

# MODELOS FUNCIONAIS DO DESENVOLVIMENTO VEGETAL<sup>1</sup>

Renato Delmondez de Castro<sup>2</sup>

Wagner Tompson Estanislau<sup>3</sup>

Henk Hilhorst<sup>4</sup>

Niere Fernanda de Almeida Souza<sup>5</sup>

Paulo Maurício Santos de Azevedo<sup>6</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

Sementes constituem-se em grande importância econômica no contexto do mercado mundial de ‘commodities’ (produtos de exportação), com uma posição cada vez mais relevante na cadeia de alimentação, produção e comercialização vegetal, em função do melhoramento vegetal e da evolução da biologia molecular e das biotecnologias. Contudo, ainda é pouco o que se sabe em geral sobre os fatores que atuam durante a floração e formação das sementes das diferentes espécies. Essas fases do desenvolvimento são essenciais no que diz respeito ao estabelecimento de todas as características da semente madura e do rendimento final da lavoura. Portanto, torna-se fundamental um melhor entendimento dos mecanismos moleculares e programas regulatórios determinantes da qualidade da semente como propágulo e como produto para alimentação. Além disto, é relevante considerar que a semente é carreadora de todas as características genéticas da planta e do produto do melhoramento vegetal, constituindo a principal forma de sobrevivência da maioria das espécies de plantas.

O estabelecimento da ‘era genômica’ vem transformando os estudos de expressão de genes e proteínas em biologia de plantas e promete revolucionar a forma com que são estudados as células e os processos celulares. Essa transformação acontece em função de biotecnologias de alto desempenho hoje existentes em transcriptomas (‘chips de DNA’) e proteomas (eletroforese bidimensional e espectrometria de massa). Estudos nestes níveis apresentam grande potencial e certamente contribuirão para o desenvolvimento da produção vegetal como um todo. Contudo, o sucesso nesses tipos de estudos depende não somente do uso adequado das tecnologias pelo biólogo, mas também do posicionamento preciso do evento considerado ao longo do desenvolvimento.

O estabelecimento de ‘Modelos Funcionais do Desenvolvimento Vegetal’ constitui processo essencial neste contexto. O presente trabalho teve como objetivo a elaboração de um Modelo Funcional para o desenvolvimento de frutos e sementes, tendo em vista a sua utilização como ferramenta fundamental na caracterização do processo de organogênese, e na identificação precisa dos diferentes estádios do desenvolvimento e ocorrência de eventos fisiológicos, contribuindo desta forma para o sucesso nas análises de expressão de genes e proteínas que venham a ser consideradas em etapas subsequentes de estudos funcionais em nível genômico. Neste contexto, é apresentado um Modelo Funcional para o desenvolvimento de frutos e sementes de café (*Coffea arabica* L.), espécie vegetal que foi escolhida como ‘sistema modelo’, por constituir uma ‘commodity’ de grande importância econômica nacional e internacional. O Modelo foi estabelecido através de uma

---

<sup>1</sup> O trabalho foi desenvolvido e mantém-se em desenvolvimento em sua Fase-2 em colaboração entre o Laboratório de Estudos em Meio Ambiente da UCSal, a Universidade Federal de Lavras (UFLA, Lavras-MG) e a Wageningen University and Research Center (WUR, Holanda), contando com apoio financeiro do CNPq. Orientação do Doutor Renato Delmondez de Castro.

<sup>2</sup> Pesquisador, Doutor, do Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA da Universidade Católica do Salvador – UCSal.

<sup>3</sup> Pesquisador, Mestre, da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

<sup>4</sup> Pesquisador, Doutor, da Wageningen University and Research Center – WUR, Holanda

<sup>5</sup> Bióloga, Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA da Universidade Católica do Salvador – UCSal.

<sup>6</sup> Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Católica do Salvador – UCSal.

análise funcional multidisciplinar de eventos do ciclo celular e da organogênese em relação aos eventos fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvimento do fruto e da semente, tendo como referência o número de 'dias após a polinização' (DAP), o tamanho e a cor do fruto de cafeeiro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo do desenvolvimento foi feito de forma multidisciplinar, aplicando-se diversas técnicas oriundas de disciplinas distintas, de modo a entender o processo de desenvolvimento a partir de vários ângulos, tendo como ponto referencial eventos relacionados ao ciclo celular e organogênese, analisados em relação aos processos de diferenciação dos tecidos por divisão celular e de crescimento por expansão celular. Foram utilizadas técnicas de análises quantitativas e qualitativas.

Nesse contexto, foram utilizadas microscopias ótica e eletrônica de varredura nas análises qualitativas a nível citológico e estrutural dos diferentes tecidos e órgãos do fruto e sementes. Tecidos foram previamente preparados por meio de protocolos específicos.

Também foi utilizada a técnica quantitativa de citometria de fluxo para análise do processo de síntese e duplicação de DNA, com verificação do número de células contendo DNA duplicado, assim como verificação da ploidia do DNA. Neste procedimento, núcleos são isolados de células vegetais em solução tampão específica, a qual adiciona-se o corante fluorescente iodeto de propídio (fluorescência no espectro de comprimento de onda da cor vermelha). Este corante liga-se especificamente com o DNA nuclear. Desta forma, tubos contendo a suspensão de núcleos celulares são acoplados ao aparelho de citometria de fluxo que analisa o número de núcleos e a ploidia do DNA por meio de um feixe de *laser* que identifica o comprimento de onda específico do iodeto de propídio (vermelho). O resultado é emitido no computador na forma de histogramas, por meio de um *software* específico para este tipo de análise.

O processo de acúmulo de tubulinas, proteínas que são essenciais na formação de microtúbulos e nos processos de expansão e divisão celular, foi analisado pelas técnicas de eletroforese de proteínas e detecção imunológica por meio de "western blotting", usando-se anticorpos monoclonais específicos contra tubulinas.

A análise citológica das configurações do citoesqueleto microtubular foi feita por meio de microscopia de fluorescência imunológica, também com uso de anticorpos monoclonais específicos contra tubulinas.

## 3. RESULTADOS

1) Microscopia eletrônica de varredura: as análises feitas por meio de microscopia eletrônica de varredura permitem a identificação precisa dos diferentes tecidos em ovários de flores não fecundados, que se desenvolvem para a formação do fruto, sendo possível identificar o tecido nucelar ou perisperma, os integumentos, e o pericarpo.

2) Microscopia Ótica: em complementação à microscopia eletrônica de varredura, a análise por meio de microscopia ótica permitiu verificar o crescimento inicial do fruto, após a fertilização do óvulo, a partir do crescimento do tecido nucelar entremeado aos integumentos, sendo possível verificar também o posicionamento do óvulo fertilizado.

3) Citometria de fluxo: os resultados da citometria de fluxo são emitidos na forma de histogramas, mostrando a ploidia das células dos diferentes tecidos, além do número de células com DNA duplicado, a partir de células diplóides 2C e triplóides 3C. Neste contexto, foi possível obter o número estimado de células com DNA duplicado de tecidos diplóide 4C (nucela e integumentos no fruto e embrião na semente), e de células de tecidos triplóide 6C (endosperma na semente). A

análise indicou que há uma taxa elevada de síntese e duplicação de DNA após a fecundação (polinização), que se torna decrescente ao longo do desenvolvimento até os 150 dias após a polinização, de forma que não se observa síntese de DNA durante a subsequente fase de maturação.

4) Eletroforese e "western blotting": a separação de proteínas por meio de eletroforese em primeira dimensão em géis de poliacrilamida com SDS (agente desnaturador de proteínas) permitiu a confecção de "western blots" para a identificação imunológica específica para a  $\beta$ -tubulina, que juntamente com o polipeptídeo  $\alpha$ -tubulina formam os microtúbulos formadores do esqueleto celular ou citoesqueleto. A análise imunológica do "western blot" permitiu verificar que há um acúmulo decrescente de tubulina nas células, tanto do tecido nucelar do fruto, como nos tecidos do embrião e do endosperma das sementes, que se forma a partir do zigoto, oriundo da fertilização do óvulo.

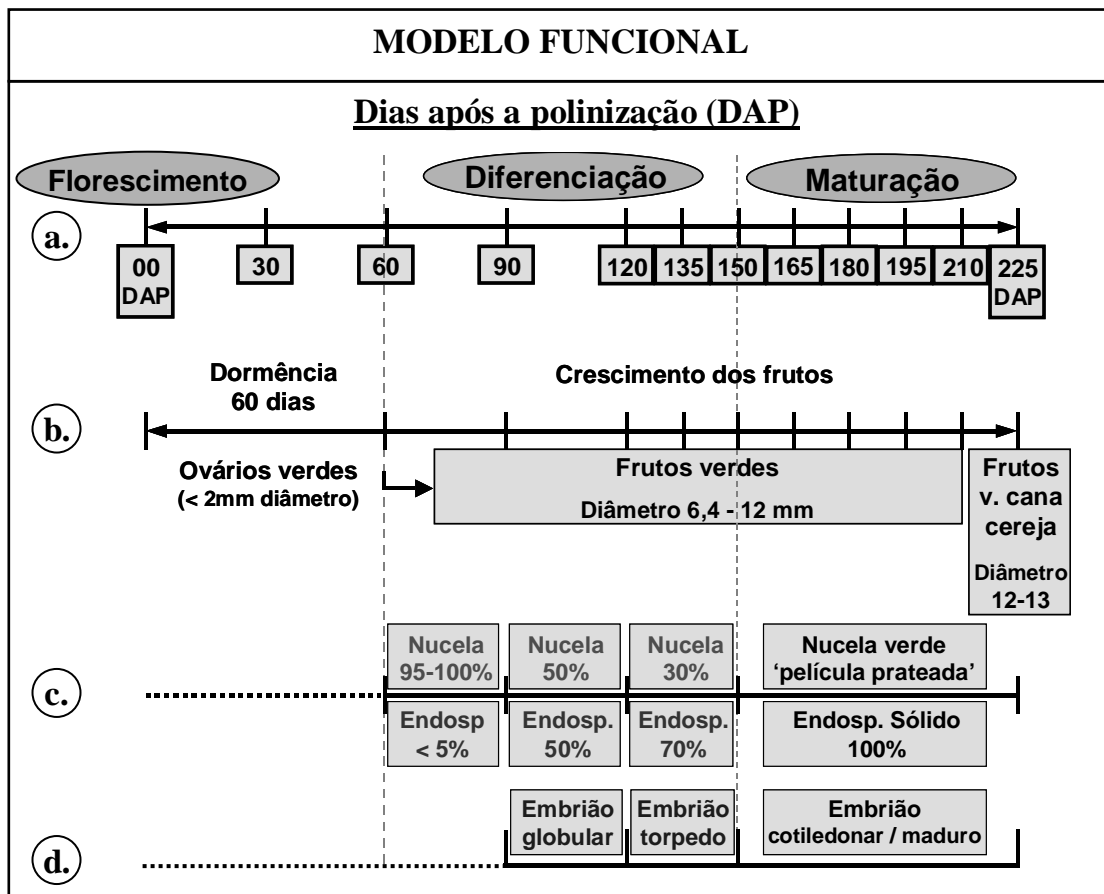
5) Microscopia de fluorescência imunológica (imuno-fluorescência): a análise imunológica por meio de microscopia de fluorescência permitiu a visualização de  $\beta$ -tubulina na formação do citoesqueleto microtubular. Foi possível verificar que a semente contém, aos 120 dias após a polinização, uma abundante rede de citoesqueleto microtubular mitótico (células em divisão), assim como de citoesqueleto cortical, tanto em tecidos do embrião como em tecidos do endosperma. Isto indica que o desenvolvimento inicial da semente se dá por uma atividade intensa do ciclo celular, resultando no crescimento por divisão e expansão celular. Foi possível identificar inúmeras células em fases de prófase, pré-profase, metáfase, anáfase, telófase e fragmoplasma (fase final do ciclo celular em células vegetais, que não ocorre em células animais). A partir de 150 dias após a polinização, é possível observar somente as configurações de microtúbulos corticais, que são degradados junto com a tubulina no decorrer da fase de maturação, tornando-se inexistente ao final do processo de dessecação e quiescência (similar a dormência) da semente.

6) Resultados integrados (análise multidisciplinar): a relação entre síntese de DNA, acúmulo de  $\beta$ -tubulina e configurações do citoesqueleto microtubular permitiu definir as diferentes fases do desenvolvimento. A primeira fase do desenvolvimento é chamada de **fase de diferenciação** dos tecidos do fruto e da semente (embriogênese). Esta fase foi identificada como acontecendo no período entre o florescimento (polinização) e 150 dias após a polinização. Esta fase foi marcada pela ocorrência de uma atividade intensa de síntese de DNA, assim como de acúmulo de tubulina e de configurações mitóticas (células em divisão) do citoesqueleto microtubular nos estágios iniciais após a polinização. No entanto, essas atividades decrescem ao longo do desenvolvimento até que se completem os 150 dias após a polinização. Ainda nesta fase, as análises estruturais por microscopia eletrônica, por microscopia ótica, e pelas análises de ploidia por citometria de fluxo, mostraram que o desenvolvimento inicial do fruto deve-se ao crescimento do tecido nucelar materno (planta mãe) e diplóide, que em seguida é parcialmente degradado, cedendo espaço ao desenvolvimento do tecido de endosperma triplóide e do embrião diplóide, oriundos do processo de fertilização, por meio da fecundação dos gameta masculino com o gameta feminino. A outra fase do desenvolvimento é chamada fase de **maturação**, onde predominam eventos complementares de morfogênese através de crescimento por expansão celular, já que não se observa citoesqueleto mitótico, existindo somente citoesqueleto cortical, e acúmulo crescente de matéria seca. Com o avanço da maturação e dessecação do fruto, observa-se a degradação completa do citoesqueleto cortical e tubulina, levando a inativação dos eventos do ciclo celular e quiescência do embrião e da semente.

#### 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foi possível, por meio do presente estudo, esclarecer a origem dos diferentes tecidos, definir com precisão a organogênese, as diferentes fases do desenvolvimento, a ocorrência de eventos fisiológicos específicos e a anatomia da semente. Fica assim estabelecido um modelo funcional que descreve a complexidade do desenvolvimento do fruto e semente de cafeeiro, compreendendo um

pré-requisito fundamental em estudos de desenvolvimento e implementação de análises de expressão gênica em escala genômica (Figura 1).



**Figura 1 - Modelo funcional de desenvolvimento do fruto e sementes de cafeeiro (*C. arabica*).**

- a.** Desenvolvimento em 'dias aos a polinização', com identificação das fases de diferenciação dos tecidos e maturação da semente.
- b.** Desenvolvimento em função do tamanho e coloração dos frutos.
- c.** Diferenciação e organogênese do tecido nucelar e endosperma.
- d.** Diferenciação e organogênese do embrião.

## 5. REFERÊNCIAS

CAMARGO, R. DE; MENDES, A.N.G.; FRAGA, A.C. e GUIMARÃES, R.J. Efeito da temperatura e tempo de secagem sobre a germinação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 22. **Anais**. Águas de Lindóia: MAARA/PROCAFÉ, 1996. p. 57.

CHLAN, C.A. e DURE, L.I. Plant seed embryogenesis as a tool for molecular biology. *Mol. Cell Biochem.* 55: 1983, 5-15.

COMAI, L. e HARADA, J.J. Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, v.87, 1990, p.2671-2674.

DE CASTRO, R.D. A Functional Analysis of Cell Cycle Events in Developing and Germinating Tomato Seeds. 1998. 110 p. (Tese de Doutorado). Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

DE CASTRO, R.D. e HILHORST, H.W.M. Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. v.12, 2000, p.105-136.

DHAND, R. Functional genomics. *Nature*. v.405, 2000, p.819.

DURE, L.I. Embryogenesis and gene expression during seed formation. *Oxford Survey on Plant Molecular and Cell Biology*, v.2, 1985, p.179-197.

KNIGHT, J. When the chips are down. *Nature*. v.410, 2001, p.860-861.

LOCKART, D.J. e WINZELER, E.A. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*. v.405, 2000, p.827-836.

PANDEY, A. e MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. v.405, 2000, p.837-846.