso Grande e Vila Nova) micropropagadas durante 10 subcultivos, avaliando taxa de multiplicação (número de propágulos por explante em cada), número acumulado de propágulos obtidos na seqüência de subcultivos, numero de folhas por propágulo e altura das brotações.

Segundo estes autores, a maior média de propágulos foi de 7 propágulos por planta para a cultivar Oso Grande no primeiro subcultivo e 8 propágulos para a Vila Nova no segundo e terceiro subcultivos. Após o terceiro subcultivo foram observadas reduções no número de propágulos, atingindo médias de 1,6 e 1,7, respectivamente. Este seria um indicativo da influência que a micropropagação teria nas modificações de caráter quantitativo, no caso no número de propágulos, o que certamente diminuiria a produtividade dos genótipos, uma vez que a diminuição na média no número de propágulos foi de cerca de 77%.

Stover (1987) encontrou cerca de 25% de plantas atípicas ou variantes em uma população de bananeira cv. Grande Naine, micropropagadas in vitro. Segundo seus relatos, alguns tipos de variações se manifestaram cinco ou seis meses após o plantio ou a floração.

A cultivar Nanicão, estudada por Rodrigues et al. (1998), apresentou aumento da taxa de variação somaclonal com o aumento do número de subcultivos in vitro, ocorrendo as primeiras variantes a partir do nono subcultivo.

Variação fenotípica em plantas regeneradas por micropropagação, avaliadas na fase de produção, tem sido pouco estudada. Estas alterações referem-se principalmente, às características morfológicas, como ciclo da cultura, produção e cor dos frutos, número de ramos primários, cor de flores e resistência a patógenos (BRUNELLO, 2002).

Park et al. (2008) analisando orquídeas do gênero *Doritaenopsis* obtidas por micropropagação detectaram variação nas características

florais, quanto a forma, disposição e coloração das sépalas, em 17% da plantas, quando estas atingiram a maturidade.

Na primeira e segunda floração estas variações permaneceram estáveis, mas na terceira, ocorreu aumento na instabilidade destas.

Esta instabilidade pode ser de natureza epigenética e variações de natureza genética e epigenética entre plantas obtidas por micropropagação são comuns (BAJAJ, 1990) e tais variações tem sido relatadas entre diversas espécies de orquídeas (TOKUHARA, 1992; CHEN et al. 1998).

De acordo com Munthali et al.(1996) e Polanco & Ruiz (2002), a não detecção de qualquer variação fenotípica entre regenerantes não implica necessariamente numa concomitante falta de mudança genética ou epigenética.

2.9. Dinamismo genômico

Os genomas de eucariotos normalmente são vistos como tendo cariótipos fixados dentro de espécies (LEWIN, 2000; HARTWELL et al., 2004). Sob tal modelo, indivíduos estreitamente aparentados (dentro de populações ou espécies) compartilham genomas quase idênticos, e a integridade genômica é mantida através do ciclo celular. Esta noção estática do genoma é contestada por estudos numa variedade de linhagens que demonstram considerável variação no conteúdo de DNA genômico entre os ciclos de vida de um organismo e entre indivíduos de uma única espécie. Estes dados, juntamente com o reconhecimento de influencia generalizada da epigenética no genoma (CERUTTI & CASAS-MOLLANO, 2006; KATZ, 2006; RICHARDS, 2006; BIRD, 2007), mostram um quadro cada vez mais dinâmico do genoma dos eucariotos.

Para elucidar a gama de variações no genoma de eucariotos, dois aspectos podem da dinâmica intraespecifica devem ser considerados; 1) variação dos ciclos nucleares dentro das linhagens e 2) variação no conteúdo genômico entre indivíduos dentro de espécies (PARFREY et al., 2008).

Há um amplo debate de temas relacionados como a evolução do sexo e da meiose (KONDRASHOV, 1994; MABLE & OTTO, 1998; ARCHETTI, 2004; NUISMER & OTTO, 2004) e as alterações na ploidia associadas a especiação (duplicação do genoma, hibridização, por exemplo) (OTTO & WHITTON, 2000, BENNETT, 2004).

Subjacente a esta diversidade de processos, são as semelhanças genômicas que sugerem a origem das características básicas de propagação do genoma, incluindo mitose e meiose (PARFREY et al., 2008).

Estes autores defendem que os eucariontes compartilham mecanismos, possivelmente epigenéticos, para manter a integridade do material genético para a transmissão às gerações futuras, embora permitindo grande variação dentro de ciclos de vida e entre indivíduos co-específicos. Sugerem ainda, que a variação intraespecífica no conteúdo do genoma é uma fonte ampla de variação fenotípica.

Variação do conteúdo de DNA durante os ciclos nucleares e a elevação no nível de ploidia é a manifestação mais comum da dinâmica genômica em eucariotos. Os dois mecanismos pelos quais organismos aumentam seu conteúdo de DNA são endo-replicação, que resulta em poliploidia e a amplificação do genoma (PARFREY et al., 2008).

Variações intra-específica no conteúdo de DNA dos genomas também diferem muito entre indivíduos dentro das espécies de diferentes linhagens eucarióticas. Há partes do genoma que variam de poliploidização de todo o genoma para inserções e deleções de seqüências de DNA genômico com milhares de bases de DNA genômico. Essa variação contrasta acentuadamente com as variantes de polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) que são o foco de muitos estudos atuais de variações genômicas entre as espécies (PARFREY et al., 2008).

Níveis substanciais de variação individual no conteúdo de DNA foram recentemente encontrados em humanos, onde o fenômeno é chamado de variação do número de cópias (FREEMAN et al., 2006; REDON et al., 2006). Redon et al. (2006) encontraram inserções e deleções de segmentos de DNA que variam de kilobases até megabases, que levam ao polimorfismo na presença /ausência de regiões cromossômicas e genes nelas contidos.

Elucidar o âmbito da dinâmica do genoma é essencial para a compreensão da relação entre genomas e fenótipos. Estudos recentes sugerem que características genômicas podem afetar a evolução da população, alterando parâmetros genéticos tais como o tamanho efetivo da população (LYNCH, 2007) e taxas de evolução molecular (ZUFALL et al., 2006).

Embora ainda haja muito para ser descoberto sobre a dinâmica do genoma, os mecanismos por trás durante os ciclos de vida e dentro da espécie, os mecanismos são os mais prováveis candidatos epigenéticos. Fenômenos epigenéticos, como metilação, acetilação e varredura do genoma por RNAi (MOCHIZUKI & GOROVSKY, 2004; CERUTTI & CASAS-MOLLANO, 2006; GOLDBERG et al., 2007), por exemplo,

pode permitir a diferenciação entre celular germinativas e somáticas dos genomas, mesmo no contexto de um único núcleo. Tal distinção entre linha germinativa e somatica pode ser a chave para permitir variação no genoma dentro de ciclos de vida e entre indivíduos dentro das populações e ao mesmo tempo manter a integridade entre as gerações.

2.10. Detecção da variação genética e epigenética através de marcadores genéticos

Um marcador genético é uma característica que é capaz de detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos ou organismos. Entre suas propriedades, um marcador genético (i) deve ser capaz de diferenciar os genitores, (ii) deve ser reproduzido com precisão na progênie. Do ponto de vista molecular, um marcador genético ou loco marcador serve para identificar um local ou uma região no cromossomo (NODARI, 1996).

Face ao progresso na Biologia Molecular, surgiram métodos para detecção de polimorfismo genético ao nível de DNA (marcadores moleculares), o que facilita a avaliação fenotípica. Diversas tecnologias estão hoje disponíveis para análise genômica, possibilitando a verificação de polimorfismo de seqüências de DNA em vários pontos do genoma, permitindo fazer estimativa de vínculo genético entre variedades ou acessos de uma espécie.

Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição, permitiu a análise de polimorfismo de componentes de fragmentos de restrição de DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) (BOTSTEIN et al., 1980). Mais recentemente, o desenvolvimento da reação da polimerase em cadeia (PCR) (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988), levou a descrição de outras classes de marcadores moleculares como RAPDs (WELSH & MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990), SSRs ou microssatélites (NYBOM et al., 1992), SCARs (PARAN & MICHELMORE, 1993), AFLPs (ZABEAU, 1993; VOS et al., 1995).

A reação da polimerase em cadeia envolve a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento de DNA (in vitro), na presença da enzima DNA polimerase. O processo baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotideos (moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores, que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo de amplificação.

Os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WELSH & MCCLELLAND, 1990) são baseados na reação da polime-

rase em cadeia, permitindo a amplificação de vários produtos de DNA numa mesma reação de PCR, possibilitando analisar várias regiões genômicas a partir de iniciadores arbitrários. Como resultado, tem-se a geração de grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, distribuídos por todo o genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Sendo um marcador dominante, não permite a distinção entre genótipos homozigotos e heterozigotos os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência do fragmento amplificado, qualquer que seja o motivo pelo qual não ocorreu a amplificação (LOPES et al. 2002).

O polimorfismo detectado por marcadores RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos (inserções ou deleções) entre os dois sítios, ou no próprio sítio de hibridização dos dois iniciadores (LOPES et al., 2002). Evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do iniciador com o sítio de iniciação e assim impedir a amplificação de um segmento (WILLIAMS et al., 1990).

A grande vantagem da tecnologia AFLP é o grande número de fragmentos que são gerados e resolvidos em uma única eletroforese. O número de marcadores simultaneamente analisados é o mais alto entre as tecnologias de marcadores disponíveis. Apresenta grande poder de detecção de variabilidade genética, explorando simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição e a ocorrência ou não de amplificação, a partir de seqüências arbitrárias. A principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por loco, semelhante ao RAPD. De maneira similar aos RAPDs, são marcadores dominantes e apenas um alelo é detectado, correspondente ao fragmento que é amplificado.

Os marcadores RAPD envolvem duas etapas: a) amplificação seletiva dos fragmentos (PCR) e b) separação em gel (eletroforese). Os AFLPs envolvem quatro etapas: a) digestão do DNA com enzimas de restrição (uma de corte freqüente e outra de corte raro); b) ligação de adaptadores específicos; c) amplificações seletivas dos fragmentos (PCR) e d) separação dos fragmentos em gel (eletroforese). Os marcadores AFLPs necessitam de uma quantidade maior de reagentes e DNA de melhor qualidade, o que demanda um processo de extração mais elaborado.

O polimorfismo obtido com AFLP está baseado em diferenças entre genótipos na distribuição dos sítios de restrição e na amplificação diferencial de fragmentos e por esta razão, possui grande capacidade para detecção de variabilidade genética em nível de DNA (VOS et al., 1995).

Marcadores moleculares são largamente utilizados para detectar e caracterizar variação somaclonal e das técnicas disponíveis, RAPD está entre as mais úteis (TODOROVISKA et al., 1997; ROUT et al., 1998). Mudanças no padrão RAPD podem resultar de perda/ganho de um anelamento de iniciadores, causados por mutação de ponto ou por inserção ou deleção de seqüências ou transposons (PESCHKE et al., 1991).

Rani et al. (1995) detectaram variações com RAPD entre 23 plantas micropropagadas de *Populus deltoides* morfologicamente similares e originadas do mesmo clone.

Erig & Schuck (2003) avaliaram fidelidade genotípica em brotações de pereira (*Pyrus communis* L.) cultivar Carrick, regeneradas in vitro, a partir de ápices caulinares e entrenós, utilizando marcadores RAPD, não conseguindo detectar variação somaclonal, quando comparadas com o padrão da planta matriz.

Além destas, uma série de outras espécies foram analisadas com este marcador e dentre elas estão o álamo (RANI et al. 1995); *Prunus persica* (HASHMI et al., 1997); morango (KUMAR et al., 1999); cana-de-açúcar (ZUCCHI et al., 2002); banana (SAHIJRAM et al., 2003), abacaxi (FEUSER et al, 2003).

Marcadores AFLP (VOS et al., 1995) têm sido modificados para utilização em estudos de metilação. Esta modificação gerou a técnica MSAP (Amplificação de Polimorfismo Sensível a Metilação).

Marcadores MSAP (REYNA-LOPES et al., 1997) são baseados na amplificação seletiva pela PCR e comparação entre fragmentos gerados pela enzima de restrição *Eco*RI e um par adicional (*Hpa*II e *Msp*I). A habilidade para clivar a seqüência 5'-CCGG-3' é afetada pelo estado de metilação dos resíduos internos ou externos (CHAKRABARTY et al., 2003).

As enzimas de restrição reconhecem os mesmos sítios, mas mostram sensibilidade diferencial para metilação do DNA. Na metilação as bandas tipo I referem-se aos fragmentos amplificados tanto pela combinação da *Eco*RI/*Hpa*II (H), quanto pela *Eco*RI/*Msp*I (M); as bandas tipo II são aquelas relativas ao arranjo *Eco*RI/*Msp*I (M) e bandas tipo III referentes ao arranjo *Eco*RI/*Hpa*II (H) (LI et al., 2002).

Bandas tipo IV são produzidas somente quando um único evento de metilação do DNA ocorre em somente uma das amostras de DNA.

Este tipo de banda pode ser útil como sonda para analisar genes relacionados à metilação e como eles poderiam estar correlacionados com alteração da expressão gênica em tecidos específicos (XU et al., 2000).

Se a seqüência junto ao local de reconhecimento da combinação *Hpa*II/*Msp*I é submetilada, os fragmentos resultantes da clivagem por *Eco*RI/*Hpa*II e *Eco*RI/MspI são idênticos e as bandas (tipo I) aparecerão em todas as amostras. Em outra situação, se a seqüência junto ao local de reconhecimento da referida combinação é metilada, fragmentos polimórficos *Eco*RI/*Hpa*II ou *Eco*RI/*Msp*I serão gerados. Primeiramente, com metilação plena da citosina interna, a enzima *Msp*I poderá cortar a seqüência, resultando em fragmentos curtos, gerados pela combinação *Eco*RI/*Msp*I (XU et al., 2000).

A enzima *Hpa*II não poderá clivar a seqüência 5'-C5mCGG-3' até reconhecer uma seqüência não metilada localizada após a seqüência metilada, resultando em fragmentos longos, gerados pela combinação *Eco*RI/*Hpa*II. Por outro lado, a hemimetilação da citosina externa (5'-mCCGG-3'/3'-GGCC-5') resultará em fragmentos longos da combinação *Eco*RI/*Msp*I, devido a inatividade da *Msp*I para cortar sequências deste tipo e fragmentos curtos gerados pela *Eco*RI/*Hpa*II, devido a atividade da *Hpa*II em reconhecer e cortar tais seqüências (XU et al., 2000).

Na análise com AFLPs somente fragmentos com tamanho entre 50 e 1500 pares de bases podem ser efetivamente amplificados e, por esta razão, fragmentos de DNA curtos tem maior chance de amplificação que fragmentos de DNA longos (XU et al., 2000).

Considera-se que um evento de metilação do DNA como polimórfico quando ao menos uma planta diferir de outra quanto ao padrão de metilação; por exemplo, uma banda que estava presente na seqüência definida pela digestão pela enzima *Msp*I e *Hpa*II em uma planta foi detectada somente em *Msp*I ou *Hpa*II em outra planta (CHAKRABARTY et al., 2003).

A enzima *Hpa*II é inativa se uma ou ambas as citosinas estiverem totalmente metiladas (duas fitas metiladas) mas cliva as seqüências hemimetiladas (uma fita metilada), enquanto a MspI cliva se a citosina interna estiver metilada (5'-CmCGG-3') mas não cliva se a externa (5'-mCCGG-3') estiver metilada (XIONG et al., 1999; CHAKRABARTY et al., 2003).

A metilação pode apresentar diversos modelos: 1) 5'-mCCGG-3'/3'-GGCC-5' (hipometilação da C externa); 2) 5'-mCCGG-3'/3'-GGCCm-5' (hipermetilação da C externa); 3) 5'-CmCGG-3'/GGCC-5'

(hipometilação da C interna); 4) 5’-CmCGG-3’/3’-GGCmC-5’ (hipermetilação da C interna).

Geralmente dois eventos de metilação levam a geração de fragmentos de DNA polimórficos. Com ampla metilação da citosina interna (5’-CmCGG-3’) a enzima MspI pode clivar a seqüência, resultando em fragmento de DNA polimórfico curto, enquanto HpaII não pode clivar a mesma seqüência, reconhecendo-a como não metilada, resultando em fragmento polimórfico longo. A hemimetilação da citosina externa resultará em fragmento longo gerado pela combinação *Eco*RI-*Msp*I, devido a inatividade da *Msp*I e um fragmento curto gerado pela combinação *Eco*RI-*Hpa*II, devido a ação do *Hpa*II (XU et al., 2000).

Outra vantagem é o número de eventos relacionados a metilação detectados, utilizando um pequeno número de combinações de iniciadores e a agilidade adicional para clonar e caracterizar novas seqüências metiladas. Por esta razão, considera-se os marcadores MSAP como uma técnica apropriada para avaliar mudanças quanto ao nível de metilação do DNA, as quais poderiam estar associadas com o fenômeno da variação somaclonal (PERAZA-ECHEVERRIA et al., 2001).

Entretanto, este método pode explorar somente a ligação entre sítios não metilados ou internamente metilados ou sítios hemimetilados. Outras possibilidades, tais como a ligação de um sítio plenamente metilado ou externamente metilado para um não metilado ou internamente metilado ainda não estão disponíveis (BAURENS et al., 2003).

Fragmentos de DNA podem ser gerados após a digestão do DNA genômico com enzimas de restrição. De maneira geral, qualquer método capaz de mostrar polimorfismo de fragmentos de DNA digerido pode ser utilizado para detectar metilação (REYNA-LÓPES et al., 1997; XIONG et al., 1999).

Xiong et al. (1999) testaram a reproducibilidade da técnica MSAP e concluíram que quase todos os fragmentos poderiam ser detectados repetidamente em diferentes reações, indicando que esse método oferece robustez para detecção eficiente da metilação do DNA.

O reconhecimento de fragmentos AFLP de tecidos específicos tem levado a identificação de genes funcionais que podem alterar seu nível de expressão (MATTHES et al., 2001).

Este método tem sido utilizado para examinar metilação no genoma de diversas espécies como milho (KAEPPLER & PHILLIPS (1993b); fungos (REYNA-LÓPEZ et al., 1997); *Daucus carota* (SIMKOVÁ, 1998); soja (YOUNG et al., 1999); arroz (XIONG et al., 1999; ASHIKAWA, 2001); *Elaeis guineensis* (JALIGOT et al., 2000; MATTHES et al., 2001); maçã (XU et al., 2000 ; LI et al., 2002; Hao &

Deng, 2003); banana (PERAZA-ECHEVERRIA et al., 2001 ; BAURENS et al., 2003); trigo (SHERMAN & TALBERT, 2002); *Arabdopsis thaliana* (POLANCO & RUIZ, 2002); *Capsicum annuum* (PORTIS et al., 2004); *Eleuterococcus senticosus* (CHAKRABARTY, 2003); *Rosa hybrida* (XU et al., 2004); *Cucurbita pepo* (LELJAK-LEVANIC et al., 2004), dentre outras.

Outra opção de análise é através da utilização de bisulfitos, os quais podem converter citosina não metilada em timina, permitindo assim, detectar as citosinas metiladas (GONZALGO & JONES, 1997b).

Outros métodos complementares foram utilizados por JALIGOT et al. (2000) em estudos de metilação. Investigando o estado de metilação em flores, estes autores fizeram determinação direta da quantidade de 5-methyl-deoxycytidine (5mdC) no DNA genômico por separação e quantificação com HPLC e utilizaram também o método da dosagem reversa (SssI-MAA), envolvendo a saturação in vitro de todos os sítios CG não metilados com resíduos metil marcados utilizando a SssI metiltransferase, permitindo assim, determinar a proporção de sítios metilados e não metilados em relação aos grupos metil inicialmente incorporados.

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Neste trabalho foram testadas as seguintes hipóteses:

a) A ocorrência de mutações em plantas micropropagadas é da mesma magnitude do que a ocorrência de mutações em plantas propagadas pelo método vegetativo tradicional;

b) Plantas micropropagadas apresentam padrão de metilação do DNA similar às propagadas pelo método vegetativo convencional.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Caracterizar a ocorrência de variações genéticas, epigenéticas e fenotípicas em plantas de macieira e morangueiro obtidas por meio de multiplicação vegetativa convencional e micropropagação.

4.2. Objetivos específicos

a) Detectar a ocorrência ou não de variação genética em plantas de macieira e de morangueiro obtidas via propagação vegetativa convencional durante três ciclos consecutivos;

b) Detectar a ocorrência ou não de variação genética em plantas de macieira e de morangueiro obtidas via micropropagação, através da organogênese em três ciclos de cultivo consecutivos;

c) Determinar o padrão de metilação do DNA e o grau de alteração em plantas de macieira e morangueiro obtidas via propagação vegetativa convencional e micropropagação, durante três ciclos consecutivos;

d) Detectar a ocorrência ou não de variação fenotica em plantas de macieira e de morangueiro obtidas via propagação vegetativa convencional e micropropagação, durante três ciclos consecutivos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

A coleção de plantas da qual foi selecionada a planta matriz para o fornecimento das estacas para enraizamento na propagação vegetativa convencional e explantes para micropropagação de macieira, porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh) foi implantada na Estação Experimental da Epagri em Lages, localizada no Planalto Sul de Santa Catarina, altitude de 960 metros, com material vegetal proveniente de um pomar comercial de propriedade do Senhor Clóvis Camargo, do município de Urupema. O material vegetativo de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne)**,** cultivar Aromas, para coleta de estolões e explantes foi cedido pelo Senhor Dalcir Pilatti, produtor rural do município de Lages.

5.1. Propagação vegetativa convencional

5.1.1. Macieira

Em agosto de 2006 (período de dormência da cultura da macieira) foram coletados ramos de uma planta matriz de Marubakaido previamente selecionada, para a confecção de estacas com três a cinco gemas, as quais foram implantadas em substrato comercial Plantmax e areia grossa (4:1), acondicionadas em recipiente plástico e mantidas em casa de vegetação.

Em setembro de 2007 foram coletados ramos originados da brotação do primeiro ciclo para confecção de novas estacas para o segundo ciclo e que foram submetidas a brotação de maneira semelhante ao primeiro ciclo. Em agosto de 2008 foram coletados os ramos originados da brotação do segundo ciclo para a confecção das estacas para o terceiro ciclo. Assim, cada planta do primeiro ciclo tinha a sua correspondente no segundo e terceiro ciclos, pois cada planta do terceiro ciclo é oirunda de uma gema de uma planta do segundo ciclo e esta, por sua vez, de uma gema de uma planta do primeiro ciclo (Figura 1). Desta forma, a taxa de multiplicação obtida foi de 1:1.

Dentro de cada ciclo de cultivo foram coletadas amostras de tecido vegetal para extração de DNA, sendo 32, 30, e 27 amostras no primeiro, segundo e terceiro ciclos, respectivamente. O número decrescente de amostras coletadas dentro dos três ciclos foi devido a perda de

algumas plantas durante a implantação do cultivo subseqüente ou durante o período de crescimento.

5.1.2. Morangueiro

Em julho de 2005 foi implantada uma coleção de 25 matrizes de morangueiro, em substrato comercial Plantmax® e areia grossa (4:1), com o objetivo de selecionar a matriz que produzisse o maior número de estolões. Em julho de 2006 coletou-se 56 estolões de uma das matrizes, os quais foram implantados em substrato com a mesma composição anterior, para condução do primeiro ciclo de cultivo a campo (propagação vegetativa convencional).

Em julho de 2007 coletou-se 38 estolões, um de cada planta remanescente do ciclo anterior, os quais foram implantados para a formação do segundo ciclo. Em janeiro de 2008 coletou-se amostras de tecido vegetal de 32 estolões emitidos pelas plantas do segundo ciclo, os quais formaram o terceiro ciclo. Todas as plantas do primeiro ciclo deveriam ter a sua descendência no segundo e terceiro ciclo, mas, algumas plantas foram perdidas (não houve brotação e enraizamento das estacas), não sendo possível obter clones para todas as plantas. Similarmente à macieira, cada planta do terceiro ciclo é oriunda de uma planta do segundo ciclo, que por sua vez originou-se de uma planta do primeiro ciclo (Figura 1). Assim, a taxa de multiplicação alcançada foi de 1:1.

Dentro de cada ciclo de cultivo foram coletadas 32 amostras de tecido vegetal (folhas jovens) para extração de DNA.

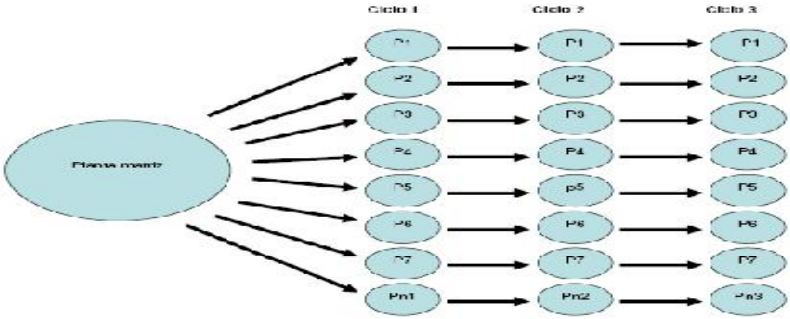

Figura 1 - Representação esquemática do processo de propagação de macieira e morangueiro.

5.2. Micropropagação

5.2.1. Macieira

Em meados de setembro de 2006, da mesma planta matriz que forneceu material para propagação vegetativa convencional foram selecionados segmentos de caule de aproximadamente dois centímetros para coleta de gemas que serviram como explantes para o experimento de micropropagação.

Os segmentos do caule foram submetidos ao protocolo de rotina do Laboratório de Biotecnologia de Epagri/Lages para o prepar e isolamento da gema: lavagem com água e sabão; água corrente durante 30 min; imersão em álcool 70% durante 15 s em câmara de fluxo laminar; imersão em solução de hipoclorito de sódio 1,5% durante 15 min; tríplice lavagem com água deionizada esterilizada; solução de ácido ascórbico (0,5 $g.L^{-1)}$ e ácido cítrico (0,5 $g.L^{-1}$) por 15 min (evitar oxidação); retirada da gema.

As gemas foram implantadas em tubos de ensaio (1 unidade cada) contendo o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 1,0 $mg.L^{-1}$ de BAP, 0,01 $mg.L^{-1}$ de ANA, 0,1 $mg.L^{-1}$ de GA3, pH entre 5,8 e 5,9 e levadas para sala de incubação onde foram mantidas durante 30 dias a temperatura de 22 a 24 ^{0}C, fotoperíodo de 16 h com densidade de fluxo de fótons de 20 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$, para indução de brotação. Em meados de outubro de 2006 os explantes foram transferidos para frascos com capacidade para 200 ml contendo 30 ml do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 0,8 $mg.L^{-1}$ de BAP, pH entre 5,8 e 5,9, para multiplicação (primeiro ciclo).

Em novembro de 2006 (40 dias após) fez-se repicagem deste material, sendo que parte foi utilizada como explante para novo subcultivo (segundo ciclo), parte foi reservada para extração de DNA e parte foi submetido ao enraizamento (primeiro ciclo) com a utilização do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 1,0 $mg.L^{-1}$ de AIA, pelo período de 40 dias. No início de janeiro de 2007 repetiu-se o processo, objetivando implantar o terceiro ciclo de micropropagação, coletar tecido vegetal para extração de DNA e implantar mais um ciclo de enraizamento (segundo ciclo). Em meados de fevereiro de 2007 coletou-se tecido vegetal das brotações resultantes do ciclo anterior e implantou-se novo ciclo de enraizamento (terceiro ciclo).

A taxa média de multiplicação obtida em cada ciclo foi de 6:1, ou seja, cada ramo repicado do ciclo anterior gerou 6 novos ramos, os quais foram utilizados para multiplicação do ciclo seguinte.

Após devidamente enraizadas as plantas foram levadas para o ambiente de aclimatização, acondicionadas em bandejas contendo terra peneirada autoclavada (120 ^{0}C, por 30 min) misturada com substrato Plantmax® na proporção de 3:1, permanecendo neste local por aproximadamente 30 dias, sob nebulização e, após, levadas para casa de vegetação. Em função do surgimento de moléstias fúngicas no ambiente de aclimatização, as plantas do segundo ciclo foram perdidas, não sendo possível incluir os dados da avaliação fenotípica referentes ao segundo ciclo de micropropagação.

Para extração de DNA foram coletadas 32 amostras no primeiro, 30 amostras no segundo e 27 amostras no terceiro ciclo da propagação vegetativa convencional e 32 amostras no primeiro, 36 amostras no segundo e 27 amostras no terceiro ciclo da micropropagação. A diferença no número de amostras entre os ciclos deve-se a perda de amostras no decorrer dos ciclos e a inclusão de outras para recomposição do conjunto.

5.2.2. Morangueiro

Em julho de 2007, gemas coletadas dos estolões obtidos via propagação convencional no primeiro ciclo foram utilizadas para introdução do experimento de micropropagação. O protocolo de rotina do Laboratório de Biotecnologia de Epagri/Lages foi utilizado para preparo e extração da gema: escovação com água e sabão; água corrente durante 30 min; solução de Cloreto de mercúrio 0,15 % durante 15 min; tríplice lavagem com água deionizada esterilizada; imersão em álcool 70% durante 15 s; imersão em solução de hipoclorito de sódio 1,5% durante 15 min; tríplice lavagem com água deionizada esterilizada; solução de ácido ascórbico (0,5 g.L^{-1}) e ácido cítrico (0,5 g.L^{-1}) por 15 min (evitar oxidação); retirada da gema.

As gemas foram colocadas em tubo de ensaio (1 unidade cada) contendo 15 ml do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 1,0 mg.L^{-1} de BAP, 0,01 mg.L^{-1} de ANA, 0,1 mg.L^{-1} de GA3, pH entre 5,8 e 5,9 e levadas para sala de crescimento onde permaneceram 30 dias à temperatura de 22 a 24 °C e fotoperíodo de 16 h com densidade de fluxo de fótons de 20 µmol m^{-2} s^{-1}, para indução do processo de micropropagação.

Em agosto de 2007 os explantes foram transferidos para frascos com capacidade para 200 ml, contendo 30 ml do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 2,0 $mg.L^{-1}$ de BAP e 1,5 $mg.L^{-1}$ de GA3, pH entre 5,8 e 5,9, para multiplicação (primeiro ciclo). Em setembro de 2007 fez-se repicagem do material resultante para implantação do segundo ciclo. Parte da brotação foi utilizada para implantar experimento de enraizamento (primeiro ciclo) e parte para coleta de tecido vegetal para extração de DNA. Em novembro de 2007 fez-se nova repicagem para implantação do terceiro ciclo, enraizamento das plantas do segundo ciclo e coleta de tecido para extração de DNA. O esquema de multiplicação utilizado nesta espécie foi o mesmo utilizado para macieira, conforme ilustrado pela Figura 1.

A taxa média de multiplicação obtida em cada ciclo foi de 4:1, ou seja, cada ramo repicado do ciclo anterior gerou 4 novos ramos, os quais foram utilizados para multiplicação do ciclo seguinte.

Em dezembro de 2007, com material resultante deste ciclo fez-se implantação de enraizamento (terceiro ciclo) e coleta de tecido para extração de DNA.

O enraizamento foi feito em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 0,005 $mg.L^{-1}$ de BAP, nas condições de crescimento semelhante a multiplicação, permanecendo nesta condição por um período de 40 dias.

Após devidamente enraizadas as plantas foram levadas para o ambiente de aclimatização, onde foram acondicionadas em bandejas contendo terra peneirada autoclavada (120 ^{0}C, por 30 min) e misturada com Plantmax® na proporção de 3:1, permanecendo neste local por aproximadamente 30 dias, sob nebulização e, após, levadas para casa de vegetação para avalaição fenotípica.

Para a extração de DNA coletou-se tecido vegetal de 32 amostras em cada ciclo de propagação vegetativa convencional e de micropropagação.

5.3. Caracterização genética e epigenética

5.3.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA foi coletado tecido foliar das plantas obtidas em cada ciclo e para cada uma das espécies em estudo e seguiu-se as recomendações de Doyle & Doyle (1987), utilizando o seguinte protocolo: coleta de aproximadamente 150 mg de tecido foliar fresco dire-

tamente no tubo plástico; adição de nitrogênio líquido e macerar até a obtenção de pó fino; acréscimo de 700 µl de tampão de extração (20 mg/ml de CTAB; 81,2 mg.L^{-1}de NaCl; 20 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético); 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 20 mg.L^{-1} de PVP; 1 ml de 2-mercaptoetanol); incubação em banho-maria a 60 ^{0}C por 40 a 60 min, invertendo-os a cada 15 min para homogeneização; retirada do banho-maria e manutenção sobre a bancada até atingir a temperatura ambiente; adição de 600 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (CIA 24:1) e mistura por inversão até formar uma emulsão homogênea; centrifugação a 12.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente; transferência da fase aquosa para novo tubo; adição de 600 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (CIA 24:1) e mistura por inversão até formar uma emulsão homogênea; centrifugação a 12.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente; transferência da fase aquosa para novo tubo; adição de 2/3 do volume de isopropanol frio (-20 ^{0}C), incubação a -20 ^{0}C, por 30 min e na seqüência, centrifugação a 7.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente; descarte do sobrenadante e espera de 5 min para evaporação do isopropanol (secagem precipitado); adição de 1 ml de etanol 70 % ao precipitado mantendo nesta condição por 5 min; descarte do sobrenadante e adição de 1 ml de etanol 95 %,mantendo nesta condição por 3 min; descarte do sobrenadante e manutenção dos tubos na bancada até evaporação do etanol (secagem do precipitado); adição de 50 ul de TE + RNAse (10 mg/ml de RNAse); incubação em banho-maria por 30 min a 37 ºC; e armazenamento em freezer a –20 ºC.

5.3.2. Estimativa da variação genética através de detecção de mutação no DNA

Para estimar a ocorrência de variação genética entre as amostras, ciclos de cultivo e modalidades de propagação foi utilizada a técnica de marcadores moleculares AFLPs (VOS et al., 1995). No protocolo, abaixo descrito, utilizou-se uma combinação de iniciadores para pré-amplificação e uma combinação para amplificação seletiva de DNA, conforme descrição a seguir.

5.3.2.1. Digestão do DNA genômico com enzimas *Eco*RI+*Mse*I

O DNA genômico foi digerido com as enzimas *Eco*RI e *Mse*I com incubação a temperatura ambiente durante 12 h. A reação foi preparada como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Componentes utilizados na reação de digestão do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise AFLP.

Componente	Quantidade
DNA genômico	500 ng
*Eco*RI	3 U
*Mse*I	3 U
Tampão restrição-ligação	10%
Água ultra pura até	20 μl

O tampão restrição-ligação tem como componentes o TrisHAc (10 mM), Acetato de magnésio (10 mM), Acetato de potássio (50 mM), DTT [Dithiothreitol] (5 mM), pH 7,5.

5.3.2.2. Ligação de adaptadores

A reação de ligação foi feita logo após a reação de digestão com adição de 10 μL da solução abaixo (Tabela 2), permanecendo em temperatura ambiente por 12 h.

Tabela 2 - Componentes utilizados na reação de ligação dos adaptadores no DNA genômico de macieira e morangueiro para reação AFLP.

Componente	Quantidade
Adaptador de *Eco*RI	5 pmol
Adaptador para *Mse*I	50 pmol
T4 DNA ligase	1 U
ATP	0,25 mM
Tampão de restrição-ligação	10%
Água ultra pura até	10 μl

5.3.2.3. Reação de pré-amplificação

Após a ligação dos adaptadores a solução resultante foi diluída na proporção de 1:4, com tampão TE, e utilizada como molde na amplificação seletiva conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Componentes utilizados na reação de pré-amplicação do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise AFLP.

Componente	Quantidade
DNA digerido/ligado (diluído 1:4)	5 µL
Iniciador *Eco*RI+A	10 pmol
Iniciador *Mse*I+C	10 pmol
dNTPs (cada um)	0.2 mM
MgCl2	10 mM
Taq DNA Polimerase	1 U
Tampão para PCR (10X)*	10%
Água ultra pura até	15 µL

*Composto por Tris-HCl (100 mM), MgCl2 (15 mM), KCl (500 mM).

A reação de PCR de pré-amplificação constou de um ciclo de 30 s a 94 ^{0}C, trinta ciclos de 30 s a 94 ^{0}C para desnaturação do DNA; 30 s a 56 ºC para anelamento; 1 min a 72 ºC para extensão, mais um ciclo de 5 min a 72 ºC para complementar o processo.

5.3.2.4. Reação de amplificação seletiva

O produto resultante da reação de pré-amplificação foi duiluído na proporção de 1:10, com tampão TE e submetido a amplificação seletiva, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Componentes utilizados na reação de amplificação seletiva do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise AFLP.

Componente	Quantidade
DNA pré-amplicado (diluição 1:10)	5 µL
Iniciador *Eco*RI+AAT**	10 pmol
Iniciador *Mse*I+CAA	10 pmol
dNTPs (cada um)	0.2 mM
$MgCl_2$	10 mM
Taq DNA Polimerase	1 U
Tampão para PCR (10 X)	10%
Água ultra pura até	20 µL

** Com marcação fluorescente (HEX)

Esta solução foi submetida a PCR para amplificação do DNA com 1 ciclo de 2 min a 94 ^{0}C, 12 ciclos (30 s a 94 ^{0}C para desnaturação, 30 s a 65 ^{0}C para anelamento e 1 min a 72 ^{0}C para extensão), sendo que nestes 12 ciclos a temperatura de anelamento teve diminuição em 0,7 ºC por ciclo e após esta fase, a reação permaneceu por mais 23 ciclos (30 s a 94 ^{0}C, 30 s a 65 e 1 min a 72 ^{0}C), seguida por 1 ciclo de 2 min a 72 º C para complementar o processo. O tampão 10 X é composto de Tris-HCl (100 mM), MgCl2 (15 mM), KCl (500 mM).

5.3.3. Caracterização da variação epigenética através da alteração do padrão de metilação do DNA

Para estimar e monitorar o padrão de metilação do DNA foi utilizada a técnica de marcadores moleculares AFLPs (VOS et al., 1995) com modificações (MSAP), seguindo as recomendações de Reyna-Lopes (1997), (Tabelas 5, 6, 7 e 8). As enzimas *Hpa*II e *Msp*I foram utilizadas como corte freqüente, em substituição a *Mse*I do protocolo AFLP. Utilizou-se uma combinação de iniciadores para pré-amplificação e uma combinação para amplificação seletiva de DNA (Tabelas 7 e 8).

5.3.3.1. Reação de digestão do DNA genômico com enzimas *Eco*-RI+*Hpa*II/*Msp*I

O DNA genômico foi digerido com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II e *Eco*RI+*Msp*I em reações separadas, com incubação a temperatura ambiente durante 12 h. A reação foi preparada conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - Componentes utilizados na reação de digestão do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise MSAP.

Componente	**Quantidade**
DNA genômico	500 ng
EcoRI	3 U
*Hpa*II/*Msp*I	3 U
Tampão restrição-ligação**	10%
Água ultra pura até	20 µl

** TrisHAc (10 mM), Acetato de magnésio (10 mM), Acetato de potássio (50 mM), DTT [Dithiothreitol] (5 mM), pH 7,5.

5.3.3.2. Ligação de adaptadores

A reação de ligação (Tabela 6) foi feita logo após a reação de digestão com adição de 10 μL da solução abaixo, mantida em temperatura ambiente por 12 h.

Tabela 6 - Componentes utilizados na reação de ligação de adaptadores no DNA genômico dee macieira e morangueiro para análise MSAP.

Componente	Quantidade
Adaptador de *Eco*RI	5 pmol
Adaptador para *Hpa*II/*Msp*I	50 pmol
T4 DNA ligase	1 U
ATP	0,25 mM
Tampão de restrição-ligação	10%
Água ultra pura até	10 μl

5.3.3.3. Reação de pré-amplificação

Após a ligação dos adaptadores a solução resultante foi diluída na proporção de 1:4, com tampão TE, e utilizada como molde na amplificação seletiva conforme a Tabela 7.

O tampão PCR (10 X) é composto por Tris-HCl (100 mM), $MgCl_2$ (15 mM), KCl (500 mM). A reação de PCR para pré-amplificação constou de um ciclo de 30 s a 94 ^{0}C, trinta ciclos (30 s a 94°C para desnaturação do DNA; 30 s a 56 ºC para anelamento; 1 min a 72ºC para extensão), mais 5 min a 72 ºC para complementar o processo.

Tabela 7 - Componentes utilizados na reação de pré-amplificação do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise MSAP.

Componente	Quantidade
DNA digerido/ligado (diluído 1:4)	5 μL
Iniciador *Eco*RI+A	10 pmol
Iniciador *Hpa*II/*Msp*I+T	10 pmol
dNTPs (cada um)	0.2 mM
$MgCl_2$	10 mM
Taq DNA Polimerase	1 U
Tampão para PCR (10X)	10%
Água ultra pura até	15 μl

5.3.3.4. Reação de amplificação seletiva

O produto resultante da reação de pré-amplificação foi duiluído na proporção de 1:10, com tampão TE e submetido a amplificação seletiva, conforme Tabela 8.

Esta solução foi submetida a PCR para amplificação do DNA com 1 ciclo de 2 min a 94 ^{0}C, 12 ciclos (30 s a 94 ^{0}C para desnaturação, 30 s a 65 ^{0}C para anelamento e 1 min a 72 ^{0}C para extensão), sendo que nestes 12 ciclos a temperatura de anelamento teve diminuição em 0,7 ºC por ciclo e após esta fase, permaneceu por mais 23 ciclos (30 s a 94 ^{0}C, 30 s a 65 ^{0}C e 1 min a 72 ^{0}C), seguida por 1 ciclo de 2 min a 72 º C para complementar o processo. O tampão 10 X é composto de Tris-HCl (100 mM), MgCl2 (15 mM), KCl (500 mM).

Tabela 8 - Componentes utilizados na reação de amplificação seletiva do DNA genômico de macieira e morangueiro para análise MSAP.

Componente	Quantidade
DNA pré-amplificado (diluição 1:10)	5 μL
Iniciador *Eco*RI+AAT**	10 pmol
Iniciador *Hpa*I/*Msp*I+TAA	10 pmol
dNTPs (cada um)	0.2 mM
$MgCl_2$	10 mM
Taq DNA Polimerase	1 U
Tampão para PCR (10 X)	10%
Água ultra pura até	20 μL

** Com marcação fluorescente (HEX)

5.3.4. Eletroforese de fragmentos de DNA

As etapas de aferição de protocolos para a extração de DNA e sua efetivação propriamente dita foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Estação Experimental da Epagri em Lages e a aferição de protocolos referente a eletroforese e sua condução foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

A eletroforese foi conduzida no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, entre os meses de novembro de

2009 e janeiro de 2010. Para este análise utilizou-se o MegaBACE DNA Analysis System 1000 Amersham Biosciences Corp.

Aliquotas de 2 μL de cada amostra do DNA amplificado foram aplicadas em placa para PCR de 96 poços. Junto a esta alíquota adicionou-se 7,75 μL de Tween 20 0,1 % e 0,25 μL de padrão de peso molecular ET ROX 550 (MegaBACE ET550-R Size Standard). O referido padrão permite analisar fragmentos entre 60 e 550 pares de bases. A injeção das amostras foi feita durante 80 s com carga elétrica de 3 V. A eletroforese foi conduzida durante 75 min e carga elétrica de 9 V. Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa MegaBACE Fragment Profiler 1.2, o qual gerou uma matriz de de 1 e 0, significando a presença e ausência de determinado fragmento de DNA.

5.3.5. Variáveis analisadas e análise estatística

Para comparar os dados de variação obtidos na análise de mutação de DNA detectada entre as modalidades de propagação e dentro dos ciclos de cultivo, foram utilizados dados percentuais de: indivíduos que apresentaram diferentes padrões de fragmentos, bandas polimórficas e fragmentos polimórficos, tendo como referência a planta matriz.

Na análise da variação encontrada, referente a mudanças no padrão de metilação de DNA analisou-se: indivíduos que apresentaram diferentes padrões de metilação, bandas polimórficas (faixa de tamanho de fragmento diferente daquelas detectadas na planta matriz), fragmentos polimórficos/metilados (soma de todos os fragmentos detectados na eletroforese de tamanho diferente daqueles detectados na planta matriz) e fragmentos demetilados (fragmentos que estavam presentes na planta matriz e não apareceram no gel de eletroforese das demais amostras), comparando as modalidades de cultivo dentro de cada ciclo de propagação. A referência utilizada para comparativo das variações ocorridas foi o padrão apresentado pela planta matriz.

A opção pela denominação “banda” deu-se em função da impossibilidade de definir locos na análise, já que o marcador utilizado (AFLP/MSAP) é dominante, apresentando somente um fragmento na eletroforese, o qual representa tanto o genótipo homozigoto como o heterozigoto, ambos dominantes.

A análise estatística foi realizada através do teste do Qui-quadrado, a partir de tabelas de contingência, considerando uma probabilidade de erro de 5%, com a utilização do SAS/STAT® 9.2 (2008).

5.4. Avaliação fenotípica

5.4.1. Macieira

As plantas obtidas através da propagação vegetativa convencional e micropropagação foram submetidas à avaliação fenotípica, com objetivo de detectar variações nas características com relação a planta matriz.

Foram analisadas 32, 30 e 27 plantas do primeiro, segundo e terceiro ciclo, respectivamente, da propagação vegetativa convencional e 84 e 88 plantas no primeiro e terceiro ciclos, respectivamente, da micropropagação, após a devida aclimatização.

As plantas de macieira obtidas foram submetidas a avaliação fenotípica quanto a i) coloração pela antocianina na folha em crescimento; ii) posição folhas em relação ao caule; iii) comprimento folha; iv) largura folha; v) conformação da margem da folha; vi) flexibilidade dos ramos. As avaliações foram feitas a cada três semanas.

5.4.2. Morangueiro

Foram analisadas 64, 50 e 52 plantas do primeiro, segundo e terceiro ciclo, respectivamente, da propagação vegetativa convencional e 51, 53 e 35 plantas no primeiro, segundo e terceiro ciclos, respectivamente, da micropropagação, após a devida aclimatização. As plantas foram submetidas a avaliação fenotípica analisando i) forma dentes dos folíolos; ii) cor da folha; iii) posição da inflorescência em relação a folhagem, a cada três semanas. As plantas do primeiro ciclos da propagação vegetativa convencional foram avaliadas de setembro de 2006 a março de 2007, as do segundo ciclo de setembro de 2007 a março de 2008 e as do terceiro ciclo, de setembro de 2008 a março de 2009. As plantas micropropagadas foram avaliadas de julho de 2007 a janeiro de 2008.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Mutação em plantas de macieira obtidas via propagação vegetativa convencional e micropropagação

Nas plantas de macieira obtidas via propagação vegetativa convencional verificou-se a ausência de um fragmento (550 pb) em três plantas, uma planta de cada ciclo de cultivo, comparativamente à planta matriz. As plantas variantes não tiveram sua correspondente nos ciclos seguintes em função da perda de algumas plantas durante o desenvolvimento do novo ciclo de cultivo.

Considerando que na propagação convencional foram analisadas 32 plantas no primeiro ciclo, 30 plantas no segundo ciclo e 27 plantas no terceiro ciclo (Tabela 9), os resultados revelaram uma taxa de mutação média de 3,1%, 3,3% e 3,7%, respectivamente (Figura 2).

Ainda, foram detectados eventos relacionados à mutação em plantas de macieira obtidas por micropropagação no segundo e terceiro ciclos, alcançando 97,2% das plantas analisadas no segundo ciclo e 100% no terceiro ciclo, comparativamente a planta matriz (Figura 2).

Os resultados obtidos para a taxa de mutação em macieira via propagação vegetativa convencional e micropropagação evidenciaram diferenças estatísticas pelo teste x^2, ao nível de significância de 5% de probabilidade de erro, ao longo dos ciclos de cultivo (Tabela 9). Foram observadas diferenças estatísticas para a taxa de mutação em relação ao modo de propagação para o segundo e terceiro ciclos de cultivo (P<0,0001; Tabela 9).

Tabela 9 – Número de plantas mutantes e nível de significância pelo teste de x2, em três ciclos de cultivo em plantas de macieira obtidas por propagação convencional e micropropagação, digeridas com as enzimas *Eco*RI+*Mse*I.

Ciclo de cultivo	Modo de propagação	Plantas avaliadas	Bandas matriz	Bandas avaliadas	Variação do número bandas	Plantas mutantes	x^2
1	Convencional	32	22	22	1	1	0.3135
	Micropropagação	32	22	22	0	0	
2	Convencional	30	22	22	1	1	<0.0001
	Micropropagação*	36	22	76	6-22	35	
3	Convencional	27	22	22	1	1	<0.0001
	Micropropagação*	35	21	95	2-17	35	

*significativo pelo teste x2 ao nível de significância de 5% de probabilidade de erro.

A Figura 2 mostra os percentuais de plantas mutantes e não mutantes, no primeiro, segundo e terceiro ciclos de cultivo, sendo que, a quantidade de plantas mutantes entre as modalidades de cultivo e dentro de cada ciclo de cultivo foi diferente para os dois sistemas de propagação. Nota-se que o percentual de mutação na propagação vegetativa convencional manteve-se estável durante os ciclos de cultivo, mas, na micropropagação o percentual de variação que era inexistente ao final do primeiro ciclo, elevou-se acentuadamente no segundo ciclo (97,2%) e alcançou 100% das plantas analisadas no terceiro ciclo, mostrandol, diferenças estatísticas entre as modalidades de propagação no segundo e terceiro ciclos ($P<0.0001$)

A taxa de 3,1% ocorrida na multiplicação vegetativa convencional refere-se a ocorrência de mutação em uma das plantas analisadas, enquanto este evento não ocorreu na micropropagação. No segundo e terceiro ciclos a taxa de mutação na multiplicação convencional permaneceu a mesma.

A mutação ocorrida em uma planta em cada ciclo de propagação convencional refere-se a ausência de um fragmento de 550 pb. Uma hipótese para explicar a variação observada na propagação vegetativa convencional é que esta poderia estar associada à ocorrência de problemas na ligação dos adaptadores e no anelamento dos iniciadores no processo de amplificação do DNA. Alternativamente, sugere-se a ocorrência de uma mutação, o que é reforçado pelo fato desta variação ter sido detectada em diferentes plantas em distintos ciclos.

Segundo Li et al. (2002) a ausência de fragmento pode ser causada por problemas na digestão do DNA (DNA não digerido ou digestão incompleta). A confirmação desta hipótese dependeria de uma análise mais criteriosa, com uma maior concentração de enzimas de restrição, maior número de combinações de iniciadores e uma análise fenotípica mais apurada. Partindo do princípio que fragmentos menores têm maior probabilidade de amplificar (XU et al., 2000), a utilização de diferentes concentrações das enzimas de restrição poderia gerar fragmentos menores e o aumento no número de combinações de iniciadores aumentaria a probabilidade de amplificação.

De acordo com Cullis (2005), o surgimento de variantes somaclonais pode não ser um processo exclusivo da micropropagação, podendo ocorrer de maneira natural em plantas e tecidos reprodutivos.

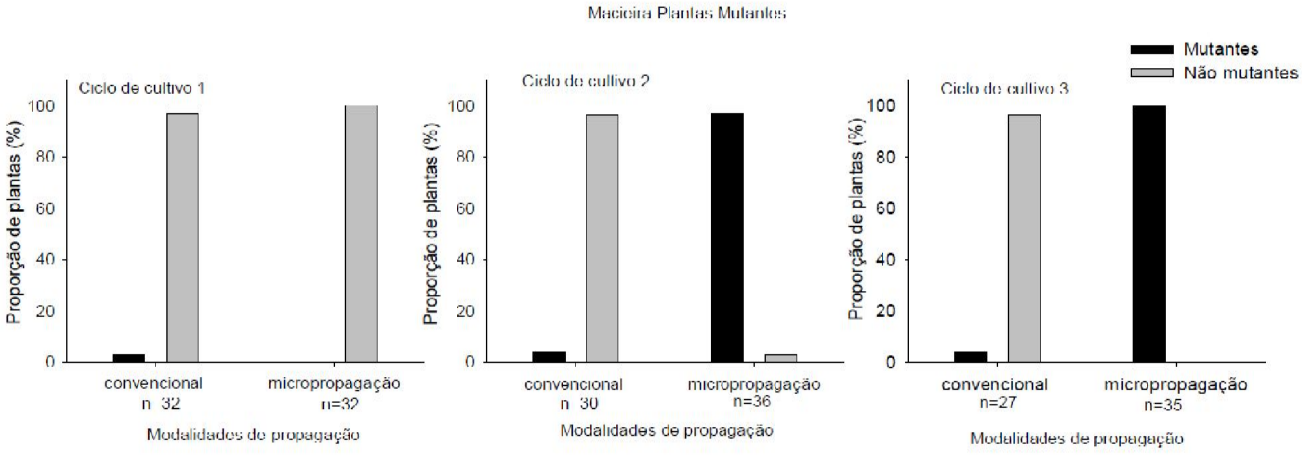

Figura 2 – Número total de plantas avaliadas (n) e percentual (%) de plantas mutantes e não mutantes de macieira, com relação a planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores AFLP.

A avaliação de variações genéticas em plantas obtidas por via vegetativa tradicional não tem sido objeto de pesquisa, provavelmente em razão da expectativa de que a clonagem resultaria em plantas genética e fenotipicamente iguais a planta mãe e também, pelas dificuldades na identificação dos variantes.

Embora se conheçam exemplos de mutações naturais ocorridas em cultivares de macieira, como é o caso da Fuji Suprema (CAMILO & DENARDI, 2002), Epagri 407-Lisgala (DENARDI et al., 1997), Castel Gala (DENARDI & SECCON, 2005) e da videira Redimeire (NACHTIGAL & CAMARGO, 2005), estas espécies não tem sido alvo de avaliação em sucessivos ciclos de cultivo a campo.

Trabalhos científicos normalmente caracterizam plantas de cultivo tradicional como parâmetro para avaliar variações genéticas e epigenéticas que possam ocorrer em plantas regeneradas a partir de explantes retirados destas.

O presente trabalho relata a ocorrência de variação genética numa taxa média de 3,3%, analisando três ciclos consecutivos de cultivo. Embora esta taxa pareça baixa, este dado aliado à ocorrência de mutações somáticas espontâneas em algumas espécies, conforme citado anteriormente, mereceria atenção por parte de viveiristas e multiplicadores de mudas, especialmente de espécies frutíferas, no intuito de monitorar o material produzido com referência a possibilidade de ocorrência de variações, as quais poderiam descaracterizar uma determinada cultivar, conforme fosse aumentando o número de ciclos de cultivo.

Na micropropagação, ao final do primeiro ciclo de cultivo um grande número de plantas apresentava mutações, sendo que esta variação foi mantida no ciclo seguinte.

Schellenbaum et al. (2008) avaliando clones de videira através de marcadores AFLPs, detectaram polimorfismo entre clones fornecedores de explantes e aqueles resultantes da micropropagação e neste segundo grupo, a taxa de polimorfismo detectada foi de 1,3 - 2,8 vezes maior que o encontrado entre clones doadores de explantes, mostrando que a micropropagação tende a gerar maior instabilidade genética que a propagação convencional.

A avaliação do percentual de bandas polimórficas proporcionada pelas duas modalidades de propagação revelou a existência de diferenças estatísticas no primeiro ciclo ($P=0.0013$), segundo e terceiro ciclo de cultivo ($P<0.0001$; Figura 3).

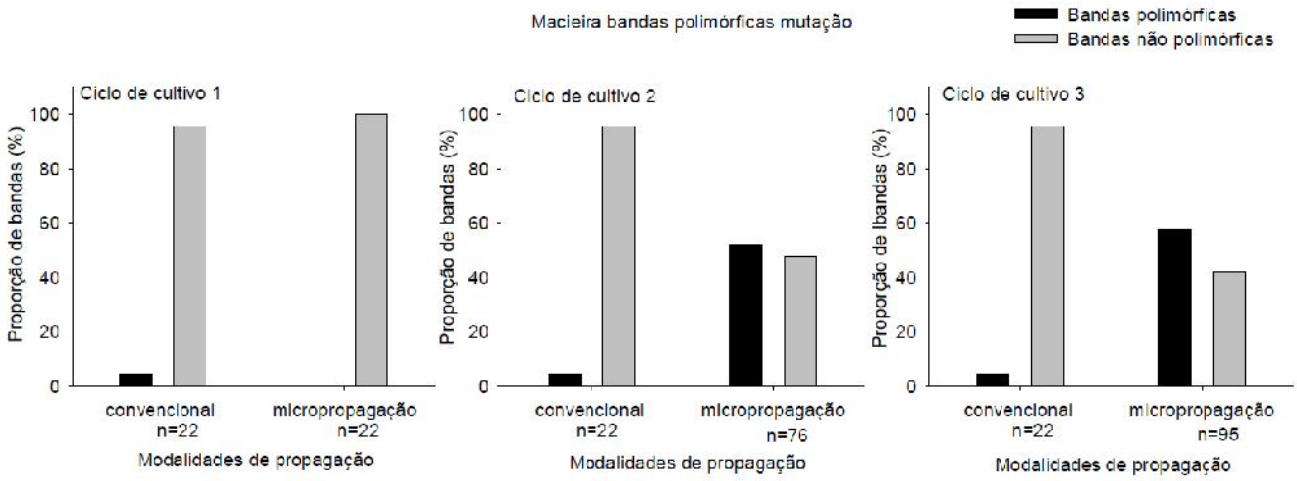

Figura 3 – Número total de bandas analisadas (n), percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de mutação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação a partir fragmentos gerados por AFLP..

A variação detectada no primeiro ciclo de cultivo deve-se a uma banda polimórfica detectada na análise das plantas de propagação convencional, o qual representa 4,5% do total analisado (22), contra a ausência de bandas polimórficas nas plantas micropropagadas.

No segundo ciclo as plantas micropropagadas mostraram variação acentuada em relação à propagação convencional, onde 45 bandas mostraram polimofismo, representando 52,3% do total analisado (76). No terceiro ciclo a variação na micropropagação mostrou-se ainda mais acentuada, quando foram observadas 55 bandas polimórficas, representando 57,9% do total de bandas detectadas (95).

Na análise do número de fragmentos polimórficos dentro dos três ciclos de cultivo e entre as modalidades de propagação (Figura 4), detectaram-se diferenças estatísticas através do qui-quadrado, no primeiro ($P=0.013$), segundo ($P<0.0001$) e terceiro ($P<0.001$) ciclos.

A micropropagação mostrou superioridade no número de fragmentos polimórficos detectados, nos três ciclos de cultivo (Figura 4). No primeiro ciclo de cultivo a diferença de 12 bandas polimórficas entre as modalidades de propagação determinou a significância estatística ($P=0.0013$) entre os resultados obtidos. Esta diferença refletiu-se em 1,8% dos fragmentos analisados, contra 0,2% (1 fragmento de um total de 704), que representou apenas 0,2% do total analisado.

No segundo ciclo de cultivo, 53,3% (215 fragmentos) do número total de fragmentos analisados (403) referia-se a polimorfismo, contra 0,2% (1 fragmento) de um total de 704, referia-se a polimorfismo, justificando a diferença estatística ($P<0.0001$) em favor da micropropagação.

No terceiro ciclo, a variação continuou significativa ($P<0.0001$) em favor da micropropagação, tendo analisado 496 fragmentos e 214 destes (44%) sendo caracterizados como polimórficos, enquanto na propagação convencional, somente um fragmento polimórfico foi detectado, referente a 0,2% de um total de 704 fragmentos analisados.

Variantes em plantas de macieira micropropagadas foram anteriormente detectadas em outros estudos. Gupta et al. (2009) relataram diferenças genéticas encontradas em 23% das plantas da progênie em relação a planta mãe em macieira, porta-enxerto EMLA 111. Modgil et. (2005) relataram a ocorrência de variação genética (23%) em plantas de porta-enxerto de macieira MM 106 micropropagadas, originadas de gemas axilares.

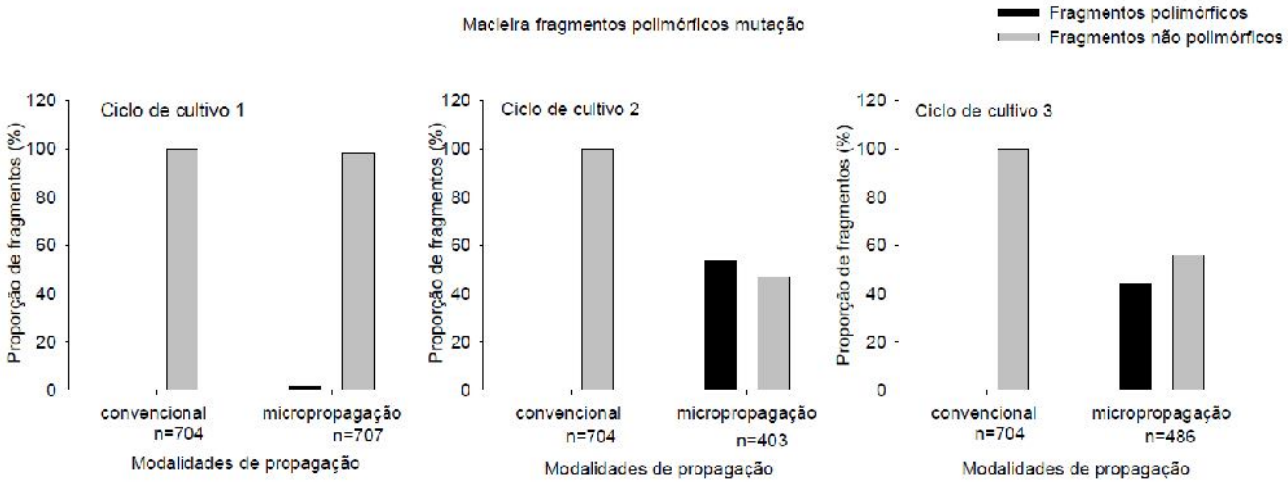

Figura 4 – Número de fragmentos analisados (n), percentual de fragmentos polimórficos e não polimórficos detectados na análise de mutação dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação de plantas de macieira, a partir de fragmentos gerados por AFLP.

Feuser et al. (2003) caracterizaram um grupo de 504 plantas de abacaxizeiro obtidas através de micropropagação e detectaram que 6,3% das plantas analisadas apresentavam variação.

Parani et al. (1997) detectaram 10% de plantas variantes analisando amostras de *Piper longum*.

Modgil et al. (2005) analisando macieira porta-enxerto MM 106, relataram detecção de polimorfismo em fragmento de DNA numa taxa de 23,3%.

Rani et al. (1995) relataram uma taxa de variação de 26 % entre plantas micropropagadas de *Populus deltoides*. Os trabalhos citados utilizaram marcadores RAPDs para a referida caracterização.

Comparativamente aos exemplos acima, os resultados obtidos no presente trabalho mostram variação acentuada (97,2% e 100%, no segundo e terceiro ciclo, respectivamente). Na maioria dos trabalhos de literatura a separação de fragmentos na eletroforese é feita em gel vertical de poliacrilamida, cuja separação e definição de fragmentos tende a ser menos precisa.

No presente trabalho, a utilização de um sistema de análise de alta precisão (MegaBACE DNA Analysis System) permitiu a separação de fragmentos em bandas diferenciadas por apenas um par de bases. Assim, a diferença de apenas um par de bases já foi suficiente para caracterizar variação. Além disso, a metodologia utilizada no presente trabalho gerou um maior número de bandas, maior número de marcadores e por conseqüência, trouxe maior confiabilidade nos resultados.

6.2. Padrão de metilação em macieira obtida via propagação vegetativa convencional e micropropagação

Para estudar o padrão de metilação nas plantas obtidas via propagação vegetativa convencional, fez-se digestão do DNA com a combinação de enzimas *Eco*RI+*Hpa*II e detectou-se 22 bandas na planta matriz e 22 bandas entre as plantas analisadas, no primeiro e segundo ciclo, entretanto, nenhuma planta apresentou variação. No terceiro ciclo o mesmo número de bandas foi detectado, sendo que o número de bandas analisada entre as plantas variou de 3 – 21, com 33 bandas analisadas no grupo de plantas, tendo detectado variação em 26 plantas, representando 96,2% das plantas analisadas (Tabela 10).

Com relação ao padrão de metilação em macieiras micropropagadas, a partir da digestão do DNA com a combinação de enzimas *Eco*RI+*Hpa*II, detectou-se variação no primeiro ciclo, onde o número de

bandas analisadas entre o grupo de plantas variou de 6 a 24, num total de 58 bandas analisadas, detectando 23 plantas (71,8%) com variação, em comparação a planta mãe.

No segundo ciclo, com 41 bandas observadas, a análise revelou variação de 2 a 34 no número de bandas detectadas entre o grupo de plantas, caracterizando variação no padrão de metilação em 25 plantas (69,4%). No terceiro ciclo 27 plantas (77,1%) mostraram variação, com de 2 a 33 bandas analisadas entre as plantas, totalizando 82 bandas analisados (Tabela 10).

Tabela 10 – Número de plantas com padrão de metilação alterado e nível de significância pelo teste de x2, em três ciclos de cultivo em plantas de macieira obtidas por propagação convencional e micropropagação, digeridas com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II

Ciclo de cultivo	Modo de propagação	Plantas avaliadas	Bandas matriz	Bandas avaliadas	Variação do número bandas	Plantas mutantes	x^2
1	Convencional	32	22	22	sem variação	sem variação	<0.0001
	Micropropagação*	32	22	58	6-24	23	
2	Convencional	30	22	22	sem variação	sem variação	<0.0001
	Micropropagação*	36	22	41	2-34	25	
3	Convencional	27	22	33	3-21	26	0.0338
	Micropropagação*	35	22	82	2-33	35	

*significativo pelo teste x2 ao nível de significância de 5% de probabilidade de erro.

Analisou-se a variação quanto ao número de bandas polimórficas e não polimórficas entre as modalidades de propagação, dentro dos ciclos de cultivo. A variação mostrou-se estatisticamente diferente no primeiro e segundo ciclos (P<0.0001), mantendo a diferença no terceiro ciclo de cultivo, com maior probabilidade de erro (P=0.0207) (Figura 6).

As diferenças estatisticas detectadas no primeiro e segundo ciclos de cultivo são reflexos do alto percentual de bandas polimórficas detectados nas plantas obtidas via micropropagação, onde 72,4% das bandas do primeiro ciclo (42 de um total de 58 analisadas), e 85,3% das bandas do segundo ciclo (35 de 41 analisadas) eram polimórficas.

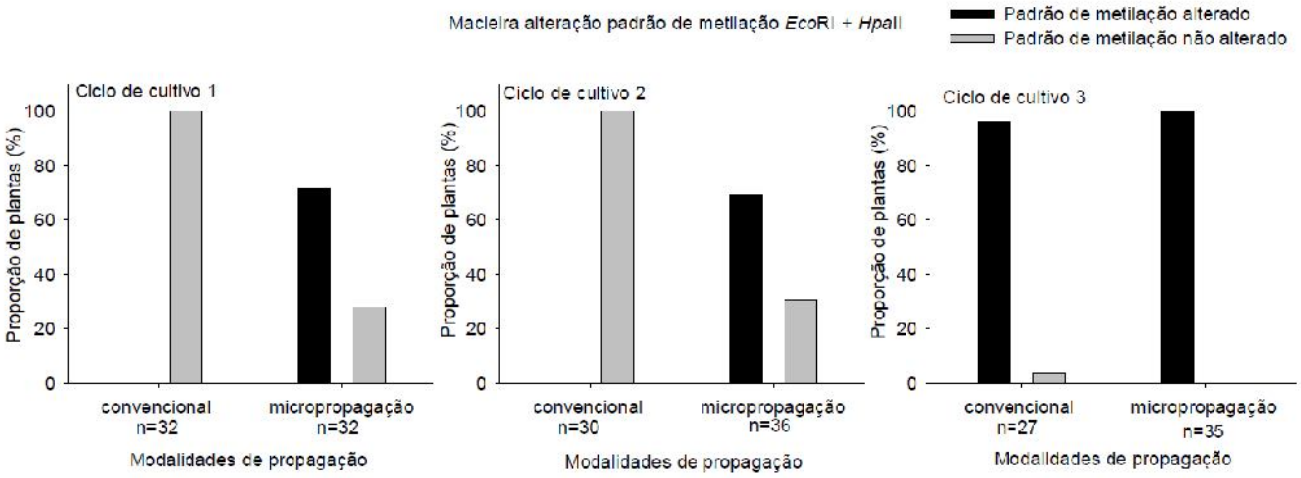

Figura 5 – Número total de plantas de macieira avaliadas (n) e percentual (%) de plantas com variação e sem variação no padrão de metilação, com relação à planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II.

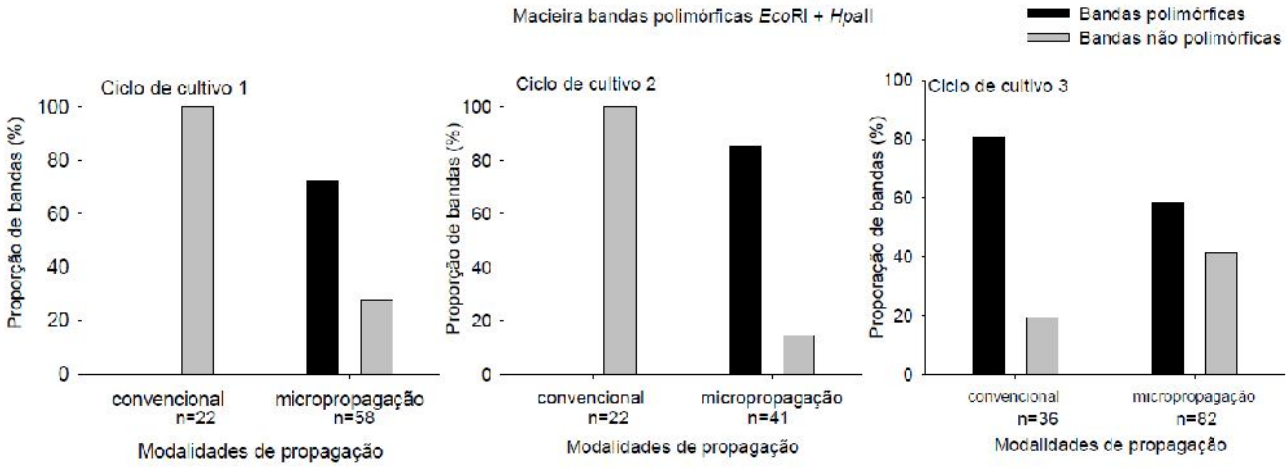

Figura 6 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos polimórficos (que diferiram da planta matriz) e não polimórficos (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II..

Na propagação vegetativa convencional nenhuma banda polimórfica foi detectada dentro dos referidos ciclos. Entretanto, no terceiro ciclo de cultivo a diferença estatística (P=0.0207) no percentual de bandas polimórficas ficou por conta da propagação vegetativa convencional, quando 80,5% eram polimórficas, representada por 29 bandas polimórficas dentro de um grupo de 36, enquanto na micropropagação, detectaram-se polimorfismos em 58,5% das bandas analisadas (48 bandas polimórficas em 82 analisadas).

No terceiro ciclo, o percentual de bandas polimórficas nas plantas micropropagadas diminuiu em relação ao primeiro e segundo ciclos. Uma hipótese para justificar esta diminuição seria a ocorrência de demetilação de fragmentos de DNA, que embora pouco discutida nos trabalhos científicos, também interfere na alteração do padrão de metilação.

Procedeu-se a análise do número de fragmentos polimórficos e não polimórficos entre as modalidades de propagação, dentro dos ciclos de cultivo, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II, onde foram detectadas diferenças estatísticas no primeiro e no segundo ciclo de cultivo (P<0.0001) (Figura 7).

As diferenças estatísticas ocorreram em função do maior número de fragmentos polimórficos detectados na micropropagação, quando 52,0 % dos fragmentos (401 de um total de 771 analisados) no primeiro ciclo de cultivo e 54,1 % dos fragmentos (425 de 785 analisados) do segundo ciclo mostravam-se polimórficos.

No primeiro e segundo ciclos de propagação vegetativa convencional nenhum fragmento polimórfico foi detectado.

As modificações no padrão de metilação podem ter sido provocadas por eventos de demetilação de DNA e a análise da demetilação revelou diferenças significativas (P<0.0001) nos três ciclos de cultivo, quando a digestão das amostras foi feita com a combinação de enzimas de restrição *Eco*RI+*Hpa*II (Figura 8).

A diferença estatística detectada foi ocasionada pela não ocorrência de eventos de demetilação no primeiro e segundo ciclos de propagação convencional, enquanto na micropropagação, ocorreu a demetilação em 52,5% e 45,4% dos fragmentos, respectivamente, no primeiro e segundo ciclos ciclos de cultivo. Já no terceiro ciclo ocorreu acentuada taxa de demetilação (61,4%), representada por 365 fragmentos de um total de 594. No entanto, o número total de fragmentos era superior na micropropagação (774) que apresentou taxa de demetilação de 50,2%, mantendo a diferença estatística nos três ciclos de cultivo (Figura 8).

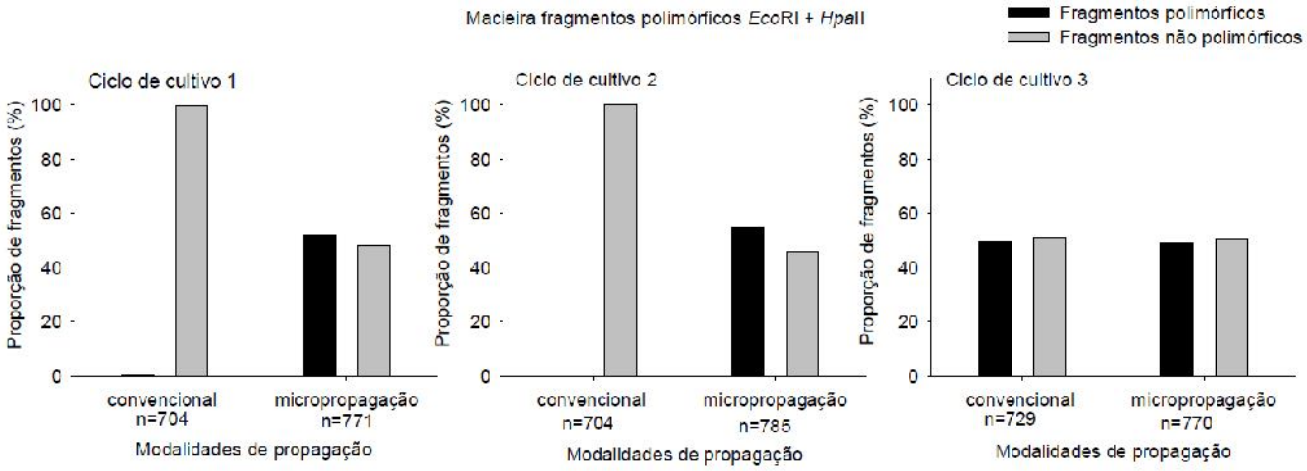

Figura 7 – Número total de bandas analisadas (n) e percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II..

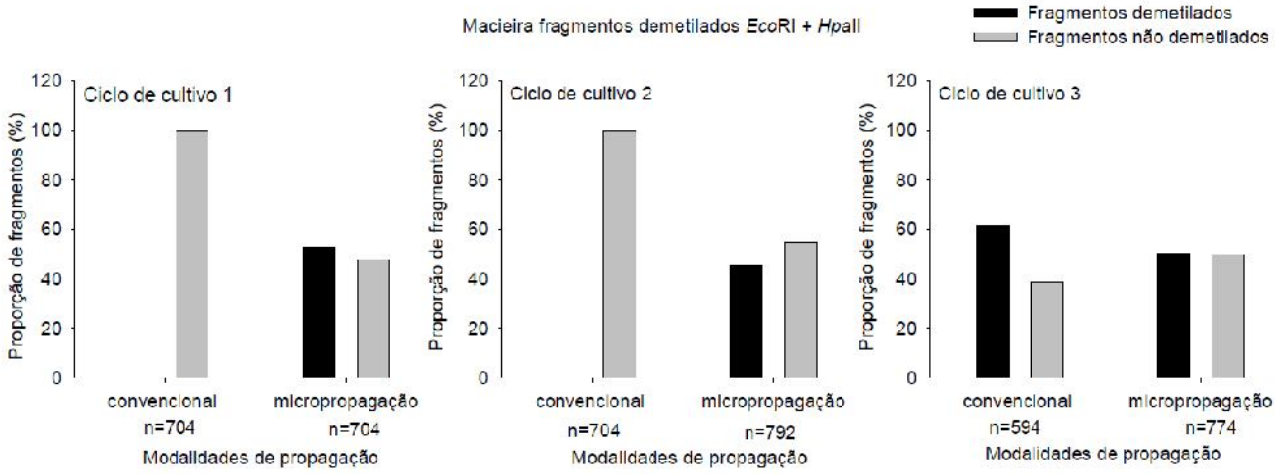

Figura 8 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos demetilados (que diferiram da planta matriz) e não demetilados (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II.

A diferença estatística detectada foi ocasionada pela não ocorrência de eventos de demetilação no primeiro e segundo ciclos de propagação convencional, enquanto na micropropagação, ocorreu a demetilação em 52,5% e 45,4% dos fragmentos, respectivamente, no primeiro e segundo ciclos ciclos de cultivo. Já no terceiro ciclo ocorreu acentuada taxa de demetilação (61,4%), representada por 365 fragmentos de um total de 594.

No entanto, o número total de fragmentos era superior na micropropagação (774) que apresentou taxa de demetilação de 50,2%, mantendo a diferença estatística nos três ciclos de cultivo (Figura 8).

Quando se procedeu a digestão do DNA das plantas obtidas via propagação vegetativa convencional com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I, observou-se que uma das 32 plantas apresentou variação em uma banda no primeiro ciclo, representando 3,1% das plantas analisadas.

No segundo ciclo de cultivo a variação foi encontrada em 6 plantas, representando 20% das plantas analisadas, com o uso de 39 bandas na análise, variando de 2 a 17 o número de bandas analisadas por planta. Para o terceiro ciclo, esta variação foi detectada em 16 (59,2%) plantas. Tal variação ocorreu em um ou mais bandas das 62 consideradas, sendo que foram analisadas de 4 a 36 bandas por planta (Tabela 11).

Com relação à digestão do DNA das plantas obtidas via micropropagação com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I, detectou-se variação em 30 plantas, o que representa 93,75% das plantas submetidas a análise, tendo feito a análise em 39 bandas, com variação de 1 - 17 no número de bandas analisadas por planta. No segundo ciclo de cultivo a variação foi encontrada em 30 plantas (83,3%), com 53 bandas analisadas e de 1 - 24 bandas analisadas por planta, aumentando para 32 plantas (91,4%) com variação, em 62 bandas analisadas e de 4 - 28 bandas analisadas por planta no terceiro ciclo (Tabela 11).

Tabela 11 - Número de plantas com padrão de metilação alterado e nível de significância pelo teste de x2, em três ciclos de cultivo em plantas de macieira obtidas por propagação convencional e micropropagação, digeridas com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I

Ciclo de cultivo	Modo de propagação	Plantas avaliadas	Bandas matriz	Bandas avaliadas	Variação do número bandas	Plantas mutantes	x^2
1	Convencional	32	22	22	1	1	0.9653
	Micropropagação	32	22	39	1-17	1	
2	Convencional	30	22	39	2-17	6	<0.0001
	Micropropagação*	36	13	53	1-24	30	
3	Convencional	27	22	62	4-36	16	0.0027
	Micropropagação*	35	14	62	4-28	32	

*significativo pelo teste x2 ao nível de significância de 5% de probabilidade de erro.

Os dados encontrados referentes ao número de plantas com padrão de metilação alterado, entre a propagação convencional e a micropropagação, mostrou-se estatisticamente diferentes no segundo ciclo ($P<0.0001$) e terceiro ciclo ($P=0.0027$; Figura 9).

No primeiro ciclo de propagação apenas uma planta em cada modalidade apresentou alteração no padrão de metilação, representando 3,1% de 32 analisadas. No segundo ciclo, 83,3% (30 plantas de 36 analisadas) das plantas obtidas por micropropagação apresentaram modificações no padrão de metilação, comparadas a 20% (6 plantas com variação, de 30 analisadas) detectadas na propagação convencional.

No terceiro ciclo a variação no padrão de metilação aumentou ainda mais, tendo 91,4% (32 plantas com modificações, de 35 analisadas) de plantas micropropagadas com variação no padrão de metilação, enquanto na propagação vegetativa convencional esta variação estava em 58,2% (16 plantas de 27 analisadas) (Figura 9).

A análise comparativa entre bandas polimórficas detectados nas plantas obtidas via propagação vegetativa tradicional e micropropagação mostrou que os dados obtidos são estatisticamente diferentes somente no primeiro ciclo de cultivo ($P<0.0001$; Figura 10).

A diferença estatística nos valores estimados na análise do percentual de bandas polimórficas está em função do alto percentual detectado no primeiro ciclo da micropropagação (74,3%), representado por 29 das 39 bandas analisadas, enquanto na propagação vegetativa tradicional, apenas 4,5% das bandas eram polimórficas, sendo este percentual referente a uma banda polimórficas detectada, e um total de 22 analisadas.

Quando da realização da análise comparativa quanto a presença de fragmentos polimórficos entre as modalidades de propagação, diferenças estatísticas foram detectadas no primeiro e segundo ciclos de cultivo ($P<0.0001$; Figura 11).

Os valores detectados na micropropagação foram maiores nos dois ciclos de cultivo. No primeiro, 545 (50%) de 1090 fragmentos analisados eram polimórficos, contra apenas 1 fragmento (0,2%) de 640 que era polimórfico na propagação vegetativa convencional. Já no segundo ciclo de cultivo, a diferença percentual ficou mais próxima, mas, ainda significativa, tendo a micropropagação apresentado 63,7% de fragmentos polimórficos (425 de 667 analisados) e a propagação convencional, 306 de 630 fragmentos detectados, representando 48,6%.

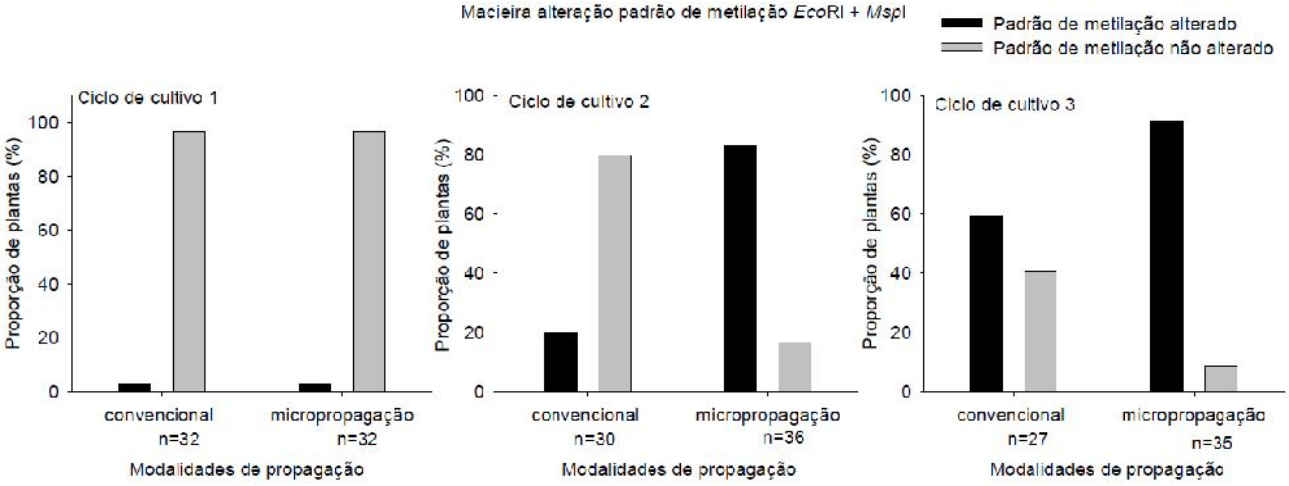

Figura 9 – Número total de plantas de macieira avaliadas (n) e percentual (%) de plantas com variação e sem variação no padrão de metilação, com relação à planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I.

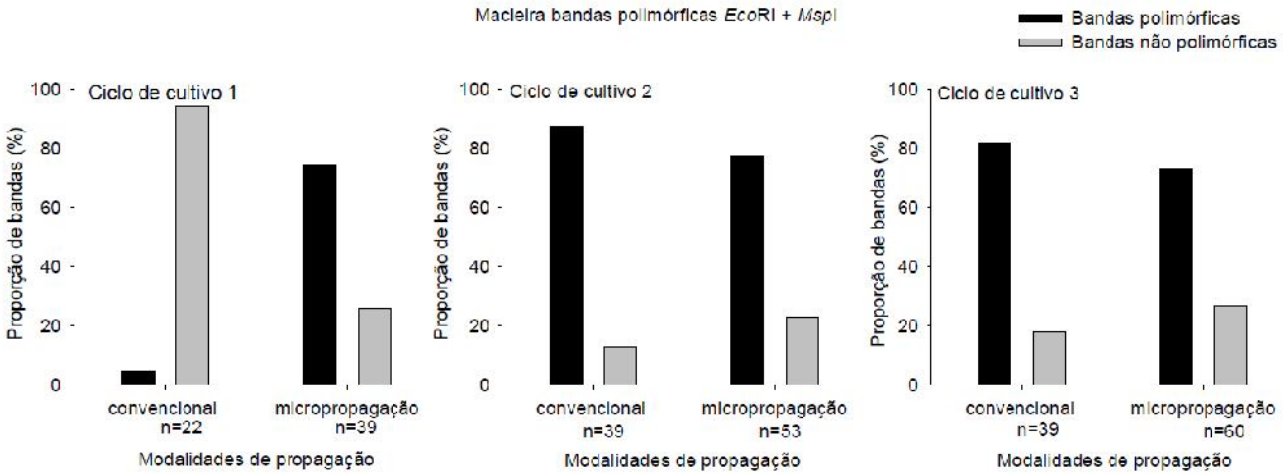

Figura 10 – Número total de bandas analisadas (n) e percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I.

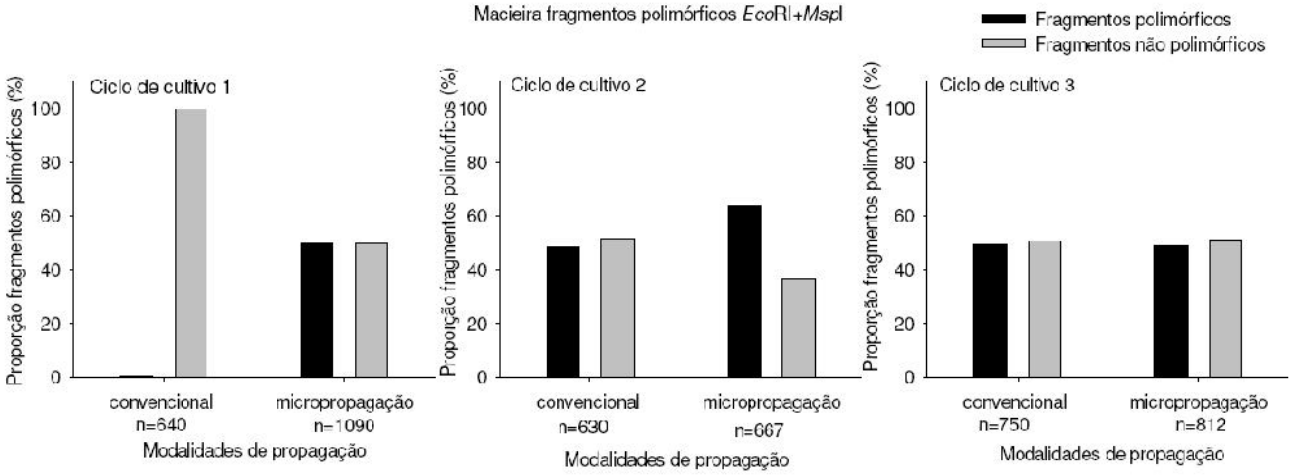

Figura 11 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos polimórficos (que diferiram da planta matriz) e não polimórficos (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I.

Xu et al. (2000) testaram o método MSAP (REYNA-LOPES et al., 1997) com o objetivo de avaliar sua eficiência na detecção de metilação em plantas de macieira da cultivar Gala cultivadas a campo e micropropagadas e detectaram quatro vezes mais a presença de fragmentos gerados pela digestão com *Eco*RI+*Msp*I em relação aos fragmentos gerados pela combinação *Eco*RI+*Hpa*II, sem no entanto, especificar qual modalidade apresentou mais variação.

Em outro trabalho, Schellenbaum et al. (2008), utilizaram sete e cinco clones de videira Chardonnay 96 e Syrah 174, respectivamente, visando estimar o grau de metilação. Esta análise gerou 120 fragmentos diferencialmente amplificados e o número de marcadores polimórficos foi de 3 e 18, correspondendo a 0,6 e 3,6% da variação, respectivamente, para as duas cultivares analisadas.

Os fragmentos foram gerados após reconhecimento diferencial dos dois isoesquizomeros (*Hpa*II e *Msp*I), produzindo diferentes padrões em 12 clones. Dos fragmentos gerados, 82% foram produzidos pela clivagem com *Eco*RI+*Msp*I, 3% pela clivagem com *Eco*RI+*Hpa*II e 15% pela clivagem dos dois isoesquizomeros, este último evento, indicando a demetilação de ambas as citosinas no DNA dos clones, com relação aos clones mãe, de onde se conclui que a combinação *Eco*RI+*Msp*I foi responsável pela maior parte da variação detectada.

Peraza-Echeverria et al. (2001) estudando a metilação do DNA em bananeira, comparou plantas obtidas por propagação convencional e micropropagação, detectou que a metilação foi responsável por 18,4 % dos fragmentos gerados nas plantas propagadas convencionalmente e por 23 % nas plantas micropropagadas.

Baurens et al. (2003), analisando bananeiras micropropagadas detectaram metilação resultante da digestão com *Eco*RI+*Msp*I (citosina interna) variando de 17 a 20% e com *Eco*RI+*Hpa*II (citosina externa) em torno de 4,5 %. Os dados obtidos no presente trabalho mostram que a combinação de enzimas *Eco*RI+*Msp*I detectou 34% mais de bandas polimórficas e 8,5% mais de fragmentos polimórficos que a combinação *Eco*RI+*Hpa*II.

Algumas hipóteses podem justificar maior atividade de uma ou de outra combinação: i) propriedades de clivagem da enzima de restrição, que dependendo da origem pode ser alterada pela qualidade do DNA preparado, ii) estado fisiológico da amostra da qual o DNA foi extraído pode ser completamente diferente, levando a grandes diferenças nos níveis de metilação do DNA, conforme descrito em *Pinus radiata* por Fraga et al. (2002).

Outra hipótese seria de que análises feitas em diferentes espécies tenham acessado regiões genômicas diferentes, mostrando divergências quanto ao alcance de cada combinação de enzimas utilizada.

Na Figura 12 compara-se a presença de fragmentos demetilados entre as modalidades de propagação dentro dos ciclos de cultivo, referentes à digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I, tendo sido detectadas diferenças significativas ($P<0.0001$) no primeiro e segundo ciclos de cultivo.

Na propagação convencional apenas um evento de demetilação ocorreu, representando 0,2% de um total de 639 fragmentos detectados, sendo detectados a demetilação de 454 fragmentos na micropropagação, numa taxa de 77,4%. No segundo ciclo a taxa de demetilação se elevou na propagação convencional (50,7%) enquanto caiu na micropropagação (31%), mantendo a significância, agora em favor da propagação convencional.

Li et al. (2002) detectaram diferenças no padrão de metilação de macieira cultivar Gala, comparando a planta matriz com plantas micropropagadas durante três anos e repicadas a cada 3 a 4 semanas. Com relação a fragmentos gerados pela combinação de enzimas *Eco*RI/*Msp*I, a qual refere-se a metilação da citosina interna da seqüência CCGG, a planta matriz apresentou 22 fragmentos desta natureza enquanto as plantas micropropagadas apresentaram somente 4 fragmentos, o que representaria a demetilação do DNA naqueles bandas.

Com referência a eficiência das combinações de enzimas utilizadas na análise de metilação de DNA, a combinação *Eco*RI+*Msp*I apresentou maior poder de detecção, indicando que o evento mais comum é a metilação plena da citosina interna da seqüência CCGG, pois em todos os critérios analisados, somente na detecção de demetilação a combinação *Eco*RI+*Hpa*II foi mais eficiente.

Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser atribuídos, em parte, à sensibilidade do equipamento utilizado na eletroforese, pois, como exemplo, na análise de mutação das plantas de macieira micropropagadas foi revelado e analisado um total de 193 bandas (três ciclos de cultivo) (Tabelas 9), o que mostra que a análise tornou-se mais informativa, uma vez que maior proporção do genoma foi amostrado.

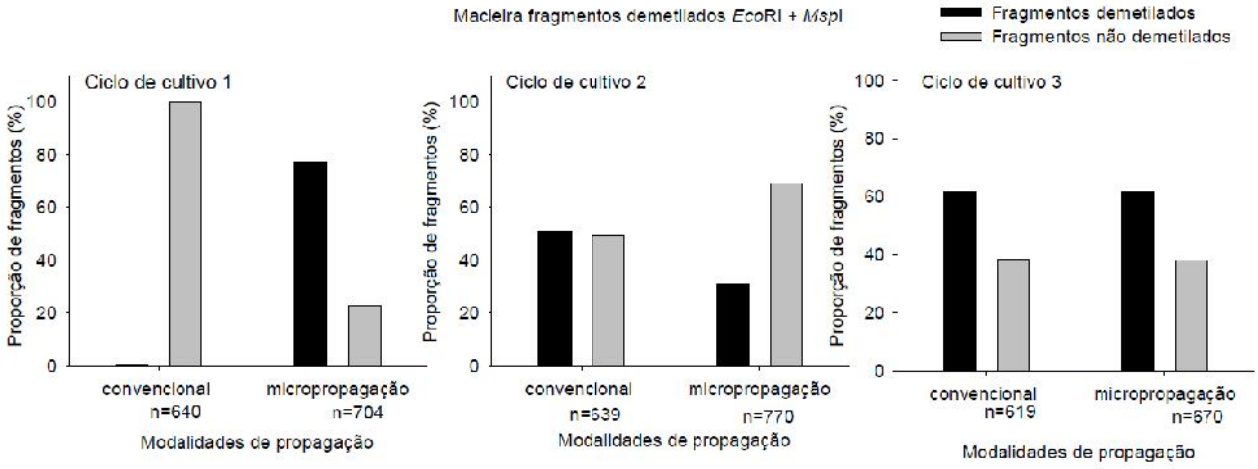

Figura 12 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos demetilados (que diferiram da planta matriz) e não demetilados (que não diferiram da planta matriz) em plantas de macieira, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I.

6.3. Mutação em plantas de morangueiro obtidas via propagação vegetativa convencional e micropropagação

Na análise das plantas de morangueiro obtidas via propagação vegetativa convencional, não foram observadas mutações no primeiro ciclo de cultivo. É relevante ressaltar que neste ensaio foram analisadas 10 bandas na planta matriz e 10 bandas entre o grupo de plantas do referido ciclo.

Entretanto, no terceiro ciclo de cultivo, 9 plantas apresentaram diferenças genéticas, tendo sido analisado somente 10 bandas na planta matriz e 27 bandas dentro do grupo de, variando de 1 a 8 o número de bandas analisadas por planta. O segundo ciclo desta modalidade não foi avaliado, devido a problemas técnicos (Tabela 12).

Na micropropagação, 9 de 32 plantas do primeiro ciclo de cultivo mostraram variação, analisando de 1 a 9 bandas, dependendo da planta, de 16 bandas analisadas no total. As plantas variantes representam 28,1% do total de plantas submetidas à análise.

No segundo ciclo a variação ocorreu em 10 plantas (31,2%) em relação a planta matriz, variações estas detectadas em 1 a 2 bandas de um total de 8 bandas utilizadas na análise. No terceiro ciclo de cultivo variações foram constatadas em 9 amostras, variando de 2 – 16 o numero de bandas analisadas entre as plantas de um total de 38 bandas detectadas. A proporção de mutantes representa 50%, de um total de 32 plantas analisadas (Tabela 12).

Tabela 12 – Número de plantas mutantes e nível de significância pelo teste de x2, em três ciclos de cultivo em plantas de morangueiro obtidas por propagação convencional e micropropagação.

Ciclo de cultivo	Modo de propagação	Plantas avaliadas	Bandas matriz	Bandas avaliadas	Variação do número bandas	Plantas mutantes	x^2
1	Convencional	32	10	10	0	0	0.0012
	Micropropagação*	32	5	10	1-9	9	
2	Convencional	32	-	-	-	-	-
	Micropropagação	32	5	8	1-2	10	
3	Convencional	32	10	10	1-8	9	0.0729
	Micropropagação	32	9	38	2-16	16	

*significativo pelo teste x2 ao nível de significância de 5% de probabilidade de erro; - não avaliado.

A análise das diferenças observadas revelou significância estatística (P=0.0012) entre as modalidades de propagação no primeiro ciclo de

cultivo, quando 9 plantas de um total de 32 analisadas sofreram mutação durante o processo de multiplicação via micropropagação e nenhuma planta sofreu mutação quando propagada de modo convencional.

No segundo ciclo de cultivo, devido a falta de dados referentes à propagação convencional, não foi possível proceder a análise estatística. No terceiro ciclo não se detectou diferença estatística entre as modalidades de propagação, tendo a micropropagação revelado 16 plantas mutantes de 32 analisadas, enquanto na propagação convencional, 9 plantas de 32 analisadas eram mutantes (Figura 13).

A Figura 13 demonstra um aumento da taxa de mutação provocada pela micropropagação, conforme se avançou nos ciclos de cultivo, apresentando 28,1%, 31,2% e 50%, no primeiro, segundo e terceiro ciclos, respectivamente, mostrando que o número de subcultivos é um dos fatores que contribui para a ocorrência de mutações em plantas.

Na propagação convencional, nenhuma mutação foi detectada no primeiro ciclo de cultivo. No segundo ciclo não houve avaliação. No terceiro ciclo a ocorrência de mutação atingiu 28,1% das plantas analisadas, que mesmo não sendo estatisticamente diferente da micropropagação, demonstra o potencial que a propagação vegetativa convencional tem para provocar mutações.

Este resultado está de acordo com as constatações feitas por Arruda et al. (2006) quando estudou variação genômica intraclonal de explantes de morangueiro em ambiente controlado e detectou distâncias genéticas entre clones após uma única repicagem.

Os resultados demonstram a maior propensão à ocorrência de mutações quando as plantas são submetidas a micropropagação do que quando propagadas de maneira convencional, possivelmente devido a condição de maior estresse a que são expostas na primeira modalidade. Minano et al. (2009) analisaram plantas de *Chrysanthemum* micropropagadas e detectaram que 2,86% das plantas apresentavam variação no sétimo subcultivo.

Na análise das bandas polimórficas, as diferenças detectadas nos dados obtidos entre as modalidades de propagação são estatisticamente significativas devido a maior variação ocorrida na micropropagação.

No primeiro ciclo (P=0.0002) 12 bandas (de um total de 16) mostraram polimorfismos, enquanto na propagação convencional nenhuma banda estava nesta condição e no terceiro ciclo de cultivo (P=0.0219), 25 bandas (de um total de 38) mostraram polimorfismos, enquanto somente 10 (de um total de 27) da propagação convencional mostravam-se polimórficas (Figura 14).

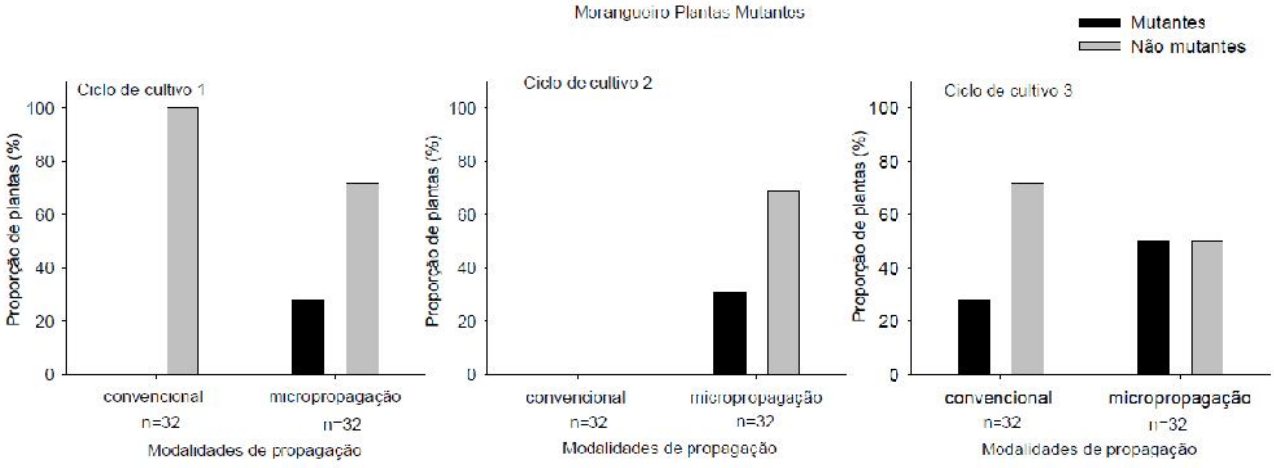

Figura 13 – Número total de plantas avaliadas (n) e percentuais (%) de plantas mutantes e não mutantes em morangueiro, com relação a planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores AFLP.

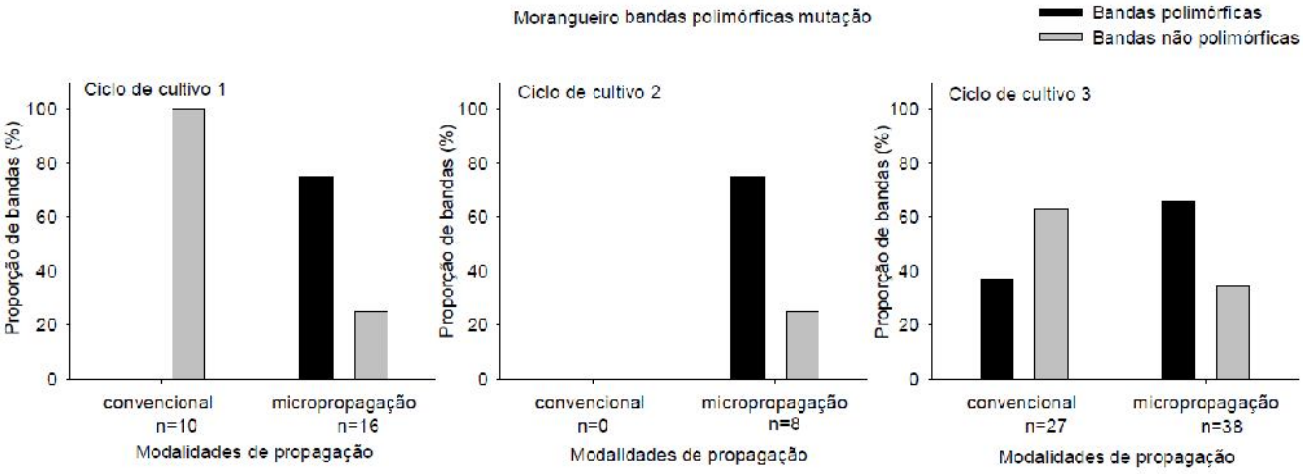

Figura 14 – Número total de bandas analisadas (n), percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de mutação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação a partir de fragmentos gerados por AFLP.

A micropropagação mostrou maior variação quanto à presença de bandas polimórficas que a propagação vegetativa convencional nos três ciclos de cultivo. No primeiro ciclo, 75% de bandas polimórficas foram detectadas (12 de 16 analisadas), enquanto a propagação convencional não revelou mudança deste gênero.

No segundo ciclo, mesmo não tendo a análise das plantas obtidas via propagação convencional, a micropropagação manteve o nível de variação, com 75% das bandas sendo polimórficas. Já no terceiro ciclo, a propagação convencional mostrou ocorrência de variações, revelando 37% de bandas polimórficas, representando 10 bandas de um total de 27 analisadas.

Mesmo assim, esta variação ainda foi significativamente inferior à detectada na micropropagação, a qual alcançou 65,7% (25) das bandas totais analisadas (38).

Na análise de fragmentos polimórficos dentro dos ciclos de cultivo e entre as modalidades de propagação, detectou-se diferenças estatisticas nos valores obtidos no primeiro ciclo ($P<0,0001$; Figura 15).

Diferenças estatísticas foram encontradas no número de fragmentos polimórficos no primeiro ciclo e isto se deve a detecção de 19,6% de fragmentos polimórficos nas plantas advindas da micropropagação, percentual este representado por 22 fragmentos, de um total de 112 avaliados.

No segundo ciclo, mesmo sem a análise das plantas de propagação convencional, a micropropagação mostrou aumento no número de fragmentos polimórficos, sendo este valor, de 40,4 %, referente a 55 fragmentos de um total de 136 analisados. Já no terceiro ciclo, 59 fragmentos (de um total de 158) mostraram polimorfismos com relação a planta matriz, equivalendo a 37,3%. Na propagação vegetativa convencional, de 107 fragmentos analisados, 33 eram polimórficos (30,8%).

Outras espécies têm mostrado a ocorrência de mutações. Polanco & Ruiz (2002) analisaram cinco grupos de plantas de *Arabdopsis thaliana* regeneradas via organogênese, originadas de cinco calos distintos e observaram que 7,97% dos fragmentos detectados não estavam presentes em todas as plantas de um ou mais grupos, indicando a variabilidade entre grupos. Ainda, 11,31% dos fragmentos detectados mostraram variabilidade entre plantas do mesmo grupo.

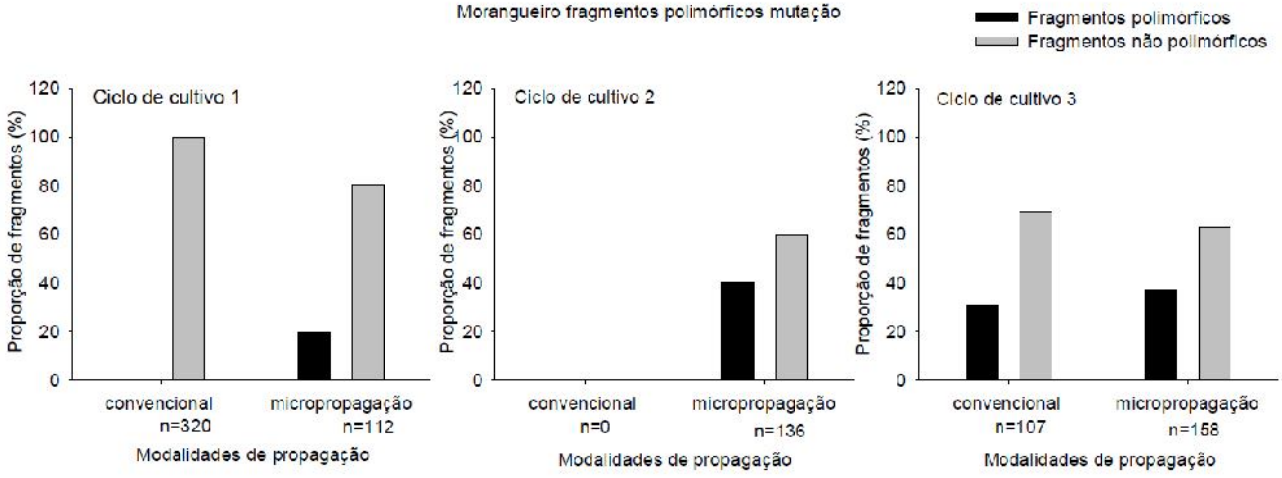

Figura 15 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos polimórficos (que diferiram da planta matriz) e não polimórficos (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de mutação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por AFLP.

6.4. Padrão de metilação de morangueiro obtido via propagação vegetativa convencional e micropropagação

Devido a problemas técnicos os dados do segundo ciclo de propagação vegetativa convencional não serão considerados nesta análise.

Na estimativa da variação no padrão de metilação do DNA do material obtido por propagação convencional e digerido com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II, foram verificadas diferenças no primeiro ciclo de cultivo em 6 plantas (18,7%), variando de 2 a 8 bandas analisadas entre plantas, das 15 bandas analisados. No terceiro ciclo, detectaram-se 8 plantas (25%) divergentes em resposta a 21 bandas analisadas, cujo número de bandas analisadas variou de 2 a 11 entre o grupo de plantas.

Nas plantas obtidas por micropropagação foi verificado aumento na variação na medida em que novos ciclos de propagação eram realizados. Assim sendo, no primeiro ciclo, 7 plantas (21,8%) apresentaram variação, resultante da análise de 2 a 9 bandas por planta e um total de 12 bandas analisadas.

No segundo ciclo detectaram-se 9 plantas (28,1%) variantes, com 3 a 8 bandas analisadas por planta e 15 bandas analisadas no total. Por fim, no terceiro ciclo, detectaram-se 15 plantas (46,8%) variantes, com 2 a 25 bandas analisadas por planta e um total de 51 bandas analisadas (Tabela 13).

Os dados obtidos na análise de metilação com a combinação de enzimas *Eco*RI+*Hpa*II, visando identificar a existência de plantas alteradas com relação a planta matriz, estão apresentados na Figura 16.

Tabela 13 - Estimativa da variação no padrão de metilação de DNA em plantas de morangueiro obtidas via propagação vegetativa convencional e micropropagação e digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI+*Hpa*II.

Ciclo de cultivo	Modo de propagação	Plantas avaliadas	Bandas matriz	Bandas avaliadas	Variação do número bandas	Plantas alteradas	x^2
1	Convencional	32	8	15	2-8	6	0.7560
	Micropropagação	32	10	12	2-9	7	
2	Convencional	32	-	-	-	-	-
	Micropropagação	32	10	15	3-8	9	
3	Convencional	32	8	21	2-11	8	0.0682
	Micropropagação	32	10	51	2-25	15	

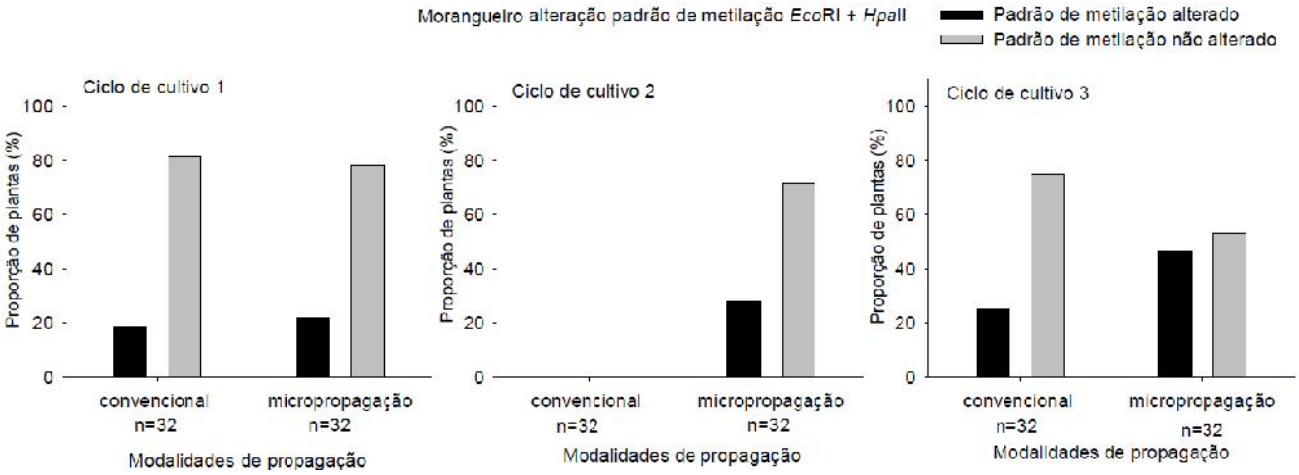

Figura 16 – Número total de plantas avaliadas (n) e percentual (%) de plantas de morangueiro com alterações e sem alterações no padrão de metilação, com relação a planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores MSAP e digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II.

No segundo ciclo a comparação não foi possível devido a falta de dados da propagação convencional.

A análise de bandas polimórficas (Figura 17) nas amostras digeridas com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II mostrou diferenças estatísticas (P=0.0052) entre os valores obtidos entre as modalidades de propagação no terceiro ciclo de cultivo.

A diferença detectada no terceiro ciclo refere-se a uma taxa de 71,4% referente a 15 bandas apresentando polimorfismo, de um total de 21 analisadas na propagação vegetativa convencional, sendo que na micropropagação, 18 bandas mostraram polimorfismo, perfazendo 35,3% de 51 analisadas.

A comparação entre o número de fragmentos polimórficos (Figura 18) detectados através da análise de metilação com as enzimas *Eco*-RI+ *Hpa*II, entre as modalidades de propagação revelou diferença estatisticas no terceiro ciclo de cultivo (P=0.0158).

Na Figura 18 pode-se visualizar que os percentuais de variação aumentaram com o aumento no numero de ciclos de propagação, sendo que a micropropagação apresentou valores superiores nos três ciclos, embora diferença estatística tenha sido detectada somente no terceiro ciclo.

Por outro lado, executou-se análise quanto à ocorrência de fragmentos demetilados quando amostras foram digeridas com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II. Os dados obtidos (Figura 19) revelaram diferenças estatísticas no primeiro (P<0.0001) e segundo (P<0.0001) ciclos de cultivo.

A Figura 19 ilustra a diferença ocorrida no primeiro ciclo, em favor da propagação vegetativa convencional, tendo 5,8% (15 de um total de 256) de fragmentos demetilados, contra apenas 3,7% (12 de um total de 320) na micropropagação.

No terceiro ciclo inverteram-se os dados, tendo a propagação convencional apresentado um percentual de apenas 4,8%, referente a demetilação de 12 fragmentos, de um total de 246 e a micropropagação com uma taxa de demetilação de 52,2 %, referente a 167 fragmentos, de um total de 320.

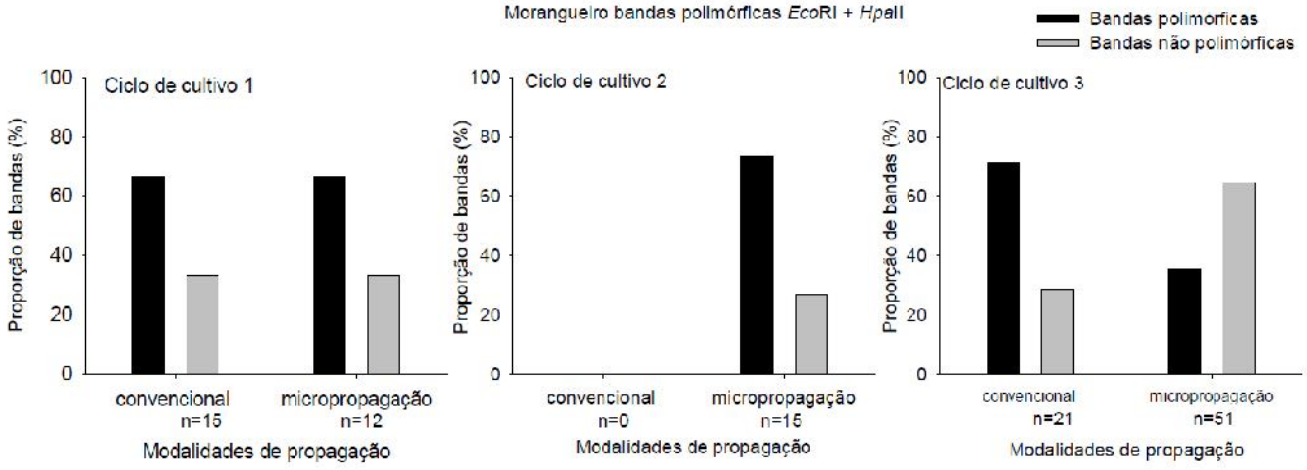

Figura 17 – Número total de bandas analisadas (n) e percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II.

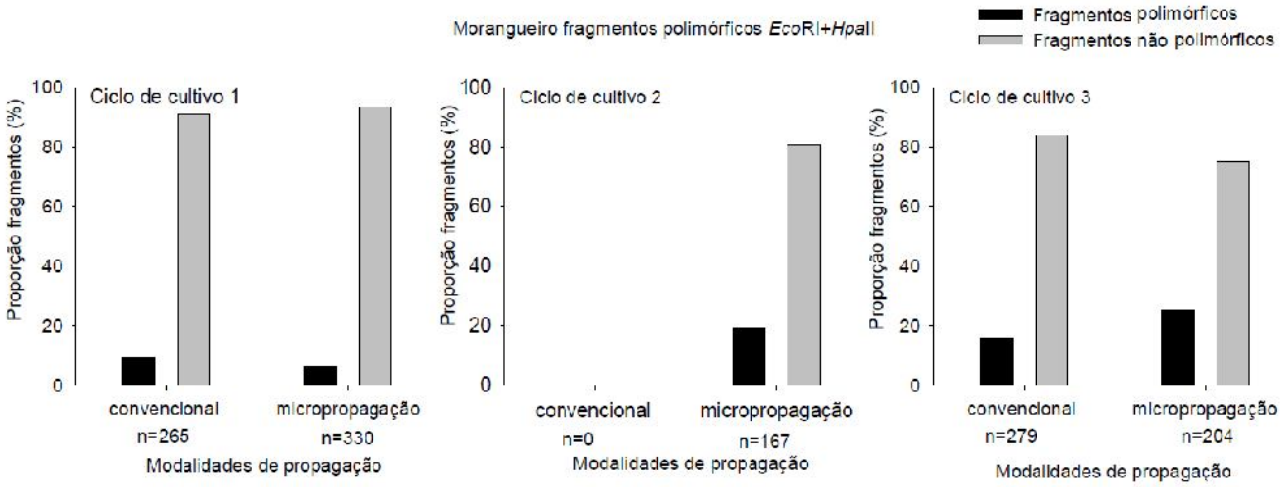

Figura 18 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos polimórficos (que diferiram da planta matriz) e não polimórficos (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+ *Hpa*II.

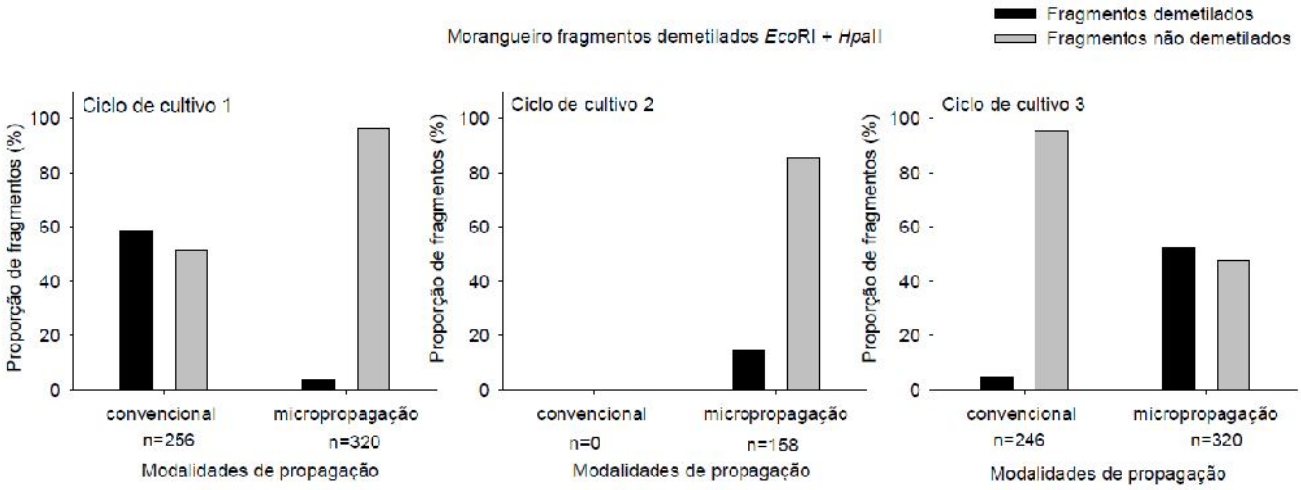

Figura 19 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos demetilados (que diferiram da planta matriz) e não demetilados (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Hpa*II.

Na digestão do DNA das plantas obtidas pela propagação vegetativa convencional com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I, foi detectada variação no primeiro ciclo, sendo que 7 das plantas (21,8%) analisadas mostraram diferenças com relação a planta matriz, variação estimada através do número de bandas analisadas entre plantas, o qual variou de 2 a 9, tendo analisado um total de 12 bandas.

No terceiro ciclo, analisou-se 22 bandas, variando de 2 a 11 bandas detectadas entre plantas, com divergências em 8 (25%) das plantas comparativamente a planta matriz. Nas plantas micropropagadas o padrão de metilação mostrou variação crescente com o decorrer do processo de multiplicação.

Assim, no primeiro ciclo detectou-se 4 plantas variantes, representando 12,5% das plantas analisadas, variando de 3 a 12 bandas analisadas entre plantas das 12 bandas analisadas. No segundo ciclo detectou-se 9 plantas variáveis, representando 28,1% das plantas analisadas, de 1 a 9 bandas por planta num total de 11 bandas analisadas. No terceiro ciclo, foram analisadas 20 bandas com variação de 2 a 17 bandas analisadas por planta e detectando 16 plantas com variação, o que representa 50% das plantas analisadas.

Somente no terceiro ciclo de cultivo detectou-se diferença na variação entre as modalidades de propagação (P=0.0389) (Tabela 14).

A Figura 20 ilustra através de gráficos, os dados percentuais detectadas quanto a alteração no padrão de metilação em relação à planta matriz, mostrando diferenças estatisticas somente no terceiro ciclo de cultivo (P=0.0389).

Tabela 14 – Estimativa do padrão de metilação de DNA em plantas de morangueiro obtidas via propagação vegetativa convencional e micropropagação e digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI+*Msp*I.

Ciclo de cultivo	Modo de propagação	Plantas avaliadas	Bandas matriz	Bandas avaliadas	Variação do número bandas	Plantas alteradas	x^2
1	Convencional	32	8	12	2-9	7	0.3202
	Micropropagação	32	8	12	3-12	4	
2	Convencional	32	-	-	-	-	-
	Micropropagação	32	8	11	1-9	9	
3	Convencional	32	8	22	2-11	8	0.0389
	Micropropagação	32	8	20	2-17	16	

*significativo pelo teste x2 ao nível de significância de 5% de probabilidade de erro.

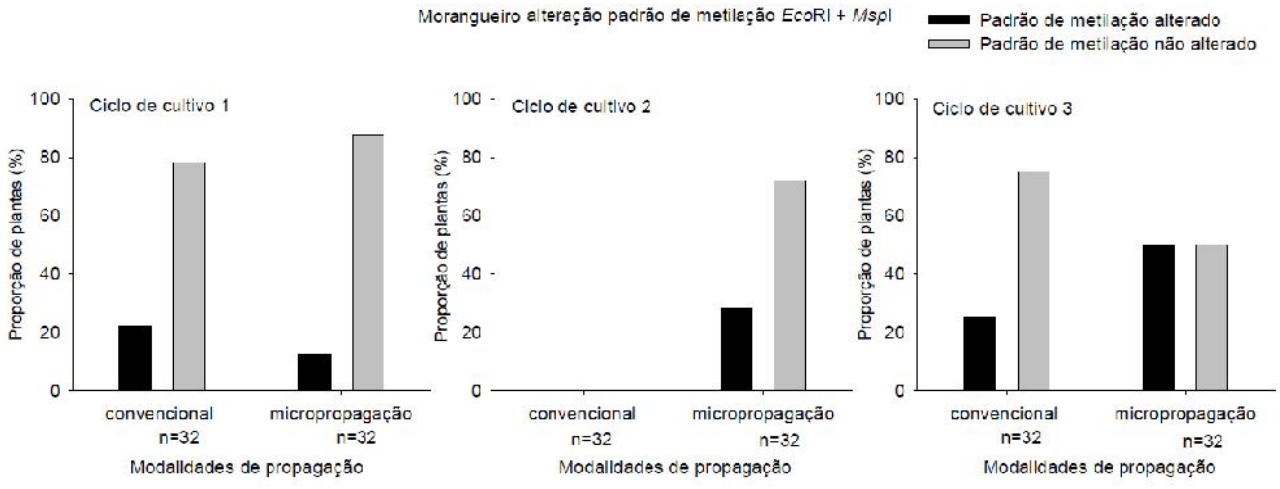

Figura 20 – Número total de plantas avaliadas (n) e percentual (%) de plantas de morangueiro com alterações e sem alterações no padrão de metilação, com relação a planta matriz, dentro dos ciclos de cultivo e entre modalidades de propagação, detectadas através da análise de fragmentos gerados por marcadores MSAP e digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I.

Da mesma forma, fez-se análise do número de bandas polimórficas detectadas quando se fez a digestão com a combinação de enzimas *Eco*RI+*Msp*I e diferenças estatísticas entre os valores obtidos entre as modalidades de propagação não foram detectadas, nem no primeiro nem no terceiro ciclo. A comparação entre os dados obtidos pode ser vista na Figura 21.

Na Figura 21 é possível fazer um comparativo do percentual de bandas polimórficas entre os ciclos de propagação e concluir que a variação já estava presente no primeiro ciclo e permaneceu durante os demais.

Muitas vezes a variação já é pré-existente nas células e tecidos dos explantes e a propagação apenas multiplica/amplia esta variação (GEORGE et al, 2008).

Na análise de metilação com a combinação de enzimas *Eco*RI+*Msp*I, o número de fragmentos polimórficos detectados (Figura 22) mostrou-se estatisticamente diferente na comparação dos dados obtidos no terceiro ciclo de cultivo ($P<0.0001$).

Nota-se um aumento no percentual de fragmentos polimórficos do primeiro para o terceiro ciclo na propagação convencional. Na micropropagação houve redução no percentual no segundo ciclo; possivelmente devido a ocorrência de demetilação de DNA; aumentando consideravelmente no terceiro, gerando diferença estatistica entre as modalidades de propagação neste ciclo (Figura 22).

Na análise de fragmentos demetilados com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I, diferenças estatisticas foram observadas no primeiro e terceiro ciclos de cultivo ($P<0.0001$; Figura 23).

Na Figura 23 é possível visualizar a acentuada diferença no percentual de ocorrência de demetilação, tendo a propagação vegetativa convencional mostrado um percentual extremamente baixo, de 3,7% e 4,%, respectivamente, para o primeiro e terceiro ciclos, quando a micropropagação mostrou percentuais elevados, de 67,6% e 64%, respectivamente, para o primeiro e terceiro ciclos de cultivo, caracterizando a detecção de diferença estatística.

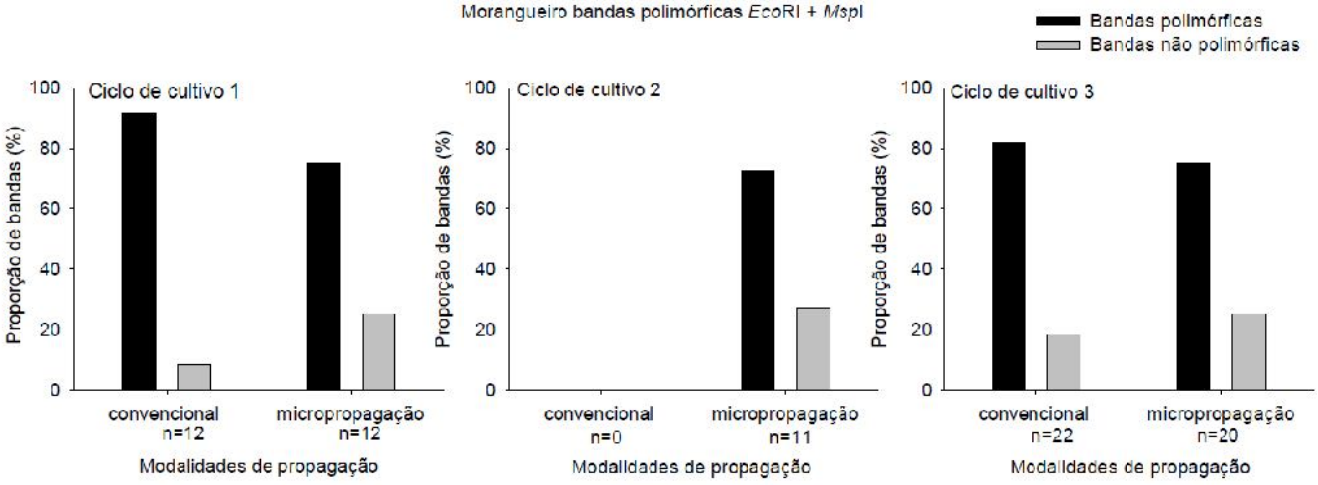

Figura 21 – Número total de bandas analisadas (n) e percentual (%) de bandas polimórficas (que diferiram da planta matriz) e não polimórficas (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I.

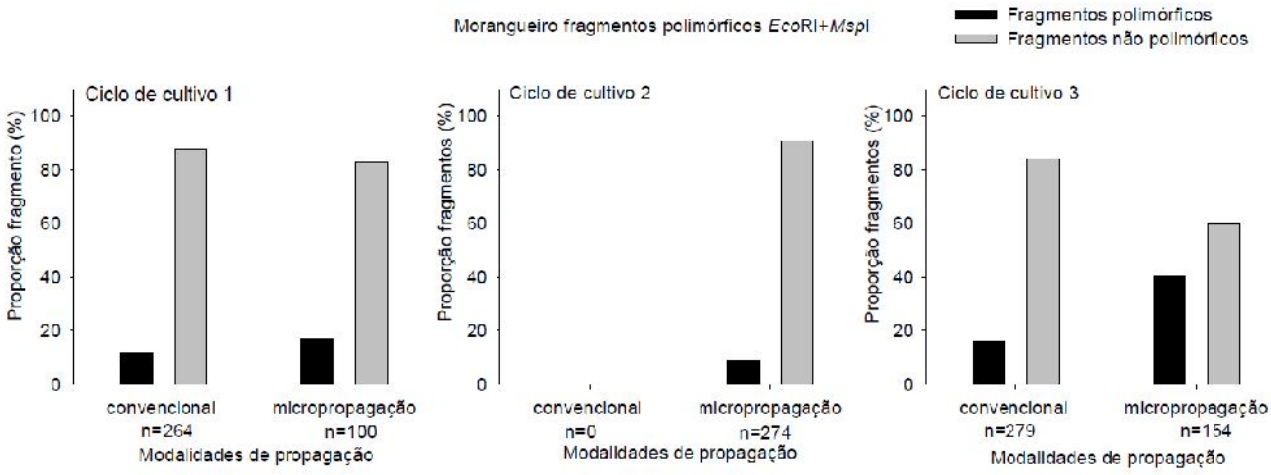

Figura 22 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos polimórficos (que diferiram da planta matriz) e não polimórficos (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I.

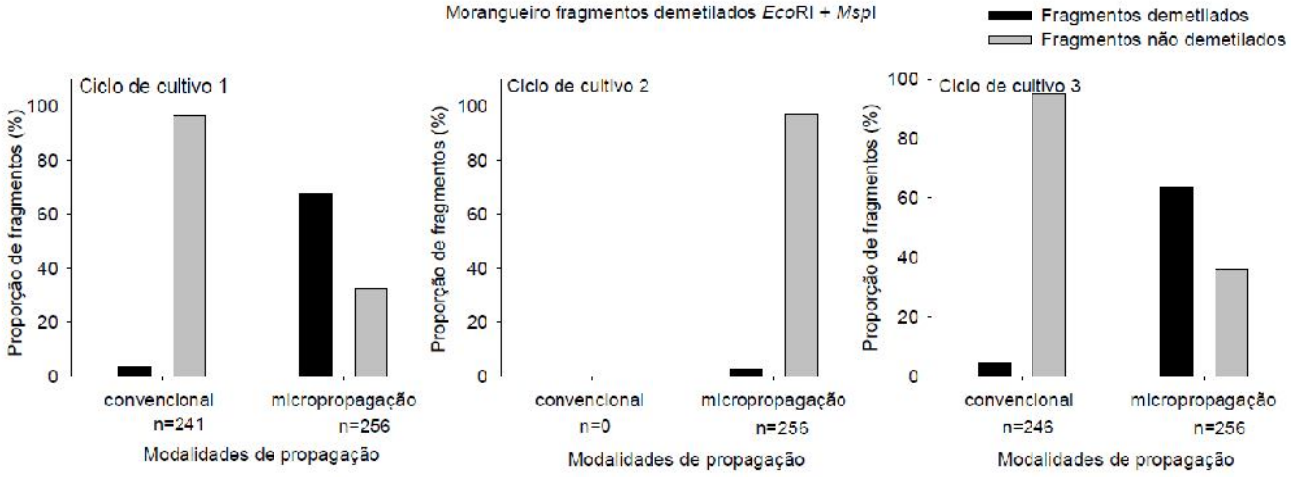

Figura 23 – Número total de fragmentos analisados (n) e percentual (%) de fragmentos demetilados (que diferiram da planta matriz) e não demetilados (que não diferiram da planta matriz) em plantas de morangueiro, na análise de metilação dentro dos ciclos de cultivo e modalidades de propagação com base nos fragmentos gerados por MSAP, a partir da digestão com as enzimas *Eco*RI+*Msp*I.

Peredo et al. (2009) analisaram plantas de Humulus lupulus micropropagadas durante 12 subcultivos, comparando com a planta doadora de explantes e detectaram 44% de bandas polimórficas. Desta variação, cerca de 29% era compartilhada pelas plantas micropropagadas, independente do subcultivo e 15% era referente a diferentes padrões apresentado em um ou diversos subcultivos.

Quando compararam somente as plantas obtidas por micropropagação, considerando o primeiro subcultivo como padrão, detectaram polimorfismo em 9% das bandas. A variação mais comum entre planta doadora de explantes e as micropropagadas foi a demetilação, representando 62,7% das mudanças e 43,3% entre as plantas micropropagadas.

Estes dados concordam com os dados obtidos no presente trabalho, sugerindo que micropropagação pode provocar mudanças genéticas nas plantas a ela submetidas. Os dados obtidos no presente trabalho estão de acordo com estes autores, e dão suporte para concluir que a micropropagação traz maior probabilidade de gerar variação no padrão de metilação do que a propagação convencional.

Bednarek et al. (2007) analisaram dois grupos de plantas regeneradas de cada um de cinco grupos de doadores de explantes em centeio. Um grupo foi obtido via androgênese e outro via embriogênese somática (embriões imaturos). A taxa média de variação foi de 6 %, da qual cerca de 1,7 % foi devido a mutação de nucleotídeos e o restante por mudanças no estado de metilação de DNA. As taxas de mutação e epimutação foram similares entre os grupos gerados por androgênese e embriogênese.

6.5. Avaliação fenotípica

6.5.1. Macieira

As plantas de macieira propagadas convencionalmente foram avaliadas quanto ao fenótipo dentro do seu respectivo ciclo, uma vez que, o material vegetativo de um ciclo foi utilizado para a formação do ciclo seguinte. O mesmo procedimento foi feito para as plantas micropropagadas. A análise foi feita com a aplicação dos descritores morfológicos conforme a Tabela 15.

Conforme pode ser visto na Tabela 15, nenhuma variação fenotípica foi constatada.

Tabela 15 - Descritores morfológicos* utilizados na caracterização fenotípica das plantas de macieira obtidas por propagação convencional e micropropagação (três ciclos de cultivo).

Característica	Identificação da característica	Plantas analisadas		Plantas com variação	
		Propagação convencional	Micropropagação	Propagação convencional	Micropropagação
Folha em crescimento – coloração da lâmina pela antocianina	Ausente	89	128	0	0
Folha – posição em relação ao caule	Aberta	89	128	0	0
Folha – comprimento	Médio	89	128	0	0
Folha - largura	Média	89	128	0	0
Folha – margem	Dentada	89	128	0	0
Ramos - flexibilidade	Alta	89	128	0	0

*SNPC, 2000.

As folhas de macieira foram caracterizadas com relação à presença de coloração com antocianina nas folhas em crescimento e formato das bordas (Figura 24).

Figura 24 – Folha de macieira em crescimento mostrando ausência de antocianina e bordas dentadas.

Quanto a característica “disposição das folhas no ramo” tanto a planta matriz quanto as plantas regeneradas mostraram as folhas classificadas como “abertas” (Figura 25).

Figura 25 – Folhas abertas - disposição das folhas no ramo de macieira.

Gupta et al. (2009) caracterizaram um grupo de plantas de macieira porta-enxerto EMLA111 obtidas através de micropropagação, quando detectaram variação genética em 23% das plantas obtidas. Numa etapa posterior, já em estado de plântulas, estas foram avaliadas fenotípicamente, não sendo detectada nenhuma característica com variação, em relação à planta mãe.

Polanco e Ruiz (2002), em experimento com *Arabdopsis thaliana*, já citado neste trabalho, detectaram variação entre grupos de plantas advindos de diferentes calos e entre plantas de um mesmo grupo. No entanto, tais variações não foram relacionadas a nenhuma variação fenotípica detectável.

Peredo et al. (2009) detectaram variações no padrão de metilação em *Humulus lupulus*, quando compararam plantas doadoras de explantes e regenerantes, durante 12 subcultivos, sem, no entanto, detectar modificações fenotípicas relacionadas com estas variações.

6.5.2. Morangueiro

As plantas de morangueiro obtidas por propagação vegetativa convencional e micropropagação quando submetidas à avaliação fenotípica foram caracterizadas de acordo com os descritores constantes da Tabela 16.

Tabela 16 - Descritores morfológicos* utilizados na caracterização fenotípica das plantas de morangueiro obtidas por propagação convencional e micropropagação (três ciclos de cultivo).

Característica	Identificação da característica	Plantas analisadas		Plantas com variação	
		Propagação convencional	Micropropagação	Propagação convencional	Micropropagação
Forma dos dentes dos folíolos	Arredondado	130	114	0	0
Cor da folha	Verde escuro	130	114	0	0
Posição da inflorescência em relação ao caule	Abaixo	130	114	0	0

*SNPC, 2003.

Conforme pode ser constatado na Tabela 16, nenhuma variação detectada no fenótipo das plantas analisadas.

As plantas analisadas apresentavam dentes dos folíolos de forma arredondada e coloração verde escuro (Figura 26), tanto na planta matriz como pelas plantas multiplicadas via vegetativa convencional e por micropropagação.

A posição da inflorescência com relação ao caule do morangueiro foi também analisada e a posição caracterizada como “abaixo” foi diagnosticada tanto na planta mãe como pelas plantas multiplicadas via vegetativa convencional e micropropagação (Figura 27).

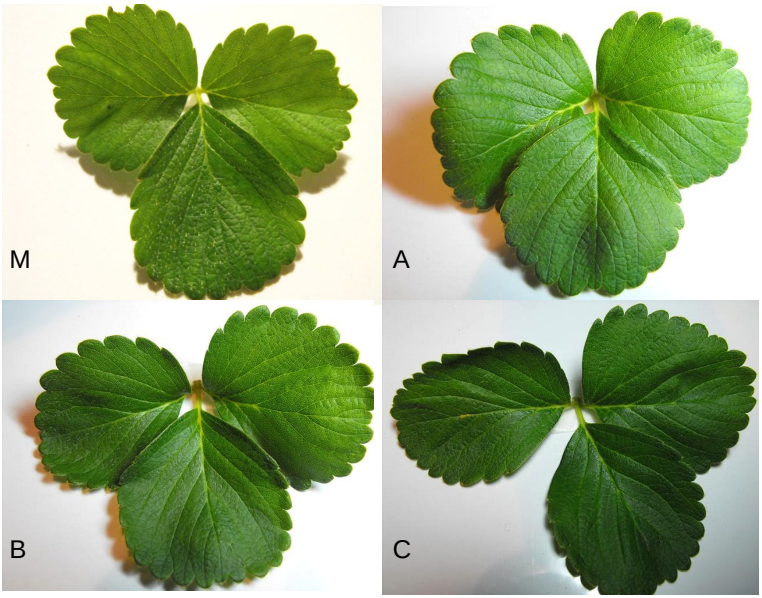

Figura 26 – Folhas de morangueiro micropropagado mostrando forma arredondada dos dentes dos folíolos. M - planta matriz, A - ciclo 1, B - ciclo 2, C - ciclo 3.

Figura 27 – Posição da inflorescência em relação ao caule de morangueiro.

A Figura 28 mostra uma vista geral de plantas de morangueiro apresentando coloração homogênea e dentes de formato arredondado nas margens das folhas, característica esta, presente na planta matriz e nas plantas micropropagadas por via vegetativa convencional e micropropagação, caracterizando a ausência de variação fenotípica.

Figura 28 – Plantas de morangueiro de propagação convencional - forma arredondada dos dentes dos folíolos e coloração verde-escura.

Não foram detectadas alterações fenotípicas entre as plantas dos três ciclos de cultivo dentro das duas modalidades de propagação.

Os resultados obtidos são semelhantes aos de Calvete et al. (2009), quando micropropagaram plantas de duas cultivares de morangueiro durante 10 subcultivos, não observando a ocorrência de alterações fenotípicas durante a micropropagação, aclimatização e cultivo em ambiente protegido, mesmo testando plantas dos dez subcultivos.

Alterações fenotípicas foram encontradas em outras espécies. Park et al. (2009) detectaram alterações fenotípicas na orquidea *Doritaenopsis*, relacionadas a características florais, em 17% das plantas micropropagadas, quando as flores atingiram o estágio de maturação.

Na análise de metilação do DNA detectaram que 11,6% dos fragmentos estavam ligados as plantas com flores de aparência normal; 22,9% dos fragmentos detectados estavam ligados a plantas com flores de sépalas mal formadas; 19,9% dos fragmentos detectados eram liga-

dos as plantas com flores de sépalas fundidas e 13,7% dos fragmentos estavam presentes nas plantas com flores de tamanho reduzido. Todas as variações constatadas foram atribuídas a metilação detectada pela combinação das enzimas *Eco*RI+*Msp*I.

Minano et al. (2009) analisaram plantas de *Chrysanthemum* micropropagadas e detectaram que 2,86% das plantas apresentavam variação no sétimo subcultivo, sem, no entanto, detectar variações fenotípicas associadas a este evento.

Algumas hipóteses podem ser consideradas: i) capacidade e sensibilidade do equipamento utilizado na eletroforese, permitindo detectar variações mínimas no genótipo e o nível de variação genética detectada não ser suficiente para refletir em modificações no fenótipo das plantas analisadas; ii) apesar da grande variação detectada a hipótese das mutações serem silenciosas não pode ser descartada; iii) baixo número de descritores morfológicos aplicados e voltados para o aspecto vegetativo da planta; iv) variação genética detectada não estaria ligada a nenhuma das características fenotípicas analisadas.

Supondo que variações tenham ocorrido e estivessem ligadas a características quantitativas, estas não seriam detectadas com a aplicação dos descritores sugeridos, salvo se alguma das características analisadas fosse codificada por mais de um gene; v) baixo número de indivíduos amostrados restringindo a probabilidade de detectar variações; vi) alterações morfológicas podem surgir após alguns anos de cultivo (PODWYSZYNSKA, 2005; CALVETE et al., 2009).

Segundo Brunello (2002), variações fenotípicas em plantas regeneradas por micropropagação, avaliadas na fase de produção, têm sido pouco estudadas. Estas alterações referem-se principalmente, às características morfológicas, como ciclo da cultura, produção e cor dos frutos, número de ramos primários, cor de flores e resistência a patógenos.

No presente trabalho, apesar das alterações genéticas e epigenéticas detectadas, nenhuma variação fenotípica foi encontrada, corroborando com a afirmativa de Munthali et al.(1996) e Polanco & Ruiz (2002), de que a não detecção de qualquer variação fenotípica entre regenerantes não implica necessariamente numa concomitante falta de mudança genética ou epigenética.

7. CONCLUSÕES

a) Os marcadores utilizados para as análises revelaram alto poder de detecção de mutações e alterações no padrão de metilação de DNA;

b) Foram observadas diferenças estatisticas na variação detectada nas duas espécies estudadas e nos três ciclos de cultivo, mostrando que as variações genéticas e epigenéticas são constantes, tanto na propagação convencional como na micropropagação;

c) Quando se procedeu a análise estatística através do qui-quadrado de contingência notou-se que quando diferenças estatisticas foram detectadas entre os níveis de variação genética e epigenética, estas apresentaram percentuais maiores na micropropagação, tanto na cultura da macieira quanto no morangueiro, não concordando com as hipóteses propostas para o presente trabalho;

d) Uma possível justificativa para as diferenças estatisticas detectadas entre as modalidades de propagação tem como base as taxas médias de multiplicação alcançadas na micropropagação. Os valores obtidos em macieira (6:1) e em morangueiro (4:1) trazem consigo uma maior probabilidade de detectar variação, comparativamente a propagação vegetativa convencional em macieira e morangueiro, cuja taxa de multiplicação alcançada foi de 1:1.

Teoricamente este fato representaria um aumento considerável no tamanho da amostra, sendo de três vezes para o morangueiro e de cinco vezes para a maciiera.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de equipamento com maior precisão (seqüenciador de DNA) possibilitou a obtenção de maior volume de dados e maior confiabilidade aos resultados.

A ocorrência de variantes é uma constatação real nos processos de propagação e o monitoramento da fidelidade genotípica associada à detecção de eventos genéticos e epigenéticos é uma ação importante na produção de mudas, levando-se em conta que a qualidade do material vegetal resultante tem relevância considerável. A ocorrência de variações no material resultante poderá descaracterizá-lo, com relação ao genótipo matriz, e, como resultado, poderá ter queda no nível de produtividade, redução do valor nutricional, menor tolerância a pragas e doenças, dentre outros.

Os resultados aqui obtidos sugerem que um controle de qualidade deve ser estabelecido nos programas de propagação de clones, seja por via convencional, seja por micropropagação.

Dados referentes ao padrão de metilação e seu comportamento entre as modalidades de propagação e espécies estudadas abrem caminho para a realização de trabalhos envolvendo outros segmentos, como a genômica funcional, por exemplo.

Embora não seja o foco do presente trabalho o aproveitamento da variação genética detectada poderia ser considerado. Justificaria um estudo minucioso das plantas que apresentaram maior índice de variação e a possibilidade de sua utilização num programa de melhoramento. Neste contexto, deve-se ter atenção quanto a origem do material vegetal utilizado, visando não ferir a legislação que rege o acesso aos recursos genéticos;

Quanto a Epagri, cujas atividades reservam parte do seu tempo a programas de melhoramento genético, uma opção a ser considerada é a adoção de práticas de caracterização genética dos genótipos envolvidos e o aproveitamento de materiais que apresentam variações, sejam genéticas ou epigenéticas, e também fenotípicas nos referidos programas.

Levando-se em consideração que diversas cultivares de macieira presentes no mercado são procedentes de mutações espontâneas, a preocupação em observar mudanças fenotípicas nas lavouras ou pomares experimentais poderá levar a obtenção de novos e promissores genótipos.

Se por um lado a propagação clonal tem como um dos preceitos a obtenção de populações de plantas muito semelhantes, por outro, pode

funcionar como uma fonte de variabilidade genética, pois traz a possibilidade do surgimento de variantes genéticos e epigenéticos que podem se positivos para utilização dentro do sistema produtivo. Não se pode descartar a hipótese de que as variações surgidas possam decorrer de mecanismos adaptativos. Em função das condições a que são submetidas.

Os avanços científicos indicam de forma inequívoca a grande importância da epigenética frente a genética, tanto na regulação da experessão gênica quanto na evolução, sendo admitido por alguns pensadores biológicos, como o segundo código genético.

Desde a década de 40, quando Waddington definiu epigênese como o conjunto de processos que determinam como o genótipo é traduzido para em fenótipo, inúmeros estudos vêm sendo conduzidos nesta área com em humanos, animais, plantas, insetos, entre outros, associando-os principalmente a regulação da transcrição, através de processos relacionados a modificações na cromatina e no silenciamento gênico pela metilação do DNA.

Com o passar dos anos percebeu-se que mudanças na expressão dos genes não estavam obrigatoriamente associadas a mudanças nas seqüências de DNA.

Foi-se descobrindo que a metilação do DNA atuava como uma espécie de regulador na expressão gênica, conforme os organismos fossem se desenvolvendo ou, como resposta as condições ambientais a que fossem expostos ou ainda, como mecanismo de defesa do genoma contra DNA invasivo, e que estas modificações poderiam ser herdáveis.

Jablonka & Lamb (2005) em seu livro, Evolução em quatro dimensões, mostram um panorama da influência da epigenética e outras dimensões na herança, regulação, desenvolvimento e na evolução dos organismos. Desde a definição de epigênese sugerida por Waddington até os dias atuais resultados de pesquisas relativas a eventos epigenéticos são publicadas constantemente nos mais diversos periódicos do mundo.

A referida definição foi sendo aprimorada e nos dias atuais a epigenética é entendida não apenas como um ramo da biologia, mas, está próxima de ser considerada uma ciência, tal qual há muitos anos é considerada a genética.

A revista Heredity 105 (julho de 2010) publicou uma coletânea de artigos sobre este tema, cuja leitura nos permite ter uma visão ampla do tema, suas implicações na saúde humana, no reino animal e vegetal, na ecologia, sua interação com o ambiente e os benefícios que o estudo desta ciência pode trazer para a humanidade.

Na última década comprovou-se que eventos ligados a epigenética estão associados nos mais diversos campos da vida de humanos, plantas, animais, insetos e microorganismos. Hoje sabemos que a metilação do DNA está associada ao silenciamento de genes supressores de tumores em câncer (BAYLIN & HERMAN, 2000), algumas doenças hereditárias são causadas por defeitos no “imprinting” genômico (MURPHY & JIRTLE, 2000), mudanças epigenéticas no padrão de metilação estão ligadas a alterações do envelhecimento (LAMB, 1994). Tais descobertas trazem grandes implicações na medicina, uma vez que abrem a possibilidade de tratamento de algumas doenças pela alteração epigenética dos genes.

Quanto a mecanismos de defesa, há aspectos da epigenética que podem ser relevantes para prevenir ou curar doenças. As células têm um sofisticado mecanismo epigenético para evitar ou destruir parasitas genômicos (WOLFFE & MATZKE, 1999).

Como as variações epigenéticas podem ser induzidas por mudanças ambientais, no campo da agricultura poderia ser possível desenvolver práticas que explorassem esses efeitos da indução e assim, desenvolver culturas melhoradas por outros meios que não só o melhoramento genético clássico.

Até agora, a epigenética teve pouco impacto sobre a ecologia, mas existe uma grande necessidade de conduzir estudos que analisem a freqüência de variantes epigenéticas em populações naturais. Esses estudos podem ser importantes para programas de conservação. Organismos interagem uns com os outros e com o meio ambiente abiótico, e através dessas interações adquirem informação epigenética, algumas das quais, são herdadas.

Por sua natureza, esta informação epigenética não é algo estabelecido uma vez por todas, é o resultado do desenvolvimento gradual do processo histórico construído ao longo de muitas gerações. Isso significa que o congelamento sementes, embriões, ou DNA, com a finalidade de restaurar as plantas e animais à natureza, visando um futuro ecologicamente saudável, não podem funcionar a menos que as condições refletidas em sua herança epigenética também sejam reconstruídas (JABLONKA & LAMB, 2002).

Segundo as autoras, "quando destruímos um ecossistema, perdemos maior variação e diversidade do que imaginamos, tanto genética como epigenética".

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S.; VINKENOOG, R.; SPIELMAN, M.; DICKINSON, H.G. & SCOTT, R.J. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabdopsis thaliana* require DNA methylation. **Development**, Cambridge, v. 127, n. 11, p. 2493 - 2502, 2000.

ANTUNES, L.E.C. & REISSER JÚNIOR, C. Produção de morangos. **Jornal da Fruta**, Lages, v. 15, n. 191, p. 22-24, 2007.

ANWAY, M. D.; CUPP, A. S.; UZUMCU, M. & SKINNER, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. **Science,** Cambridge, v. 308, n. 5727, p. 1466 – 1469, 2005.

ARCHETTI, M. Loss of complementation and the logic of two step meiosis. **Journal Evolutionary Biology**, Basel, v. 17, n. 5, p. 1098 – 1105, 2004.

ARRUDA, A. S.; FIGUEIRA, E. R.; SILVA, A. S.; LONDE, L. N.; VIEIRA E SOUSA, G. F. M.; SPINI, V. B. M. G.; SOUSA, C. S.; KERR, W. E. & GOULART, L. R. Variação genômica intraclonal de explantes de morango em ambiente controlado. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 1, p. 119 - 124, 2006.

ASHIKAWA, I. Surveying CpG methylation in 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 45, n. 1, p. 31 - 39, 2001.

AVERSANO, R.; SAVARECE, S.; MARIA, J.; FRUSCIANTE, L.; PUNZO, M. & CARPUTO, D.. Genetic stability at nuclear and plastid DNA level in regenerated plants of Solanum species and hybrids. **Euphytica,** Dordrecht, v. 165, n. 2, p. 353–361, 2009.

BAJAJ, Y. P. S. Somaclonal variation—origin, induction, cryopreservation, and implication in plant breeding. In: Bajaj Y. P. S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 2: Somaclonal variation in crop improvement**. Berlin: Springer, 1990, p. 3 – 48.

BARDINI, M.; LABRA, M.; WINFIELD, M. & SALA, F. Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana*, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 72, n. 2, p. 157–162, 2003.

BARTOLOMEI, M.S. & TILGHMAN, S.M. Genomic imprinting in mammals. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 31, p. 493 - 525, 1997.

BASTOW, R. MYLNE, J. S.; LISTER, C.; LIPPMAN, Z.; MARTIENSSEN, R .A. & DEAN, C.. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. **Nature**, London, v. 427, n. 6970, p. 164 – 167, 2004.

BAURENS, F.-C.; BONNOT, F.; BIENVENU, D; CAUSSE, S. & LEGRAVE, T. Using SD-AFLP and MSAP to Assess CCGG Methylation in the Banana Genome. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 21, n. 4, p. 339 - 348, 2003.

BAYLIN, S.B. & HERMAN, J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis. **Trends Genetics**, Amsterdan, v. 16, n. 4, p. 168 – 174, 2000.

BAYLISS, M.W. Chromosomal Variation in Plant Tissues in Culture. **International Review of Cytology**, Knoxville, Supp. 11A, p. 113-144, 1980.

BEDNAREK, P.T.; ORŁOWSKA, R.; KOEBNER, R.M.D. & ZIMNY, J. Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). **BMC Plant Biology**, London, v. 7, n. 10, p. 1-9, 2007.

BENDER, J. DNA methylation and epigenetics. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 41 – 68, 2004.

BENNETT, M. D. Perspectives on polyploidy in plants — ancient and neo. **Biological Journal Linneau Society**, London, v. 82, n. 4, p. 411 – 423, 2004.

BERGER, S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, London, v. 447, n. 7143, p. 407 – 412, 2007.

BERNACCHIA, G.; PRIMO, A.; GIORGETTI, L.; PITTO, L. & CELLA, R. Carrot DNA-methyltransferase is encoded by two classes of genes with different patterns of expression. **The Plant Journal**, v.13, n. 3, p.317-329, 1998.

BESSHO, H., SOEJIMA, J., ITO, Y., KOMORI, S. Breeding and genetic analysis of apple in Japan. In: HAYASHI, T., OMURA,M., SCOTT, N.S. **Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees**. Tsukuba: Fruit Tree Research Station, 1993. p. 231-240.

BHAUMIK, S.; R. SMITH, E. & SHILATIFARD, A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 14, n. 11, p. 1008 – 1016, 2007.

BIANCHI, M.W. & VIOTTI, A. DNA methylation and tissue-specific transcription of the storage protein genes of maize. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 11, n. 2, p. 203 - 214, 1988.

BINNS, A. & MEINS, F.Jr. Chromosome number and the degree of cytokinin habituation of cultures tobacco pith cells. **Protoplasma**, New York, v. 103, p. 179 - 187, 1980.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, New York, v.16, n. 1, p. 6-21, 2002.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, London, v. 447, n. 7143, p. 396 – 398, 2007.

BISWAS, M.K.; ISLAM, R. & HOSSAIN, M. Micro propagation and field evaluation of strawberry in Bangladesh. **Journal of Agricultural Technology**, v. 4 n. 1, p. 167-182, 2008.

BLEWITT, M. E.; VICKARYOUS, N .K.; PALDI, A.; KOSEKI, H. & WHITELAW, E. Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 2, n. 4, e49. 2006.

BONETI, J. I. S.; BLEICHER, J.; BERTON, O.; KATSURAYAMA, Y. & DENARDI, F. Doenças fúngicas das raízes. In: **EPAGRI. A cultura da macieira**. Florianópolis, 2006. p. 578 – 594.

BORDALLO, p. n.; SILVA, D. H.; MARIA, J.; CRUZ, C. D. & FONTES, E. P. Somaclonal variation on in vitro callus culture potato cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 300 - 304, 2004.

BOSSDORF, O.; RICHARDS, C. L. & Pigliucci, M. Epigenetics for ecologists. **Ecology Letters**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 106 – 115, 2008.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. & DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment lenght polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314 - 331, 1980.

BROWERS, M.A. & ORTON, T.S. A factorial study of chromosomal variability in callus cultures of celery (*Apium graveolens*). **Plant Science Letters**, Limerick, v. 26, n. 1, p. 65 - 73, 1982.

BRUNELLO, A.E.M. Clonagem: variação somaclonal em frutíferas perenes. Disponível em < http://www.ufv.br/dbg/BIO240/C017.htm>. Acesso em 8 outubro de 2002.

BURN, J.E.; BAGNALL, D.J.; METZGER, J.D.; DENNIS, E.S. & PEACOCK, W.J. DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 90, n. 1, p. 287 - 291, 1993.

CALVETE, E. O.; GRANDO, M. F.; GOMIDE, D. G.; MARAN, R. E.; SUZIN, M.; NIENOW, A. A. & CECCHETTI, D. Desempenho *in vitro* e agronômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 943 – 949, 2009.

CAMILO, A.P. & DENARDI, F. Cultivares: Descrição e comportamento no Sul do Brasil. In: **EPAGRI. A cultura da macieira.** Florianópolis: Epagri, 2002, p. 113 - 168.

CERUTTI, H. & CASAS-MOLLANO, J. A. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. **Current Genetics**, Heidelberg, v. 50, n. 2, p. 81 – 99, 2006.

CERVERA, M.-T.; RUIZ-GARCIA, L. & MARTINEZ-ZAPATER, J. Analysis of DNA methylation in Arabidopsis thaliana based on methylation-sensitive AFLP markers. **Molecular Genetics Genomics**, Heidelberg, v. 268, n. 4, p. 543 – 552, 2002.

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

CHATURVEDI, H.C.; SINGH, S.K.; SHARMA, A.K.;& AGNIHOTRI, S. Citrus tissue culture employing vegetative explants. **Indian Journal Experimental Biology,** New Delhi, v. 39, n. 11, p. 1080 - 1095, 2001.

CHEN, W. H.; CHEN, T. M.; FU, Y. M.; HSIEH R. M. & CHEN, W. S. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, n. 1-2, p. 7 – 13, 1998.

CHEN, Z.J. & NI, Z. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 240 – 252, 2006.

CHONG, S. & WHITELAW, E. Epigenetic germline inheritance. **Current Opinion Genetics Development**, London, v. 14, n. 6, p. 692 – 696, 2004.

CHUANG, S. J.; CHEN, C. L.; CHEN, J. J.; CHOU, W. Y. & SUNG , J. M. Detection of somaclonal variation in micro-propagated Echinacea purpurea using AFLP marker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, 01v. 120, n. 1, p. 121 – 126, 2009.

CONNER, J. K. & HARTL, D. L. A **Primer of Ecological Genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 304 p.

CREWS, D.; GORE, A. C.; HSU, T.S.;DANGLEBEN, N. L.;SPINETTA, M., SCHALLERT, T. ANWAY , M. D. & SKINNER, M. K. Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. **Proceedings National Academy Science USA**, Washington, v.104, n. 14, p. 5942 – 5946, 2007.

CROPLEY, J. E.; SUTER, C. M.; BECKMAN, K. B. & MARTIN, D. I. K. Germ-line epigenetic modification of the murine A(vy) allele by nutritional supplementation. **Proceedings National Academy Science USA**, Washington, v. 103, n. 46, p. 17308 – 17312, 2006.

CUBAS, P.; VINCENT, C. & COEN, E. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. **Nature**, London, v. 401, n. 6749, p. 157 – 161, 1999.

CULLIS, C.A. Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax. **Annals of Botany**, Oxford, *v.* 95, n. 1, p. 201 – 206, 2005.

DAMASCO, O.P.; GRAHAM, G.C.; HENRY, R.J.; ADKIMS, S.W.; SMITH, M.K. & GODWIN, I.D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (Musa spp.) AAA) bananas. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 1-2, p. 118 - 123, 1996.

DE JONG, J. & CUSTERS, J.B.M. Induced changes in growth and flowering of chrysanthemum after irradiation *in vitro* culture of pedicels and petal epidermis. **Euphytica,** Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 137 - 148, 1986.

DENARDI, F. & SECCON, J. J. 'Castel Gala' – mutação da macieira 'Gala' com baixa necessidade de frio e maturação precoce. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 18, p. 78 – 82, 2005.

DENARDI, F. Porta-enxertos. In: **EPAGRI. A cultura da macieira**. Florianópolis, 2006. p. 169 – 227.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. & PETRY, J. L. EPAGRI-407-Lisgala: mutação da cultivar de macieira Gala com epiderme mais colorida. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 10, n.1, p. 55 - 56, 1997.

DENNIS, E.S.; FINNEGAN, E.J.; BILODEAU, P.; CHAUDHURY, A.; GENGER, R.; SHELDON, C.C.; BAGNALL, D.J. & PEACOCK, W.J. Vernalization and the initiation of flowering. **Cell & Developmental Biology**, London, v. 7, n. 3, p. 441 - 448, 1996.

DHAR, M.S.; PETHE, V.V.; GUPTA, V.S. & RANJEKAR, P.K. Predominance and tissue specificity of adenine methylation in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 80, n. 3, p. 402 - 408, 1990.

DOERFLER, W. DNA methylation and gene activity. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 52, p. 93 - 124, 1983.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin of Botanical Society of America**, St. Louis, v. 19, p. 11 - 15, 1987.

EHRLICH, M. & EHRLICH, K. C. Effect of DNA methylation on the binding of vertebrate and plant proteins to DNA. In: Jost JP & Saluz HP (eds) **DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Importance**. Basel: Springer-Verlag, 1993, p. 145 – 168.

ELDRIGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWOOD, C. & VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994, p. 228 - 246.

ELLSTRAND, N. C. & SCHIERENBECK, K. A. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness. **Proceedings National Academy Science USA**, Washington, v. 97, n. 13, p. 7043 – 7050, 2000.

ERIG, A.L. & SCHUCK, M.W. Avaliação da fidelidade genotípica por marcadores RAPDs de brotações de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick, regeneradas *in vitro*. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 33, n.3, p. 449 - 454, 2003.

FERLA, N.J.; MARCHETTI, M.M. & GONÇALVES, D. Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (*Fragaria* sp., Rosaceae) e plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 103 - 110, 2007.

FERRARI. M. P.; GROSSI, F. & WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo – PR: Embrapa Florestas, 2004. 22 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 94).

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M.P. & NODARI, R.O. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, n. 72, n. 3, p. 221 - 227, 2003.

FIELDES, M.A. & AMYOT, L.M. Epigenetic control of early flowering in flax lines induced by 5-azacytidine applied to germinating seed. **Journal Heredity**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 199 – 206, 1999.

FINNEGAN, E.J.; GENGER, R.K.; PEACOCK, W.J. & DENNIS, E.S. DNA methylation in plants. **Annual. Review of Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 223 - 248, 1998.

FINNEGAN, E.J.; PEACOCK, W.J. & DENNIS, E.S. Reduced DNA methylation in *Arabdopsis thaliana* results in abnormal plant development. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 93, n. 16, p. 8449 - 8454, 1996.

FISH, N. & KARP, A. Improvement in regeneration from protoplast of potato and studies in chromosome stability 1. The effect of initial culture media. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 72, n. 3, p. 405 - 412, 1986.

FRAGA, M. F.; CAÑAL, M. J. & RODRIGUES, R. Phase-changed related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiate* D. Don., **Planta,** v. 215, n. 4, p. 672 – 678, 2002.

FREEMAN, J. L.; PERRY, G. H. & FEUK, L. et al. (13 co-authors). Copy number variation: new insights in genome diversity. **Genome Research**, New York, v. 16, n. 8, p. 949 – 961, 2006.

GAPONENKO, A.K.;PETROVA, T.F.; ISKAKOV, A.R.; SOZINOV, A.A. & VAVILOV, N.I. Cytogenetics of *in vitro* cultures somatic cells and regenerated plants of barley *Hordeum vulgare*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 75, p. 905 - 911, 1988.

GAVAZZI, G.; DOLFINI, S.; ALLEGRA, D.; CASTIGLIONI, P; TODESCO, G. & HOXHA, M. Dap (defective aleurone pigmentation) mutations affect maize aleurone development. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 256, n. 3, p.23 - 230, 1997.

GEHRING, M. & HENIKOFF, S. **DNA methylation and demethylation in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book***, DOI: 10.1199/tab., 2008. Disponível em <.http://www.arabidopsis.org/publications/arabidopsis>. Acesso em 10 agosto de 2010.

GEHRING, M.; REIK, W. & HENIKOFF, S. DNA demethylation by DNA repair. **Trends in Genetics**, Amsterdan, v. 25, n. 2, p. 82 - 90, 2008.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A. & DE KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture** 3. ed. v. 1. The Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A. & DE KLERK, G-J. (Eds.). 2008. 512 p.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**, 2. ed. England: Exegetics Ltd., p.67-85, 1993.

GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D. & BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, Cambridge, v. 128, n. 4, p. 635 – 638, 2007.

GONZALGO, M. L. & JONES, P. A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. **Mutation Research**. Amsterdan, v. 386, n. 2, p. 107 – 118, 1997a.

GONZALGO, M. L. & JONES, P. A. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). **Nucleic Acids Research**, London, *v. 25, n. 12, p. 2529 – 2531 1997b.*

GONZALGO, M.L. & JONES, P.A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutant*, v.386, p.107-118, 1997a.

GRAÇA, M. E. C.; TAVARES, F. R.; RODIGHERI, H. R. & COOPER, M. A. **Produção de mudas de erva-mate por estaquia**. Curitiba: Embrapa Florestas – EMATER, 1990. 20 p.

GRANT-DOWNTON, R. T. & DICKINSON, H. G. Epigenetics and its implications for plant biology: 1. The epigenetic network in plants. **Annals Botany**, Oxford, v. 96, n. 7, p. 1143 – 1164, 2005.

GRANT-DOWNTON, R. T. & DICKINSON, H. G. Epigenetics and its implications for plant biology: 2. The epigenetic epiphany: epigenetics, evolution and beyond. **Annals Botany**, Oxford, v. 97, n. 1, p. 11 – 27, 2006.

GUERRA, M.P. & NODARI, R.O. Cultura de tecidos vegetais e micropropagação de plantas. Disponível em http://www.lfdgv.ufsc.br/ApostilaBiotecnologia.pdf. Acesso em 24 dezembro 2009.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C. & TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-CBAB, 1999. p. 533-568.

GUPTA, R.; MODGIL, M. & CHAKRABARTI, S.K. Assessment of genetic fidelity of micropropagated apple rootstock plants EMLA 111, using RAPD markers. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 47, n. 11, p. 925-928, 2009.

HAIG, D. & WESTOBY, M. Genomic imprinting in endosperm: its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixes. **Philosophical Transactions: Biological Sciences,** London, v. 333, n. 1266, p. 1 - 13, 1991.

HAO, Y.-L. & DENG, X.-X. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 72, n. 3, p. 253 - 260, 2003.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2002. 847 p.

HARTWELL, L. H.; HOOD, L.; GOLDBERG, M. L.; REYNOLDS, A. E.; SILVER, L. M. & VERES, R. C. **Genetics: from genes to genomes**. New York: McGraw Hill. p. 1 – 12, 2004.

HASHMI, G.; HUETTEL, R.; MEYOR, R.; KRUSBERG, L. & HAMMERSCHLAG, F. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 9, p. 624 - 627, 1997.

HE, Y. H. & AMASINO, R. M. Role of chromatin modification in flowering-time control. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 30 – 35, 2005.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J.-P.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.L.; BOUTLIER, K.; GROSSNIKLAUS, U. & DE VRIES, U. The *Arabdopsis* somatic embryogenesis receptor dinase 1 gene is expression in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 3, p. 803 - 816, 2001.

HIGA, R. C. V. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) por estaquia. In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais: Silvicultura da erva-mate, 10, 1983, Curitiba. **Anais**... Curitiba: Embrapa-CNPF, 1983. p. 119 - 123. (Documentos, 15).

HIROCHIKA, H.; SUGIMOTO, K.; OTSUKI, Y.; TSUGAWA, H. & KANDA, M. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture **Proceedings of National Academy of Science USA**, Washington, v. 93, n. 15, p. 7783 - 7788, 1996.

HOLLIDAY, R. The inheritance of epigenetic defects. **Science**, New York, v. 238, n. 4824, p. 163 - 170, 1987.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro. v. 22, n. 01, p. 1-79, jan 2010.

ILLG, R.D. Variação somaclonal. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/EMBRAPA, 1990. p. 287 - 295.

JABLONKA, E. & LAMB, M. J. Epigenetic inheritance in evolution. **Journal Evolutionary Biology**, Basel, v. 11, n. 2, p. 159 – 183, 1998.

JABLONKA, E. & LAMB, M. The changing concepts of epigenetics. **Annual New York Academy Science**, New York, v. 981, p. 82 – 96, 2002.

JABLONKA, E. & LAMB, M.J. **Evolution in Four Dimensions: Genetic, Epigenetic, Behavioral, and Symbolic Variation in the History of Life**. MIT Press, Cambridge. 2005. 474 p.

JAENISCH, R. & BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, New York, v. 33, Supp. p. 245 – 254, 2003.

JALIGOT, E.; RIVAL, A.; BEULÉ, T.; DUSSERT, S. & VERDEIL, J.-L. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 7, p. 684 - 690, 2000.

JANOUSEK, B.; SLUVOVA, J. & VYSKOT, B. Histone H4 acetylation and DNA methylation dynamics during pollen development. **Protoplasma**, New York, v. 211, n. 1-2, p. 116 - 122, 2000.

JIRTLE, R. L. & SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Review Genetics**, London, v. 8, n. 4, p. 253 – 262, 2007.

KAEPPLER, S.M. & PHILLIPS, R. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 90, n. 19, p. 8773 - 8776, 1993b.

KAEPPLER, S.M. & PHILLIPS, R.L. DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. **In Vitro Cell Development Biology**, Columbia, v. 29, n. 3, p. 125 - 130, 1993a.

KAEPPLER, S.M.; KAEPPLER, H.F. & RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 43, n. 2 - 3, p. 179 - 188, 2000.

KALISZ, S. & PURUGGANAN, M. D. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. **Trends Ecology Evolution**, Amsterdan, v. 19, n. 6, p. 309 – 314, 2004.

KARP, A. & BRIGHT, S.W. On the causes and origins of somaclonal variation. *Ox521300*, **Survey of Plant Molecular and Cellular Biology**, Oxford, v. 2, p. 199 - 234, 1985.

KASPERBAUER, M.J. & COLLINS, G.B. Reconstitution of diploids from leaf tissue of anther-derived haploids in tobacco. **Crop Science**, v. 12, p. 98 - 101, 1972.

KATZ, L. A. Genomes: epigenomics and the future of genome sciences. **Current Biology**, London, v. 16, n. 23, p. R996 – R997, 2006.

KAWATA, M.; OHMIYA, A.; SHIMAMOTO, Y.; OONO, K. & TAKAIWA, F. Structural changes in the plastid DNA of rice (*Oryza sativa* L.) during tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 3-4, p. 364 - 371, 1995.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnología Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 21 - 43,1997.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/Embrapa, p. 519 - 531, 1999.

KERMICLE, J.L. & ALLEMAN, M. Gametic imprinting in maize in relation to the angiosperm life cycle. **Development,** Cambridge, Supp., p. 9 - 14, 1990.

KEYTE, A.L., PERCIFIELD, R., LIU, B. & WENDEL, J.F. Intraspecific DNA methylation polymorphism in cotton (Gossypium hirsutum L.). **Journal Heredity**, Oxford, v. 97, n. 5, p. 444 – 450, 2006.

KLAAS, M. & AMASINO, R.M.. DNA methylation is reduced in Dnase-sensitive regions of plant chromatin. **Plant Physiology**, Rockville, v.91, n. 2, p.451-454, 1989.

KLOSE, R. J. & BIRD, A.P.: Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochemical Science,** London, v. 31, n. 2, p. 89 – 97, 2006.

KONDRASHOV, A. S. The asexual ploidy cycle and the origin of sex. **Nature**, London, v. 370, n. 6486, p. 213 – 216, 1994.

KOUKALOVA, B.; FOJTOVA, M.; LIM, Y. K.; FULNECEK, J.; LEITCH, A. R. & KOVARIK, A. Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, n. 1, p. 275 – 286, 2005.

KOVARIC, A. KOUKALOVA, B.; HOLY, A. & BEZDEK, M. Sequence-specific hypomethylation of the tobacco genome induced with dihydroxypropyladenine, ethionine and 5-azacytidine. **FEBS Letters**., Amsterdan, v. 353, n.3, p. 309 - 311, 1994.

KUBIS, S. E. ; CASTILHO, A. M. M. F.; VERSHININ, A. V. & HESLOP-HARRISON, J. S. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (Elaeis guineensis) and the relationship to somaclonal variation. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 52, n. 1, p. 69 – 79, 2003.

KUMAR, M.B.; BARKER, R.E. & REED, B.M. Morphological analysis of genetic stability in micropropagated *Fragaria x ananassa* cv. Pocahontas. *In* **vitro Cell Development Biology - Plant**, Columbia, v. 35, n. 3, p. 254 - 258, 1999.

LAMB, M.J. Epigenetic inheritance and aging. **Reviews Clinical Gerontology**.,Cambridge, v, 4, n. 2, p. 97 – 105, 1994.

LAMBE, P.; DINANT, M. & MATAGNE, R.F. Differential long-term expression and methylation of the hygromycin phosphotransferase (hph) and β-glucuronidase (GUS) genes in transgenic pearl millet (Pennisetum glaucum) callus. **Plant Science,** Clare, v. 108, p. 51 - 62, 1995.

LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R.. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, p.197 - 214, 1981.

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

LEWIN, B. **Genes VII**. Oxford: Oxford University Press. 2000. 990 p.

LEWIN, B. **Genes VIII**. Oxford: Oxford University Press. 2004. 1002 p.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Review Genetics**, London, v. 3, n. 9, p. 662 673, 2002.

LI, X.; XU, M. & KORBAN, S.S. DNA methylation profiles differ between field-and in vitro-grown leaves of apple. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 159, p. 1229 - 1234, 2002.

LIN, B.-Y. Ploidy barrier to endosperm development in maize. **Genetics**, Kansas, v. 107, p. 103 - 115. 1984.

LINNE, F.; HEIDMANN, I.; SAEDLER, H. & MEYER, P.. Epigenetic changes in the expression of the maize *A1* gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. **Molecular General Genetics**, Berlin, v. 222, n. 2-3, p. 329 - 336, 1990.

LIPPMAN, Z.; MAY, B.; YORDAN, C.; SINGER, T. & MARTIENSSEN, R. Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 1, n. 3, p. 420 – 428, 2003.

LISTER, R.; O'MALLEY, R. C.; TONTI-FILIPPINI, J.; GREGORY, B. D.; BERRY, C. C. ; MILLAR, A. H. & ECKER, J. R. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. **Cell**, Cambridge, v. 133, n. 3, p. 523 – 536, 2008.

LIU, B. & WENDEL, J. F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular* **Phylogenetics Evolution**, Orlando, v. 29, n. 3, p. 365 – 379, 2003.

LIU, B.; BRUBAKER, C.L.; MERGEAI, G.; CRONN, R.C. & WENDEL. J.F. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes, **Genome,** Ottawa, v. 44, p. 321–330, 2001.

LO SCHIAVO, F.; PITTO, L.; GIULIANO, G.; TORTI, G.; NUTI-RONCHI, V.; MARAZZITI, D.; VERGARA, R.; ORSELLI, S. & TERZI, M. DNA methylation of embryonic carrot cell cultures and its variations as caused mutation, differentiation, hormones, and hypomethylating drugs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 3, p. 325 - 331, 1989.

LOPES, M.S.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S. & VIEIRA, M.L.C.. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 56 - 60, 2002.

LUKENS, L.N.; PIRES, J.C.; LEON, E.; VOGELZANG, R.; OSLACH, L. & OSBORN, T. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids, **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 1, p. 336 – 348, 2001.

LUND, G.; CICERI, P. & VIOTTI, A. Maternal-specific hypomethylation and expression of specific alleles of zein genes in the endosperm of *Zea mays* L. **Plant Journal**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 571 - 581, 1995.

LYNCH, M. **The origins of genome architecture**. Sunderland: Sinauer Associates. 2007. 494 p.

MABLE, B. K. & OTTO, S. P. The evolution of life cycles with haploid and diploid phases. **Bioessays**, Cambridge, v. 20, n. 6, p. 453 – 462, 1998.

MADAIL, J. C. M. A Economia do Morango. Embrapa Clima Temperado. IV Simpósio Nacional do Morango e III Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul. 2008, Pelotas (RS). **Anais**... Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2008.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A. & MCKEE, R.A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTHELL,S.H.; MATTHEWS, J.A. & MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética de plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 01-181.

MARFIL, C. F.; CAMADRO, E. L. & MASUELLI, R. W. Phenotypic instability and epigenetic variability in a population of the wild potato *Solanum ruizlealii. BMC* ***Plant Biology***, London, v**. 9, n. 21, p. 1 – 16, 2009.**

MARTIENSSEN, R. A. & COLOT, V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. **Science**, Cambridge, v. 293, n. 5532, p. 1070 – 1074, 2001.

MARTIN, C.; UBERHUAGA, E. & PEREZ, C. Application of RAPD markers in the characterization of Chrysanthemum varieties and assessment of somaclonal variation. **Euphytica**, Dordrecht, v. 127, n. 2, p. 247 – 253, 2002.

MATTHES, M.; SINGH, R.; CHEAH, S.C. & KARP, A. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, n. 6, p. 971 -979, 2001.

MESSENGUER, R.; GANAL, M.W.; STEFFENS, J.C. & TANKSLEY, S.D. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. **Plant. Molecular Biology**, Boston, v.16, n. 5, p. 753 - 770, 1991.

MINANO, H.S.; GONZALEZ-BENITO, M.E. & MARTIN, C. Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in Chrysanthemum cultivars using RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, v. 122, n. 2, p. 238–243, 2009.

MITHILA, J.; HALL, J. C.; VICTOR, J.M.R. & SAXENA, P.K. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (Saintpaulia ionantha Wendl.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 5, p. 408–414, 2003.

MITTELSTEN SCHEID, O.; AFSAR, K. & PASZKOWSKI, J. Formation of stable epialleles and their paramutation-like interaction in tetraploid *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, New York, *v. 34, n. 4, p. 450 – 454, 2003.*

MOCHIZUKI, K. & GOROVSKY, M. A. Small RNAs in genome rearrangement in Tetrahymena. **Current Opinion Genetics Development**, London, v. 14, n. 2, p. 181 – 187, 2004.

MODGIL, M., MAHAJAN, K., CHAKRABARTI, S.K., SHARMA, D.R., & SOBTI, R.C. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, v. 104, n. 2, p. 151 - 160, 2005.

MORGAN, H.D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W. & TEIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, n. 1, p. R47 – R58, 2005.

MÜLLER, E.; BROWN, P.T.H.; HARTKE, S. & LÖRZ, H. DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 80, n. 5, p. 673 - 679, 1990.

MULLIS, K. & FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**., New York, v. 55, n. 2, p. 335 - 350, 1987.

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. **Physiology Plant,** Copenhaguen, v. 93, n. 1, p. 5 - 10, 1995.

MUNTHALI, M.T.; NEWBURY, H.J. & FORD-LLOYD, B.V. The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, n. 7, p. 474 - 478, 1996.

MURASHIGE, T & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 43, p. 473 - 497, 1962.

MURPHY, S.K. & JIRTLE, R. L. Imprinted genes as potential genetic and epigenetic toxicological targets. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v. 108, Supp. 1, p. 5 – 11, 2000.

NACHTIGAL, J.C. & CAMARGO, U.A. Sistema de Produção de Uva de Mesa do Norte de Minas Gerais. Bento Gonçalves – RS. Embrapa Uva e Vinho, 2005. (Embrapa Uva e Vinho, *Sistema de Produção*, n.11). Versão Eletrônica disponível em:http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/MesaNorteMinas/cultivares.htm, acessado em 02/02/2010.

NESI, C. N.; VERONA, L. A. F. & GROSSI, R. A produção de morangos em Santa Catarina no ano de 2006 In: IV Simpósio Nacional do Morango e III Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do MERCOSUL, 2008, Pelotas. **Anais**... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.100, 2008.

NGERNPRASIRTSIRI, J.; CHOLLET, R. & KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, T & AKAZAWA, T. DNA methylation and the differential expression of C4 photosynthesis genes in mesophyll and bundle sheath cells of greening maize leaves. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore,v. 264, n. 14, p. 8241 - 8248, 1989.

NODARI, R.O. Marcadores genéticos. *In*: Biotecnologia aplicada no melhoramento vegetal. Disponível em <http://www.lfdgv.ufsc.br/marcadoresmoleculares2.pdf> Acesso em 25 outubro 2006.

NUISMER, S. L. & OTTO, S. P. Host-parasite interactions and the evolution of ploidy. **Proceedings National Academy Science USA**, Washington, v. 101, n. 30, p. 11036 – 11039, 2004.

NYBOM, H.; RAMSER, J.; KAEMMER, D.; KAHL, G. & WEISING, K. Oligonucleotide DNA fingerprinting detects a multiallelic locus in box elder. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 65 - 67,1992.

OTTO, S. P. & WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review Genetics,** Palo Alto, v. 34, p. 401 – 437, 2000.

PALMGREN, G.; MATTSSON, O. & OKKELS, F.T. Specific levels of DNA methylation in various tissues, cell lines, and cell types of *Daucus carota*. Plant **Physiology**, Rockville, v. 95, n. 1, p.174 - 178, 1991.

PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical. Applied. Genetics**, Berlin, v. 85, n. 8, p. 985 - 993, 1993.

PARANI, M.; ANAND, A. & PARIDA, A. Application of RAPD fingerprinting in selection of micropropagated plants of *Piper longum* for conservation. **Current Science**, Bangalore, v. 73, n. 1, p. 81 - 83, 1997.

PARFREY, L. W.; LAHR, D. J. G. & KATZ, L. A. The Dynamic Nature of Eukaryotic Genomes. **Molecular Biology Evolution**, Chicago, v. 25, n. 4, p. 787 – 794, 2008.

PARK, S.Y.; MURTHY, H.N.; CHAKRABRATHY, D. & PAEK, K.Y. Detection of epigenetic variation in tissue culture derived plants of *Doritaenopsis* by methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis. **In Vitro Cellular and Develomental Biology-Plant**, Columbia, v. 45, n. 1, p.104–108, 2009.

PASZKOWSKI, J. & WHITHAM, S. Gene silencing and methylation processes. **Current Opinion. Plant Biology**, Oxford, v.4, n. 2, p.123-129, 2001.

PENTERMAN, J.; DANIEL ZILBERMAN, D.; HUH, J. H.;, BALLINGER, T.; HENIKOFF, S. & FISCHER, R. L. DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. **Proceedings of National Academy Science USA**, *Washington*, v. 104, n. 16, p. 6752 – 6757, 2007.

PERAZA-ECHEVERRIA, S.; HERRERA-VALENCIA, V.A. & JAMES-KAY, A. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). **Plant Science**, Clare, v. 161, n. 2, p. 359 - 367, 2001.

PEREDO, E.L.; ARROYO-GARCIA, R. & ANGELES REVILLA, M. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166, n. 10, p 1101 - 1111, 2009.

PEREZ, L.E.P. Bases Fisiológicas e Genéticas da Regeneração de Plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 25, p. 44 - 48, 2002.

PESCHKE, V. M. & PHILLIPS, R. L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. In: SCANDALIOS, J. G.; WRIGHT, T. R. F., (Eds.) **Advances in genetics**, vol. 30. San Diego: Academic Press, 1992, p. 41 – 75.

PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L. & GENGENBACH, B.G.. Genetic and molecular analysis of tissue-culture-derived Ac elements. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, n. 2, Berlin, p.121-129, 1991.

PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M. & PESCHKE, V.M. Do we understand somaclonal variation? In: VIIth International Congress on Plant Tissue Cell Culture. **Proceedings**. Kluwer, Dordrecht, p. 131 - 141, 1990.

PHILLIPS, R.L.; KAEPPLER, S.M. & OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures – breakdown of normal controls. **Proceedings National Academy Science USA**, Washington, v. 91, n. 12, p. 5222 - 5226.1994.

PICHET, J. A. T. DE F. **Efeito de soluções alcoólicas do ácido indol-3-butírico no enraizamento de estacas de árvores adultas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. 1997. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

PODWYSZYNSKA, M. Somaclonal variation in micropropagated tulips based on phenotype observation. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Skierniewice, v. 13, p. 109 – 122, 2005.

POLANCO, C. & RUIZ, M.L. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabdopsis thaliana* regenerated plants. **Plant Science**, Clare, v. 162, n. 5, p. 817 - 824, 2002.

PORTIS, E.; ACQUADRO, A.; COMINO, C. & LANTERI, S. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymosphism (MSAP). **Plant Science**, Clare, v. 166, p. 169 - 178, 2004.

PRADHAN, S. & ADAMS, R.L.P. Distinct CG and CNG DNA methyltransferases in *Pisum sativum*. **Plant Journal**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 471 - 481, 1995.

PRADHAN, S.; URWIN, N.A.; JENKINS, G.I. & ADAMS, R.L. Effect of CWG methylation on expression of plant genes. **Biochemical Journal**, London, v.341, parte 3, p. 473 - 476, 1999.

PRADO, M. J.; GONZALEZ, M. V.; ROMO, S. & HERRERA, M. T. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** Boston, v. 88, n. 1, p. 1 – 10, 2007.

RAKYAN, V. K. & BECK, S.: Epigenetic variation and inheritance in mammals. **Current Opinion Genetics Development**, London, v. 16, n. 6, p. 573 – 577, 2006.

RAKYAN, V. K.; CHONG, S.; CHAMP, M. E.; CUTHBERT, P. C.; MORGAN, H. D., LUU, K.V. & WHITELAW, Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. **Proceedings National Academy Science USA**, Washington, v. 100, n. 5, p. 2538 – 2543, 2003.

RAMULU, K. S.; DIJKHUIS, P.; ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. & GROOT, B. Variation in Phenotype and Chromosome Number of Plants Regenerated from Protoplasts of Dihaploid and Tetraploid Potato. **Plant Breeding** Oxford, v. 97, n. 2, p. 119 – 128, 1986.

RANGWALA, S. H.; ELUMALAI, R.; VANIER, C.; OZKAN, H.; GALBRAITH, D. W. & RICHARDS, E. J. Meiotically stable natural epialleles of Sadhu, a novel *Arabidopsis* retroposon. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 2, n. 3, p. e36. 2006.

RANI, V.; PARIDA, A. & RAINA, S.N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoids* Marsh. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 7, p. 459 - 462, 1995.

RAPP, R. A. & WENDEL, J. F. Epigenetics and plant evolution. **New Phytologist**, London, v. 168, n. 1, p. 81 – 91, 2005.

RASSOULZADEGAN, M.; GRANDJEAN, V.; GOUNON, P.; VINCENT, S.; GILLOT, I. & CUZIN, F: RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. **Nature**, London, v. 441, n. 7092, p. 469 – 474, 2006.

REDON, R.; ISHIKAWA, S.; FITCH KR, et al. (43 co-authors). Global variation in copy number in the human genome. **Nature**, London, v. 444, n. 7118, p. 444 – 454, 2006.

REIK, W.; DEAN, W. & WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, Cambridge, v. 293, n. 5532, p. 1089 – 1093, 2001.

REVERS, L. F. Variação genética na videira: explorando mutações espontâneas para gerar conhecimento e tecnologias. **Jornal da Fruta**, Lages, v. 15, n. 183, p. 10. 2007.

REYNA-LOPES, G.E.; SIMPSON, J. & RUIZ-HERRERA, J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. **Molecular General Genetics**, Berlin, v. 253, n. 6, p. 703 - 710, 1997.

RICHARDS, E. J. Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance. **Nature Review Genetics**. London, v. 7, n. 5, p. 395 – 401, 2006.

RICHARDS, E. J. Population epigenetics. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 18, n. 2, p. 221 – 226, 2008.

RIDDLE, N. C. & RICHARDS, E. J. The control of natural variation in cytosine methylation in *Arabidopsis*. **Genetics**, Austin, v. 162, n. 1, p. 355 – 363, 2002.

RIGGS, A.D. X-inactivation, differentation and DNA methylation. **Cytogenetics Cell Genetics**, Basel, v.14, n. 1, p. 9 –25, 1975.

RIVAL, A.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; MORCILLO, F; TREGEAR, J.; VERDEIL, J.L. & DUVAL, Y. Scaling-up *in vitro* clonal propagation through somatic embryogenesis: the case of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 3, n. 2, p. 74 - 83, 1996.

RIVAL, A.; JALIGOT, E.; BEULÉ, T.; VERDEIL, J.-.L. & TREGEAR, J. DNA methylation and somaclonal variation in oil palm, **Acta Horticulturae**, Leuven, (ISHS), v. 530, p. 447 - 454, 2000.

RIVAL, A.; JALIGOT, E.; LAROCHE, A.; BEULÉ, T.; OAKELEY, E.J.; VERDEIL, J.-.L. & TREGEAR, J.. Is DNA methylation underlying somaclonal variation in oil palm?. **Acta Horticulturae,** Leuven, (ISHS), v. 575, p. 47 - 59, 2002.

RIVAL, A.; TREGEAR, J.; VERDEIL, J.L.; RICHAUD, F.; BEULÉ, T.; HARTMAN, C.; RODE, A. & DUVAL, Y. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Breeding**, Berlin, v. 117, n. 1, p. 73 - 76, 1998b.

ROBERTS, R.J. PRADHAN, S.; CUMMINGS, M.; & ADAMS, R.L. Isolation, characterization and baculovirus-mediated expression of the cDNA encoding cytosine methyltransferase from *Pisum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. *26*, n. 5, p. 1214 - 1223, 1998.

RODRIGUES, P.H.V. Somaclonal variation in micropropagated *Heliconia bihai* cv. Lobster Claw I plantlets (Heliconiaceae), **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.65, n. 6, p. 681 - 684, 2008.

ROSSITER, M. C. Incidence and consequences of inherited environmental effects. **Annual Review Ecology Systematics,** Palo Alto, *v. 27, p. 451 – 476, 1996.*

ROUT, G.R.; DAS, P.; GOEL, S. & RAINA, S.N. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. **Botanical Bulletin Academy Sinica**, Nankang, v. 39, n. 1, p. 23 - 27, 1998.

ROUT, G.R.; MOHAPATRA, A. & MOHAN, J.S. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 531 – 560, 2006.

ROY, S.C. Chromosomal variations in the callus tissues of Allium tuberosum and A. cepa. **Protoplasma**, New York, v.102, n. 1-2, p.171 - 176, 1980.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.R. & BOLLAMMA, K.T. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (Musa spp.). *In Vitro* **Cellular and Development Biology-Plant**, New York, v.39, n. 6, p.551-556, 2003.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S.J.; HIGUCHI, G.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, New York, v**.** 239, n. 4839, p. 487 - 491, 1988.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. **Annual Review Plant Biology,** Palo Alto, v. 57, p. 431– 449, 2006.

SALMON, A.; AINOUCHE, M. L. & WENDEL, J. F. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in Spartina (Poaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n., p. 1163 – 1175, 2005.

SAS/STAT® 9.2. User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2008.

SCHELLENBAUM, P.; MOHLER, V,; WENZEL, G. & WALTER, B. Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (Vitis vinifera L.). **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 78, p. 1 – 10, 2008.

SHA, AH.; LIN, XH.; HUANG, J.B. & ZHANG, D.P. Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 273, n. 6, p. 484–490, 2005.

SHASTA NURSERY. **Strawberry variety discriptions.** Anderson, 2004. 13 p. Disponível em: http://www.rootstock.com/variety.html. Acesso em 30 setembro de 2005.

SHERMAN, J.D. & TALBERT, L.E. Vernalization induced changes of the DNA methylation patterns in winter wheat. **Genome**, Ottawa, v.45, p.253-260, 2002.

SHINDO, C.; LISTER, C.; CREVILLEN, P.; NORDBORG, M. & DEAN, C. Variation in the epigenetic silencing of FLC contributes to natural variation in *Arabidopsis* vernalization response. **Genes Development**, New York, v. 20, n. 22, p. 3079 – 3083, 2006.

SILVAROLLA, M.B. Plant genomic alterations due to tissue culture. **Journal Brazil Association Advanced Science**, São Paulo, v.44, p. 329-335, 1992.

SIMKOVÁ, H.. Methylation of mitochondrial DNA in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports*, v.17, p.220-224, 1998.

SINGH, A. K. & PANDEY, S. N. Genotypic variation among strawberry cultivars for shoot organogenesis. **Acta Horticulturae** Leuven, (ISHS) 662, p. 277 – 280, 2004.

SINGH, R.J..Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 72, n. 5, p. 710 - 716, 1986.

SKIRVIN, R.M.; McPHEETER, K.D.; NORTON, M. Sources and frequency of somaclonal variation. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 11, p. 1232 - 1237, 1993.

SMITH, H.A.; SWANEY, S.L.; PARKS, T.D.; WERNSMAN, E.A. & DOUGHERTY, W.G. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation and fate of nonessential RNAs. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 10, p. 1441 - 1453, 1994.

STOVER, R.H. Somaclonal variation in Grande Naine and Saba bananas in the nursery and field. In: PERSLEY, G.J.; DELANGHE, E.A. (Eds.). INTERNATIONAL WORKSHOP ON BANANA AND PLANTAIN BREEDING STRATEGIES, 1986, Cairs. **Proceedings**... Cairs, 1987. p. 136 - 139.

SUN, Z.X.; ZHAO, C.Z.; ZHENG, K.L.; QI, X.F. & FU, Y.P. Somaclonal genetics in rice (*Oryza sativa* L.) **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 67, p. 67 - 73, 1983.

SWEDLUND, B.D. & VASIL, I.K.. Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* L. K. Schum. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 69, p. 575 - 581, 1985.

TAKEDA, S. & PASZKOWSKI, J. DNA methylation and epigenetic inheritance during plant gametogenesis. **Chromosoma**, Wein, v. 115, n. 1, p. 27 – 35, 2006.

TANURDZIC, M.; VAUGHN, M.W.; JIANG, H.; LEE, T.J.; SLOTKIN, R.K.; SOSINSKI, B.; THOMPSON, W.F.; DOERGE, R.W. & MARTIENSSEN, R.A. Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. **Public Library of Science Biology**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. 2880 – 2895, 2008.

THAO, N.T.P.; OZAKI, Y. & OKUBO, H. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental Alocasia. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 73, n. 3, p. 285 – 289, 2003.

TODOROVISKA, E.; TRIFONOVA, A.; PETROVA, M.; VITONOVA, Z. & MARINOVA, E. Agronomic performance and molecular assessment of tissue culture derived barley lines. **Plant Breeding**, Berlin, v. 116, n. 6, p. 511 - 517, 1997.

TOKUHARA, K. Somaclonal variation of flowers in micropropagated plants through flower stalk bud culture. In: Ichihashi S.; Nagata H. (eds) **Proceedings of the Nagoya International Orchid Show 92**. Nagoyapp, Japan, p. 317 – 319, 1992.

TREGEAR, J.W.; MORCILLO, F.; RICHAUD, F.; GERGER, A.; SINGH, R.; CHEAH, S.C.; HARTMANN, C.; RIVAL, A. & DUVAL, Y. Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 373, p. 1387 - 1396, 2002.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA. UC Aromas strawberry cultivar. 2005a. 2 p. Disponível em: <http://www.ucop.edu/ott/strawberry/Aromascultivar.htm> Acesso em 24 junho 2005.

VAILLANT, I. & PASZKOWSKI, J. Role of histone and DNA methylation in gene regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 528 - 533, 2007.

VALLEDOR, L.; HASBUN, R.; MEIJON, M.;RODRIGUEZ ,J.L.; SANTAMARIA, E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M.; FEITO, I.; FRAGA, M.F.; CANAL, M.J. & RODRIGUEZ, R. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Boston, v. 91, n. 2, p. 75 – 86, 2007.

VAUGHN, M. W.; TANURDZIC, M.; LIPPMAN, Z.; JIANG, H.; CARRASQUILLO, R. & RABINOWICZ, P. D. et al.). Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, n. 7, e174. 2007.

VERHOEVEN, K.J.F.; VAN DIJK, P.J. & BIERE, A. Changes in genomic methylation patterns during the formation of triploid asexual dandelion lineages. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 315–324, 2010.

von ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKOV, P.; DYACHOK, L. & FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, v.69, n. 3, p.233-249, 2002.

VONGS, A.; KAKUTANI, T.; MARTIENSSEN, R.A. & RICHARDS, E.J. *Arabdopsis thaliana* DNA methylation mutants. **Science,** Cambridge, v.260, n. 5116, p.1926-1928, 1993.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; RIJANS, M. VAN DER LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, L.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. & ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407 - 4414, 1995.

WANG, W.; ZHAO, X.; ZHUANG, G.; WANG S. & CHEN, F. Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Boston, v. 95, n. 1, p. 57– 67, 2008.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n. 24, p. 7213 - 7218, 1990.

WENDLING, I.; PAIVA, H. N. & GONÇALVES, W. Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais. Viçosa, MG: **Aprenda Fácil**, v. 3, 223 p. 2005.

WEST-EBERHARD, M. J. **Developmental Plasticity and Evolution**. New York: Oxford University Press, 2003.

WHEELER, V.A.; EVANS, N.E.; FOULGER, D.; WEBB, K. J.; KARP, A.; FRANKLIN, J. & BRIGHT, S.W. J. Shoot formation from explant cultures of fourteen potato cultivars and studies of cytology and morphology of regenerated plants. **Annals Botany**, Oxford, v. 55, p. 309 - 320, 1985.

WHITELAW, N. C. & WHITELAW, E. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 15, n. 2 (Supp.), p. R131 – R137, 2006.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIC, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n. 22, p. 6531 - 6535, 1990.

WOLFFE, A.P. & MATZKE, M. A. Epigenetics: regulation through repression. **Science**, Cambridge, v. 286, n. 5439, p. 481 – 486, 1999.

WOODWARD, A.W. & BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany,** Oxford, v. 95, n. 5, p. 707–735, 2005.

XIONG, L.Z.; XU, C.G.; SAGHAI MAROOF, M.A. & ZHANG, Q. Patterns of citosyne methylation in an elite rice hybrids and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. **Molecular General Genetics,** Berlin, v. 261, n. 3, p. 439 - 446, 1999.

XU, M.; LI, X. & KORBAN, S. AFLP-Based Detection of DNA Methylation. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v.18, n. 4, p.361-368, 2000.

XU, M.; LI, X. & KORBAN, S. DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). **Theoretical Applied Genetics,** Berlin, v.109, n. 5, p. 899 - 910, 2004.

YODER, J.A.; WALSH, C.P. & BESTOR, T.H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends in Genetic**, Amsterdan, v.13, n. 8, p. 335 - 340, 1997.

YOUNG, W.P; SCHUPP, J.M. & KEIM, P. DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, n. 5, p.785-790, 1999.

ZABEAU, M. **Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting**. European Patent Application Nº 0534858, 1993.

ZENG, F.; ZHANG, X. ; ZHU, L.; TU, L.; GUO, X. & NIE, Y. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Plant Molecular Biology,** Boston, v.60, n. 2, p.167–183, 2006.

ZHANG, M.S.; XU, C.M.; YAN, H.Y.; ZHAO, N.; VON WETTSTEIN, D. & LIU, B. Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F1 hybrids of sorghum pure lines are accompanied by increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases. **Plant Journal**, Oxford, v. 57, p.666-679, 2009.

ZHU, B.; ZHENG, Y.; HESS, D.; ANGLIKER, H.; SCWARS, S.; SIEGMANN, M.; THITY, S. & JOST, J.P. 5-Methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA,** Washington, v.97, p.5135-5139, 2000b.

ZILBERMAN, D.; GEHRING,; M.; TRAN, R. K.; BALLINGER, T. & HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 1, p. 61 – 69, 2007.

ZLUVOVA, J.; JANOUSEK, B. & VYSKOT, B. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, n. 365, p.2265-2273, 2001.

ZUCCHI, M.I.; ARIZONO, H.; MORAIS, V.A.; FUNGARO, M.H.P. & VIEIRA, M.L.C. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 91 - 96, 2002.

ZUFALL, R. A.; MCGRATH, C. L.; MUSE, S. V. & KATZ, L. A. Genome architecture drives protein evolution in ciliates. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 23, n. 9, p. 1681 – 1687, 2006.

SUPORTE FINANCEIRO – Epagri, UFSC, FAPESC, Próprios.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo