

PRISCILA OLIVEIRA SILVA

**DESENVOLVIMENTO FOLIAR EM *Passiflora edulis* SIMS.:
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO, DA EXPRESSÃO GÊNICA
E DO PAPEL DE AÇÚCARES NA MODULAÇÃO DAS VIAS miR156 E miR172**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586d
2017
Silva, Priscila Oliveira, 1986-
Desenvolvimento foliar em *Passiflora edulis* Sims :
caracterização do perfil metabólico, da expressão gênica e
do papel de açúcares na modulação das vias miR156 e miR172 /
Priscila Oliveira Silva. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 71f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Passiflora edulis* Sims. 2. Maracujá. 3. Folhas -
Anatomia. 4. Morfogênese. 5. Plantas - Metabolismo. 6. Açúcar.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.
II. Título.

CDD 22 ed. 634.425

PRISCILA OLIVEIRA SILVA

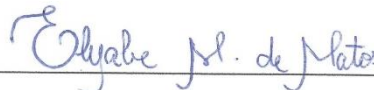
**DESENVOLVIMENTO FOLIAR EM *Passiflora edulis* SIMS.:
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO, DA EXPRESSÃO GÊNICA
E DO PAPEL DE AÇÚCARES NA MODULAÇÃO DAS VIAS miR156 E miR172**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de março de 2017.



Andréa Dias Koehler
(Coorientadora)



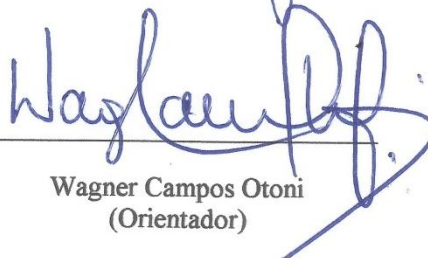
Elyabe Monteiro de Matos



Dimas Mendes Ribeiro



Fabio Tebaldi Silveira Nogueira



Wagner Campos Otoni
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos alcançadas;

Aos meus queridos pais, Sônia e José, pelo carinho e incentivo incondicional;

Ao meu marido, pelo amor, carinho, dedicação, paciência e companheirismo;

Aos meus irmãos e sobrinhos, que mesmo distantes, transmitiram paz ao meu coração;

Aos meus familiares e amigos que torceram para que esta conquista fosse alcançada;

As minhas queridas amigas Lays, Patrícia, Itaina e Luana, minha segunda família, pelo companheirismo durante esses 10 anos de convívio que me proporcionaram momentos incríveis;

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de cursar o doutorado;

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais no BIOAGRO, Laboratório de Anatomia Vegetal; Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol) e Núcleo de Microscopia e Microanálise por todo suporte para execução da tese;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que me concedeu recursos financeiros para realização desse curso;

Ao professor Wagner Campos Otoni pelo incentivo, compreensão, confiança, amizade e pelos conhecimentos compartilhados;

Ao professor Dimas Mendes Ribeiro, Dr. Diego Silva Batista e a Dra. Andréa Dias Koehler pela orientação, conhecimento transmitido e amizade;

Aos professores, Dimas M. Ribeiro, Fábio Tebaldi S. Nogueira, Dr. Elyabe M. de Matos e a Dra. Andréa D. Koehler por aceitarem compor a banca examinadora;

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT) pela amizade. Recebi de vocês, em muitos momentos, a força, a alegria e a coragem que eu precisava. Foi um crescimento conjunto;

Aos colegas, professores e funcionários da Universidade Federal de Viçosa e do Departamento de Biologia Vegetal.

Meus agradecimentos!

BIOGRAFIA DO AUTOR

PRISCILA OLIVEIRA SILVA, filha de José de Fátima Silva e Sônia Mamédio de Oliveira, nasceu em Montes Claros, Estado de Minas Gerais, no dia 17 de abril de 1986. No ano de 2007 ingressou na Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), em Montes Claros, MG, graduando-se em Ciências Biológicas (Bacharelado) em janeiro de 2011. Ingressou, em março de 2011, no mestrado no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, obtendo o título de *Magister Scientiae* em 27 de fevereiro de 2013. Neste mesmo ano iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal na UFV, submetendo-se à defesa de tese no dia 27 de março de 2017.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO I - Desenvolvimento foliar de <i>Passiflora edulis</i> ao longo da transição de fase vegetativa juvenil-adulta: uma abordagem metabólica e molecular	
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Material vegetal e condução do experimento	13
2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA via ‘ <i>pulsed-stem loop</i> ’ RT-PCR	13
2.3 Análise de RT-qPCR	14
2.4 Determinação do conteúdo de açúcares	14
2.5 Determinação do conteúdo de amido	14
2.6 Perfil metabólico	15
3. RESULTADOS	16
3.1 Expressão de miR156/ <i>SPL9</i> e miR172 ao longo do desenvolvimento da vegetativo juvenil-adulto	16
3.2 Níveis de sacarose, glicose, frutose e amido	18
3.3 Perfil metabólico de <i>P. edulis</i> ao longo do desenvolvimento vegetativo juvenil-adulto	18
4. DISCUSSÃO	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
6. MATERIAL SUPLEMENTAR	33
CAPÍTULO II - Açúcares promovem traços heteroblásticos em folhas na organogênese <i>in vitro</i> de <i>Passiflora edulis</i> Sims. mediante a modulação da via miR156/ <i>SPL</i>	
RESUMO	35
ABSTRACT	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Material vegetal e condução do experimento	40

2.2 Efeito da sacarose, glicose e frutose na modulação da morfologia foliar durante o processo de heteroblastia <i>in vitro</i> -----	40
2.3 Influência do tiosulfato de prata (STS) e aminoetoxivinilglicina (AVG) na eficiência regenerativa -----	40
2.4 Condições de cultivo <i>in vitro</i> -----	41
2.5 Extração de RNA e síntese de cDNA via ‘ <i>pulsed-stem loop</i> ’ RT-PCR-----	41
2.6 Análise de RT-qPCR -----	41
2.7 Amplificação e clonagem da sequência codificadora do gene <i>SPL9</i> --	42
2.8 Obtenção da sequência completa do gene <i>SPL9</i> por 5’ e 3’ RACE (<i>Rapid Amplification cDNA Ends</i>) -----	42
2.9 Análise de sequências e inferência filogenética do gene <i>SPL9</i> de <i>P. edulis</i> -----	43
2.10 Caracterização do padrão de expressão do gene <i>SPL9</i> por hibridização <i>in situ</i> -----	43
2.11 Determinação do conteúdo de açúcares -----	44
2.12 Determinação do conteúdo de amido -----	45
3. RESULTADOS -----	46
3.1 Efeito do fornecimento de açúcares na manutenção ou perda das características juvenis de <i>P. edulis in vitro</i> -----	46
3.2 Efeito dos diferentes tipos de explantes e fontes de carbono no perfil de expressão gênica de miR156, <i>SPL9</i> e miR172 -----	49
3.3 Clonagem de <i>SPL9</i> de <i>P. edulis</i> (<i>PeSPL9</i>) e análise filogenética ----	51
3.4 Distribuição espacial de <i>PeSPL9</i> durante a formação de primórdios foliares de <i>P. edulis</i> via hibridização <i>in situ</i> -----	54
3.5 Quantificação de glicose, frutose, sacarose e amido nos diferentes explantes crescidos em concentrações distadas de açúcares -----	54
4. DISCUSSÃO -----	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	64
6. MATERIAL SUPLEMENTAR -----	70
7. CONCLUSÕES GERAIS -----	71

RESUMO

SILVA, Priscila Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Desenvolvimento foliar em *Passiflora edulis* Sims.: Caracterização do perfil metabólico, da expressão gênica e do papel de açúcares na modulação das vias miR156 e miR172.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadores: Andréa Dias Koehler e Diego Silva Batista

No decurso do desenvolvimento pós-embriônico, em algumas espécies vegetais a transição da fase juvenil para a adulta é marcada por alterações na morfologia e anatomia das folhas (heteroblastia) e pela aquisição de competência reprodutiva. Recentemente, considerável progresso tem sido obtido na caracterização dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos nesses processos. Tais avanços demonstram que microRNAs, com destaque para o miR156 bem como seu gene-alvo (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE PROTEIN-9, SPL9*), e miR172 modulam as alterações na morfologia da folha e controlam a transição da fase vegetativa juvenil para adulta em plantas. Estudos prévios têm demonstrado que o miR156 é altamente expresso no início do desenvolvimento vegetativo de *Arabidopsis thaliana* e seus níveis de expressão diminuem com a idade enquanto o miR172 e os fatores de transcrição *SPLs* envolvidos na expressão de características adultas apresentam um padrão oposto, aumentando à medida que as folhas passam da fase juvenil para a adulta. Contudo, como os níveis do miR156 são regulados ao longo do desenvolvimento vegetativo ainda não foi completamente esclarecido, embora existam evidências de que açúcares sejam os sinais que desencadeiam a transição vegetativa juvenil para a adulta, mediante a regulação dos níveis de miR156. Portanto, visto a importância dos miRNAs no metabolismo vegetal e enfatizando seu papel no controle de transição de fase vegetativa foliar juvenil para adulta, adotou-se como espécie-alvo *Passiflora edulis* Sims, que possui padrões morfológicos marcantes de transição de fase juvenil-adulto das folhas. Em *P. edulis* os estágios de desenvolvimento juvenil-adulto são bem caracterizados, de modo que as folhas jovens são monolobadas com lâmina foliar pequena e margem lisa, enquanto as adultas são trilobadas com lâmina foliar maior e margem serrilhada. Ademais, as mudanças na forma e no tamanho da folha juvenil *versus* adulta ocorrem de maneira gradativa ao longo do desenvolvimento vegetativo, sendo um modelo interessante para estudo do programa genético que controla o processo de heteroblastia. Assim, investigou-se o envolvimento da via regulatória miR156/*SPL* e miR172 e o papel dos açúcares na modulação dos processos heteroblásticos ao longo do desenvolvimento vegetativo de *P.*

edulis. Os resultados demonstraram que, ao longo do desenvolvimento vegetativo de *P. edulis*, os níveis de expressão do miR156 tenderam ao declínio gradativo com o aumento da maturidade das folhas, enquanto o miR172 apresentou padrão oposto. Os níveis de expressão do miR172 aumentaram significativamente a partir da décima folha, a qual reflete a transição de fase vegetativa da espécie. Ainda, as análises de determinação de metabólitos primários mostram correlação positiva entre o aumento dos conteúdos de açúcares e os níveis de miR172 com as alterações na morfologia da folha durante a transição de fase juvenil para a adulta. Adicionalmente, as investigações *in vitro* evidenciaram que a incorporação de fontes de açúcares ao meio de cultivo de explantes cotiledonares, em especial a glicose, induzem traços heteroblásticos durante a neoformação de estruturas caulinares na organogênese *in vitro* em *P. edulis*, mediante a modulação da via miR156/*SPL*. Tais resultados são corroborados pelos padrões de expressão gênica obtidos, sendo demonstrado uma robusta ligação entre a expressão de miR156 e miR172 com o processo heteroblástico *in vitro*. De forma que houve acúmulo significativo do miR156 nos tratamentos com maior emissão de brotos e folhas juvenis, enquanto que miR172 apresentou um padrão oposto, com níveis mais expressivos nos tratamentos onde o padrão morfogênico das folhas foi alterado. Ademais, a hibridização *in situ* mostrou uma distribuição espacial de transcritos de *PeSPL9* no meristema apical caulinar e nos primórdios foliares em expansão, sugerindo o envolvimento de *SPL9* na morfogênese foliar durante o desenvolvimento vegetativo de *P. edulis*. Portanto, os resultados aqui apresentados ampliam as bases do conhecimento acerca do papel do metabolismo do carbono, principalmente da glicose, na modulação da via de miR156 e miR172 durante a foligênese em *P. edulis*, e abre novas perspectivas da participação de açúcares na modulação da via dos microRNA, a serem investigadas em trabalhos futuros.

ABSTRACT

SILVA, Priscila Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Leaf development in *Passiflora edulis* Sims.: Characterization of the metabolic profiling, gene expression and the role of sugars in modulating the miR156 and miR172 via.** Advisor: Wagner Campos Otoni. Co-advisors: Andréa Dias Koehler and Diego Silva Batista

The transition of juvenile-to-adult phase in some plant species is highlighted by changes on leaf morphological and anatomical aspects (heteroblasty) resuming the gain of the reproductive competency acquisition. Recently, the ever growing characterization of genetic and molecular mechanisms has shed light towards unraveling that process. Such approaches demonstrated that microRNAs, in especial miR156 as well as its target gene of *SPL* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE PROTEIN-9*, *SPL9*), and miR172 regulate the changes on leaf morphology and control the transition of juvenile-to-adult vegetative phase. Previous studies demonstrated that miR156 is highly expressed in the initial stages of vegetative development in *A. thaliana*. Conversely, miR172 and *SPL* transcription factors related to adult characteristics increase their expression pattern levels in older leaves. However, how miR156 levels are regulated along vegetative development are yet fully clarified, although compelling evidences suggest that sugars are able to trigger the signaling pathway, leading to juvenile-to-adult phase transition by modulating the miR156 transcript levels. The importance of microRNAs into plant metabolism, as highlighted above, emphasises its role on the vegetative juvenile-to-adult phase. Therefore, we used *Passiflora edulis* Sims as a suitable species to investigate the involvement of regulatory miR156/*SPL* and miR172 via as well as on the role of sugars in modulating heteroblastic process along vegetative development of this species. Our results showed that throughout vegetative development of *P. edulis*, the transcripts levels of miR156 presented a slight reduction associated with leaf maturity, whereas miR172 showed opposite pattern. The miR172 expression level increased significantly from the tenth leaf which corresponds with vegetative phase transition of this species. Furthermore, the measurement of primary metabolites had a straightforward correlation between increasing of the sugar content and miR172 transcript levels with changes on the leaf morphology during transition of juvenile-to-adult phase. Additionally, the supplementation of the culture medium with different sugars, in special glucose, induced heteroblastic traits during *in vitro* shoot neoformation reponses in cotyledonary explants of *P. edulis*, as mediated by the miR156/*SPL* via. These results are corroborated by the

existing balance between miR156 and miR172 related to their gene expression patterns, which revealed a robust interconnection of both genes with heteroblastic process *in vitro*. Notably, there was a significant increase of the miR156 in treatments with higher number of shoot-buds and juvenile leaves. However, miR172 presented an opposite behavior with higher transcript levels in the treatments with morphogenetic patterns associated to adult leaf traces. Apart from *in situ* hybridization showed a spatial distribution of the *PeSPL9* in shoot apex and leaf primordia suggesting a role of *SPL9* in leaf morphogenesis during vegetative development of *P. edulis*. Together, the results provide further knowledge on the role of carbon metabolism, mainly played by glucose, on the modulation of the miR156 and miR172 via along leaf neoformation of *P. edulis*, and open new insights of the role of sugars in modulating microRNA which require further investigation in the future works.

INTRODUÇÃO GERAL

Durante o ciclo de vida, as plantas passam por sucessões de fases de desenvolvimento, adotando diferentes mecanismos genéticos e moleculares que as provêm alternativas de expressarem sua plasticidade e, como consequência, de se ajustarem morfo-fisiologicamente ao ambiente (Yu et al., 2015; Fouracre e Poethig, 2016). Após a germinação das sementes, uma pequena população de células pluripotentes presentes no meristema apical caulinar (SAM) gera um contingente de células derivadas que integram eventos morfogênicos na geração de unidades modulares fitoméricas (Verdeil et al., 2007; Byrne, 2012; Tsukaya, 2013). Marcadamente, gradientes de concentração de auxina estabelecem locais de iniciação de primórdios foliares, a partir de flancos do SAM, dando início à fase vegetativa juvenil (Capron et al., 2009; Lau et al., 2012; Tsukaya, 2013). Em algumas espécies de plantas a transição da fase vegetativa juvenil para adulta é acompanhada por mudanças na morfologia e anatomia da folha, as quais refletem a mudança da fase juvenil para a fase adulta, durante o período vegetativo – heteroblastia (Canales et al., 2010; Cutri et al., 2013; Yu et al., 2015). A transição entre estas fases é dependente de programas genéticos e moleculares, os quais podem ser desencadeados e modulados por estímulos ambientais e endógenos que, por vezes, afetam a expressão das mesmas características heteroblásticas (Huijser e Schmid, 2011).

Recentemente, notável progresso tem sido obtido na caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na heteroblastia (Tsukaya, 2013; Wang et al., 2015; Xu et al., 2016; Nguyen et al., 2017). Tais avanços demonstram que miRNAs e seus genes-alvo desempenham papéis associados à atividade do SAM, ao desenvolvimento de primórdios foliares, ao estabelecimento da dorsiventralidade foliar e à transição da fase vegetativo-reprodutivo da planta (Mallory e Vaucheret, 2006; Nogueira et al., 2007; Kidner e Timmermans, 2010; Nonogaki, 2010; Yu et al., 2013; Fouracre e Poethig, 2016).

Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codantes endógenos de 20 - 25 nucleotídeos que regulam a expressão de seus genes alvo ao nível pós-transcricional, por meio de interação RNA-RNA (Jones et al., 2006). Em plantas, os genes miRNA são expressos frequentemente de forma temporal e espacial e, sua biogênese inicia no núcleo pela transcrição dos genes *MIR* via RNA Polimerase II (Pol II), gerando um transcrito primário (pri-miRNA). O pri-miRNA é um RNA longo fita-simples que possui um cap 7-metilguanosina na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3' e forma uma estrutura secundária do tipo “*stem-loop*” ou *hairpin* (Bartel, 2004). Em *Arabidopsis* o pri-

miRNA é processado via ação de diferentes enzimas, incluindo a RNase III DICER-LIKE1 (DCL1), e gera o pré-miRNA. Posteriormente, a DCL1 cliva o pré-miRNA e libera um *duplex*, que é metilado pela ação de uma metiltransferase nuclear (HEN1) (Yang et al., 2006). O miRNA maduro é exportado para o citoplasma por meio da enzima HASRY e, incorporado ao complexo protéico denominado RISC que contém a enzima ARGONAUTA1 (AGO1). AGO1, “guiada” pelo miRNA maduro, inibe a ação de genes alvo clivando o transcrito ou promovendo a repressão da tradução (Xie et al., 2015).

O mecanismo de repressão da tradução é dependente de alta complementaridade de bases entre o miRNA e o sítio de ligação alvo (Baumberger e Baulcombe, 2005). A clivagem direcionada pelo miRNA acontece usualmente entre o resíduo que pareia com o décimo ou décimo primeiro nucleotídeo do miRNA (Yang et al., 2007). Um estudo recente desenvolvido por Li et al. (2014) mostra que, além da alta complementaridade, os níveis de miRNA:mRNA alvo podem modular o reconhecimento do alvo em *Arabidopsis*, sugerindo ser um pré-requisito para um eficiente silenciamento.

Os microRNAs são agrupados em famílias gênicas de acordo com a similaridade da sequência madura (Jones-Rhoades et al., 2006). Estes podem ser separados em duas categorias distintas: os miRNAs altamente abundantes e conservados (por exemplo, miR156, miR166, miR169 e miR172), e os miRNAs expressos em baixo nível e conservados em linhagens específicas, a exemplo do miR403, identificado somente em eudicotiledôneas (Sunkar e Zhu, 2004) e o miR444 e miR529 que são específicos de monocotiledôneas (Sunkar et al., 2005; Zhang et al., 2009; Zanca et al., 2010; Morea-Ortiz et al., 2016). O papel do miRNA em plantas foi mostrado em vários mutantes de *Arabidopsis ago1*, *dcl1*, *hen1*, *hyl1* e *hst*, envolvidos em diferentes pontos da via do microRNA, os quais resultaram em drásticos efeitos pleiotrópicos durante o desenvolvimento das plantas (Mallory e Vaucheret, 2006).

Durante o desenvolvimento das plantas tem sido relatado que a maioria dos miRNAs não funciona de forma independente. Ao contrário, estão envolvidos em uma complexa rede regulatória que inclui interações com fatores de transcrição e fitormônios, apontando para o papel fundamental na coordenação do ajustamento do nível de mRNA alvo ao longo do desenvolvimento (Mallory e Vaucheret, 2006; Liu e Chen, 2009). Por exemplo, o miR164 tem como alvo membros da família de fator de transcrição NAC, e esse, por sua vez, tem papel na rede de sinalização de auxina, desenvolvimento de folha (polaridade e forma da folha) e identidade floral (formação de pétalas e sépalas) (Jones et al., 2006). Já o miR172/AP2 regula a transição da fase vegetativa adulto-reprodutiva,

desenvolvimento foliar e identidade floral (Mallory e Vaucheret, 2006; Yant et al., 2010; Jung et al., 2011). Vários miRNAs identificados também desempenham papéis importantes em várias repostas das plantas a estresses ambientais (Kumar, 2014). Por exemplo, o miR395 não foi detectado em plantas de *Arabidopsis* sob condições normais, no entanto, a sua expressão aumentou em baixos níveis de sulfatos. Este microRNA tem como alvo a ATP sulfúrilase, enzima que catalisa o primeiro passo de assimilação de sulfato inorgânico, e sob limitação de sulfato o miR395 é induzido, o que indica seu papel em resposta ao estresse abiótico (Jones-Rhoades e Bartel, 2004). Da mesma forma, o miR399 não foi detectável em plantas de *Arabidopsis* não estressadas, no entanto, sob deficiência de fósforo ocorreu sua acumulação (Chiou et al., 2006).

Dentre as 21 famílias de microRNAs conservadas em plantas a regulação exercida por miR156 e miR172 merece destaque especial, pois ambos os microRNAs desempenham funções fundamentais no controle das transições de fase durante o ciclo de vida da planta (Wu et al., 2009; Jung et al., 2011; Xu et al., 2016). O miR156 regula transição de fase vegetativa juvenil para adulta regulando pós-transcricionalmente fatores de transcrição (FTs) do tipo *SPLs* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE PROTEIN*), enquanto que o miR172 promove o estabelecimento da fase reprodutiva e algumas características adultas das folhas modulando a expressão de seis membros da família de fatores de transcrição *APETALA2 (AP2)-like* florais, que também são regulados por miR156 (Chuck et al., 2007; Wu et al., 2009; Jung et al., 2011). O envolvimento dos fatores de transcrição *SPLs* na transição de fase vegetativa juvenil-adulta tornou-se claro a partir de estudos com o miR156, cuja superexpressão prolonga a fase vegetativa juvenil, tanto em milho quanto em *A. thaliana* (Schwab et al., 2005; Wu e Poethig, 2006; Chuck et al., 2007). Além disso, estudos prévios têm demonstrado que o miR156 é altamente expresso no início do desenvolvimento em *A. thaliana* e diminui sua expressão com o passar do tempo, enquanto que o miR172 apresenta um padrão oposto, aumentando à medida que as folhas passam da fase juvenil para a adulta (Yu et al., 2015; Nguyen et al., 2017). O declínio gradual dos níveis de miR156 com a idade permite o acúmulo de fatores de transcrição *SPL* relacionados às características adultas. No entanto, como os níveis desse miRNA são regulados ao longo do desenvolvimento ainda não foi completamente esclarecido (Yu et al., 2015), embora estudos recentes com *A. thaliana* sugerem que os açúcares glicose e sacarose sejam os sinais que desencadeiam a transição vegetativa juvenil para adulto mediante a regulação dos níveis de miR156 (Yang et al., 2011; Yang et al., 2013; Yu et al., 2013).

Diante do exposto, é notável o crescente número de informações ressaltando o envolvimento do miR156 na regulação da mudança de fase vegetativa juvenil-adulta (Wu et al., 2009; Yu et al., 2013; Yu et al., 2015). Contudo, foi demonstrado que o papel do miR156 não se limita somente à regulação da transição de fase, mas possui importância para o melhoramento vegetal, visto que o miR156 tem sido associado à tolerância a estresses abióticos (Cui et al., 2014; Stief et al., 2014) e ao aumento da produção e qualidade de grãos (Jiao et al., 2010; Wang et al., 2012; Aung et al., 2015).

Passiflora edulis Sims (Passifloraceae) tem-se mostrado um potencial modelo para se investigar as redes regulatórias que controlam o processo heteroblástico, pois a espécie mostra um padrão foliar distinto entre folhas juvenil *versus* adulta que são utilizados para determinar a mudança de fase vegetativa (Chitwood e Otoni, 2016, 2017). Nessa espécie, no início do desenvolvimento vegetativo as folhas jovens são monolobadas de formato lanceolado, com lâminas foliares pequenas e margens lisas. À medida que a transição de fase ocorre as folhas tornam-se morfologicamente mais complexas com lâminas foliares maiores, margens serrilhadas e formação de novos lóbulos, passando de monolobadas para trilobadas (Cutri et al., 2013; Chitwood e Otoni, 2016, 2017). Associado a isso, as mudanças na forma e no tamanho das folhas ocorrem de maneira gradativa ao longo do desenvolvimento, o que nos fornece um adequado material vegetal para estudos de caracterização dos mecanismos genéticos e moleculares que controlam a transição de fase vegetativa juvenil-adulta.

Assim, essa Tese é composta por dois capítulos conexos em que se propõe o estudo do processo heteroblástico em *P. edulis*. Para tal, foram investigados o envolvimento da via regulatória miR156/*SPL* e miR172 e o papel de açúcares na modulação da heteroblastia ao longo do desenvolvimento vegetativo dessa espécie. Para alcançar os objetivos empregou-se uma abordagem molecular e metabólica em que: (i) plantas de *P. edulis* foram crescidas em casa de vegetação a fim de caracterizar as mudanças metabólicas bem como o perfil de transcritos dos miR156/*SPL9* e miR172 ao longo da mudança de fase juvenil-adulta da folha; (ii) o efeito de diferentes tipos e concentrações de açúcares na indução da transição de fase juvenil-adulta de *P. edulis in vitro* foram avaliados em relação a expressão dos transcritos da via miR156/*SPL9* e miR172.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aung B, Gruber M Y, Hannoufa A (2015) The MicroRNA156 system: A tool in plant biotechnology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4:432-442.
- Bartel D P (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116:281–297.
- Baumberger N, Baulcombe D C (2005) *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102:11928–11933.
- Byrne M E (2012) Making leaves. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:24-30.
- Canales C, Barkoulas M, Galinha C, Tsiantis M (2010) Weeds of change: *Cardamine hirsuta* as a new model system for studying dissected leaf development. *Journal of Plant Research*, 123:25-33.
- Capron A, Chatfield S, Provart N, Berleth T (2009) Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *American Society of Plant Biologists*, doi: 10.1199/tab.0126.
- Chiou T J, Aung K, Lin S, Wu C C, Chiang S F, Su C L (2006) Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18:412–421.
- Chitwood D H, Otoni W C (2016) Divergent heteroblastic trajectories underlie disparate leaf shapes among *Passiflora* species. *bioRxiv*. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/067520>.
- Chitwood D H, Otoni W C (2017) Morphometric analysis of *Passiflora* leaves: the relationship between landmarks of the vasculature and elliptical Fourier descriptors of the blade. *GigaScience*, 6:1-13.
- Chuck G, Cigan A M, Saeteurn K, Hake S (2007) The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics*, 39:544-549.
- Cui L G, Shan J X, Shi M, Gao J P, Lin H X (2014) The *miR156-SPL9-DFR* pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *The Plant Journal*, 80:1108–1117.
- Cutri L, Nave N, Ami M B, Chayut N, Samach A, Dornelas M C (2013) Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. *Mechanisms of Development*, 130: 61-69.

Fouracre J P, Poethig R S (2016) The role of small RNAs in vegetative shoot development. *Current Opinion in Plant Biology*, 29:64–72.

Huijser P, Schmid M (2011) The control of developmental phase transitions in plants. *Company of Biologists Ltd*, 138: 4117-4129.

Jiao Y, Wang Y, Xue D, Wang J, Yan M, Liu G, Dong G, Zeng D, Lu Z, Zhu X, Qian Q, Li J (2010). Regulation of *OsSPL14* by *OsmiR156* defines ideal plant architecture in rice. *Nature Genetics*, 42:541–544.

Jones-Rhoades M W, Bartel D P (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14:787–99.

Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57:19-53.

Jung J H, Seo P J, Kang S K, Park C M (2011) miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the *SPL3/4/5* genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Molecular Biology*, 76:35-45.

Kidner C A, Timmermans M C P (2010) Signaling sides: adaxial-abaxial patterning in leaves. *Current Topics in Developmental Biology*, 91: 141-168.

Kumar R (2014) Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174:93–115.

Lau S, Slane D, Herud O, Kong J, Jurgens G (2012) Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. *Annual Review of Plant Biology*, 63:483–506.

Li J, Reichel M, Millar A A (2014) Determinants beyond both complementarity and cleavage govern microR159 efficacy in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 10:e1004232.

Liu Q, Chen Y Q (2009) Insights into the mechanism of plant development: interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384:1-5.

Mallory A C, Vaucheret H (2006) Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics Supplement*, 38: S31–S36.

Morea-Ortiz EG, Silva EM, Silva GFF, Valente GT, Barrera Rojas CH, Nogueira FTS (2016) Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants. *BMC Plant Biology*, 16: 40.

Nguyen S T T, Greaves T, McCurdy D W (2017) Heteroblastic development of transfer cells is controlled by the microRNA miR156/*SPL* module. *Plant Physiology*, 173:1676–1691.

Nogueira F T S, Madi S, Chitwood D H, Juarez M T, Timmermans M C P (2007) Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes and Development*, 21: 750-755.

Nonogaki H (2010). MicroRNA gene regulation cascades during early stages of plant development. *Plant and Cell Physiology*, 51: 1840–1846.

Schwab R, Palatnik J F, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005) Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8:517-527.

Stief A, Altmann S, Hoffmann K, Pant B D, Scheible W R, Bäurle I (2014) *Arabidopsis* miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through *SPL* transcription factors. *The Plant Cell*, 25:1792–1807.

Sunkar R, Zhu J K (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell, Rockville*, 16: 2001-2019.

Sunkar R, Girke T, Jain P K, Zhu J K (2005) Cloning and characterization of MicroRNAs from rice. *The Plant Cell*, 17: 1397-1411.

Tsukaya H (2013) Leaf Development. *The American Society of Plant Biologists*, Number 13.

Verdeil J L, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger T J (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *TRENDS in Plant Science*, 2:245-52.

Wang S, Wu K, Yuan Q, Liu X, Liu Z, Lin X, Zeng R, Zhu H, Dong G, Qian Q, Zhang G, Fu X (2012) Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. *Nature Genetics*, 44:950–954.

Wang L, Sun S, Jin J, Fu D, Yang X, Weng X, Xu C, Li X, Xiao J, Zhang Q (2015) Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 112:15504-15509.

Wu G, Poethig R S (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target *SPL3*. *Development*, 133: 3539–3547.

- Wu G, Park M Y, Conway S R, Wang J, Weigel D, Poethig R S (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138:750-759.
- Xie M, Zhang S, Yu B (2015) microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72:87–99.
- Xu M, Hu T, Zhao J, Park M Y, Earley K W, Wu G, Yang L, Poethig R S (2016) Developmental functions of miR156-Regulated *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 12:1006263.
- Yang L, Liu Z Q, Lu F, Dong A W, Huang H (2006) SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 47:841–850.
- Yang T, Xue L, An L (2007) Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science*, 172:423-432.
- Yang L, Xu M, Koo Y, He J, Poethig R S (2013) Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of *MIR156A* and *MIR156C*. *eLife*, 2:e00260.
- Yant L, Mathieu J, Dinh T T, Ott F, Lanz, Wollmann H, Chen, Schmid M (2010) Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell*, 22:2156–2170.
- Yu S, Cao L, Zhou C-M, Zhang T-Q, Lian H, Sun Y, Wu J, Huang J, Wang G, Wang J-W (2013) Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *eLife*, 2:e00269.
- Yu S, Lian H, Wang W (2015) Plant developmental transitions: the role of microRNAs and sugars. *Current Opinion in Plant Biology*, 27:1–7.
- Zanca A S, Vicentini R, Ortiz-Morea F A, Del Bem L E V, Da Silva M J, Vincentz M, Nogueira F T S (2010) Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane. *BMC Plant Biology*, 10: 260-269.
- Zhang J, Xu Y, Huan Q, Chong K (2009) Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics*, 10:449.

CAPÍTULO I

Desenvolvimento foliar de *Passiflora edulis* ao longo da transição de fase vegetativa juvenil-adulta: uma abordagem metabólico-molecular

Resumo - *Passiflora edulis* possui padrões morfológicos marcantes da transição de fase juvenil-adulto das folhas, pois essas apresentam-se monolobadas e trilobadas quando jovens e adultas, respectivamente, sendo um modelo interessante de estudo de heteroblastia. Estudos prévios têm demonstrado que os microRNAs (miR156 e miR172), e seus genes-alvo *SPLs*, são componentes regulatórios importantes da mudança de fase vegetativa da planta. Mudanças nos níveis relativos de expressão do miR156/miR172 regulam, pois, a transição fase juvenil-adulta da planta. Contudo, o mecanismo de ação de como os miRNAs regulam o desenvolvimento foliar ainda não foi esclarecido. Evidências recentes têm sugerido que os açúcares são o sinal que desencadeia a transição vegetativa juvenil para adulto atuando sob a regulação de miR156. O presente trabalho objetivou caracterizar as mudanças metabólicas durante o processo de heteroblastia bem como monitorar o perfil de transcritos dos microRNAs miR156, seu gene-alvo (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE PROTEIN-9*, *SPL9*), e miR172 ao longo da mudança de fase juvenil-adulta em *P. edulis*. As análises de expressão revelaram que não houve variação significativa dos transcritos dos genes miR156 e *SLP9* ao longo do desenvolvimento de *P. edulis*. Contudo, o perfil de expressão de miR156 esperado foi mantido mostrando uma tendência de declínio gradual de seus níveis com a idade. O miR172, por sua vez, apresentou um padrão oposto de expressão ao miR156, de modo que, a partir da décima folha seus níveis aumentaram significativamente, sobretudo em folha de 30 dias. A quantificação dos metabólitos primários sugere que o padrão heteroblástico das folhas de *P. edulis* é marcado pelo aumento dos teores de açúcares, glicose e rafinose, e da expressão do miR172. Dessa forma, os açúcares solúveis e os níveis de miR172 apresentam-se como possíveis candidatos-chaves dos mecanismos de modulação do processo de heteroblastia em folhas de *P. edulis*.

Palavras-chave: Açúcares, fatores de transcrição, heteroblastia, microRNAs, rafinose.

Abstract- *Passiflora edulis* presents a remarkable variation in the morphological pattern upon juvenile-to-adult leaf transition. While juvenile leaves are lanceolate, adult leaves are tri-lobed. These changes in architecture and vegetative leaf phase allow *P. edulis* to be used as a suitable model in heteroblastic process investigations. Previous studies have demonstrated that microRNAs - miR156 and miR172 - as well as their target *SQUAMOSA-like* gene family are crucial regulatory players in plant vegetative phase changes. Thus, a slight balance on the relative expression level of miR156/miR172 is required for these genes to control the juvenile-to-adult phase transition in plants. However, the exact mechanism of action of miRNAs in the control of leaf development remains unclear. Compelling evidences have suggested that sugars are able to modulate miR156 levels and, therefore, trigger morphological changes during the transition to adult leaves. This work aimed to characterize metabolic variations as well as to evaluate transcript dynamics of miR156, miR172, and *SPL9* throughout heteroblasty and juvenile-to-adult vegetative phase transition in *P. edulis* leaves. No differences between miR156 and *SPL9* transcript levels were observed along leaf transitions in *P. edulis*. However, miR156 transcripts displayed a slight decreasing with leaf ageing, as expected for most of the studied plants. miR172 transcripts, in turn, were higher in older leaves. The quantification of primary metabolites suggests that heteroblastic pattern of *P. edulis* leaves is highlighted by increasing of sugar content, glucose and raffinose, and mir172 expression. Thus, the soluble sugar and miR172 level seems as putative key candidates of regulatory mechanism of heteroblasty process in *P. edulis* leaves.

Key words: heteroblasty, microRNA, sugar, raffinose, transcription factors

1. INTRODUÇÃO

A marcante capacidade dos vegetais em formar órgãos recursivamente ao longo do ciclo de vida os provê de alternativas para expressarem sua plasticidade e, como consequência, de se ajustarem morfo-fisiologicamente aos ambientes e suas constantes mudanças (Meyerowitz, 2002). Algumas espécies de plantas apresentam mudanças graduais na morfologia e anatomia da folha, as quais refletem a mudança da fase juvenil para a fase adulta, durante o período vegetativo – heteroblastia (Canales et al., 2010; Cutri et al., 2013; Yu et al., 2015). Notável progresso tem sido obtido na caracterização dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos nesse processo (Tsukaya, 2013). Tais avanços demonstram que nos últimos anos, os microRNAs (miRNAs) e seus genes-alvo surgiram como componentes regulatórios importantes da mudança de fase vegetativa- reprodutiva da planta (Chuck et al., 2007; Wang et al., 2009; Yu et al., 2013; Wang et al., 2015). Neste contexto, as modificações que ocorrem na folha durante a transição da fase vegetativa juvenil-adulta são mediadas essencialmente por dois miRNAs: miR156 e miR172 (Wang et al., 2011).

A regulação gênica exercida pelo miR156 sobre os fatores de transcrição (FTs) do tipo *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING LIKE PROTEINS (SPLs)* merece destaque especial, pois estudos indicam que o mesmo é um regulador evolutivamente conservado durante a mudança da fase vegetativa juvenil-adulta, tanto em plantas herbáceas quanto em lenhosas, enquanto o miR172 regula tanto o aparecimento de traços adultos na folha quanto a transição para a fase reprodutiva (Wu et al., 2009; Wang et al., 2009; Wang et al., 2011; Yu et al., 2013; Levy et al., 2014). No genoma de *Arabidopsis thaliana*, o miR156 é codificado por 10 loci que codificam (*MIR156A-MIR156j*) e sua função biológica é exercida por seus alvos (*SPLs*) (Reinhart et al., 2002; miRBase, release 21.0 <http://www.mirbase.org/>). Dez dos 16 membros da família de FTs (*SPL2*, *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL6*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13* e *SPL15*) são regulados pós-transcricionalmente pelo miR156 (Schwab et al., 2005; Wu e Poethig, 2006), enquanto que o miR172 regula a expressão de seis membros da família de fatores de transcrição *APETALA2 (AP2)*-like, incluindo o *TARGET of EAT 1/2 (TOE1* e *TOE2)*, que promovem a identidade juvenil da epiderme e, o *AP2*, um gene homeótico, que especifica a identidade dos órgãos florais (Chen, 2004; Chuck et al., 2007; Wu et al., 2009).

Estudos prévios têm demonstrado que o miR156 é altamente expresso no início do desenvolvimento em *A. thaliana* e diminui sua expressão com o passar do tempo; enquanto que o miR172 apresenta um padrão oposto, aumentando à medida que as folhas

passam da fase juvenil para a fase adulta (Yu et al., 2015; Nguyen et al., 2017). O declínio gradual dos níveis de miR156 com a idade permite a expressão de características adultas, no entanto, como os níveis desse miRNA é regulado ao longo do desenvolvimento ainda não foi esclarecido (Yu et al., 2015), embora existam evidências demonstrando que açúcares, tais como sacarose e glicose produzido nas folhas, sejam o sinal que desencadeia a transição vegetativa juvenil para adulto, mediante a regulação dos níveis de miR156 (Yang et al., 2013; Yu et al., 2013).

A morfologia da folha pode alterar drasticamente de acordo com a espécie durante o desenvolvimento vegetativo, ainda assim, os mecanismos genéticos e moleculares envolvidos no processo de heteroblastia são bem conservados (Yu et al., 2015). O que nos oferece um ótimo sistema para estudar o perfil de expressão do miR156 e seu gene-alvo (*SPL9*) e do miR172 durante as fases juvenil e adulta de *Passiflora edulis*, uma espécie não-modelo com limitadas informações genéticas e moleculares disponíveis. Posto que, a maioria das espécies de *Passiflora* apresenta caracteres morfológicos que mostram claramente a mudança da fase juvenil-adulto, especialmente dentro do subgênero *Passiflora* (Cutri et al., 2013). Em *P. edulis*, as folhas juvenis são monolobadas com lâminas foliares pequenas e margens lisas, enquanto as adultas são trilobadas com lâminas foliares maiores e margens serrilhadas. Além disso, à medida que a transição das folhas torna-se mais complexa, um meristema capaz de gerar gavinhas e flores é formado nas axilas das folhas. A emergência de gavinhas determina o início da fase vegetativa adulta (Nave et al., 2010; Cutri et al., 2013). Ademais, a espécie se destaca pelo potencial econômico devido ao valor nutricional de seus frutos, propriedades farmacêuticas e por ser a principal espécie cultivada do gênero no Brasil (Cunha et al., 2004; Moreira et al., 2012; Pacheco et al., 2012).

Interessantemente, dados preliminares em nosso laboratório indicam que a modulação da forma da folha em *Passiflora edulis* é influenciada pelo balanço hormonal (auxina:citocinina), dirigindo assim a transição da forma foliar juvenil para a adulta ainda *in vitro*. Ademais, uma gama de evidências surgiram nos últimos anos associando o acúmulo de fotoassimilados ou fornecimento exógeno de açúcares com as mudanças morfológicas e moleculares durante o processo de heteroblastia (Jeong et al., 2004; Yang et al., 2011; Yang et al., 2013, Yu et al., 2015).

O presente trabalho objetivou verificar as mudanças metabólicas durante o processo de heteroblastia ao mesmo tempo em que se propôs a monitorar o perfil de

transcritos dos microsRNAs: miR156, bem como seu gene-alvo (*SPL9*), e miR172, componentes chave envolvidos nas mudanças de fase juvenil-adulta de *Passiflora edulis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condução do experimento

Para realização do experimento em casa-de-vegetação, as sementes de *P. edulis* população FB300 foram fornecidas pelo Viveiro Flora Brasil Ltda. (Araguari, MG, Brasil). As plantas de *P. edulis* foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de 5 L, contendo substrato comercial (Plantmax[®]). A irrigação foi realizada diariamente de forma a manter-se a umidade do solo próxima a capacidade de campo. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para monitorar as mudanças metabólicas e o perfil de expressão de miR156, bem como seu gene-alvo (*SPL9*), e miR172 ao longo do desenvolvimento vegetativo de *P. edulis*, foram coletadas folhas em expansão e expandidas de 15 e 30 dias de idade, respectivamente, após a emergência dos primórdios foliares. Para ambos os estádios de desenvolvimento foliar foram coletadas as 3^a, 6^a, 9^a, 10^a, 11^a e 12^a folhas.

2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA via ‘*pulsed-stem loop*’ RT-PCR

O RNA total foi isolado utilizando a solução TRI-Reagent[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América) e tratado com DNase I (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, Estados Unidos da América), conforme recomendações do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada com auxílio do NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies TM) e a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (*RNAse free*).

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a metodologia *Pulsed stem-loop* RT-qPCR (Varkonyi-Gasic et al., 2007) a partir de 500 ng do RNA total. Juntamente com o RNA total tratado com DNase I foi adicionado 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl (1 mM) do iniciador RT específico do miRNA maduro e 1 µl de oligodT (500ng/µl). As amostras foram incubadas a 70 °C por 10 min para desnaturação das estruturas secundárias e depois incubadas a 4 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 4 µl do tampão 5x RT e 1 µl da enzima MMLV *Reverse Transcriptase* (Ludwig Biotec[®], Alvorada, Brazil). As reações foram incubadas a 16 °C por 30 min, seguidas por transcrição reversa de 60

ciclos de 30 °C por 30 s, 42 °C por 30 s e 50 °C por 1 s. Para inativação da enzima, a reação foi incubada a 85 °C durante 5 min. Subsequentemente, as reações foram armazenadas a -20 °C.

2.3 Análise de RT-qPCR

O perfil de expressão dos genes miR156 e um de seus genes-alvo (*SPL9*) e do miR172 foram analisados via RT-qPCR em tempo real utilizando um sistema *StepOnePlus™ real time PCR system* (Applied Biosystems). Iniciadores dos genes miR156 e miR172, reguladores da transição de fase vegetativo-reprodutivo da planta foram sintetizados de acordo com Varkonyi-Gasic et al., (2007). No caso do gene alvo *SPL9*, os iniciadores foram desenhados a partir de uma sequência do gene *SPL9* oriunda da clonagem gênica. Todas as amostras de RT-qPCR foram realizadas utilizando 20 ng de cDNA, 400 nM de cada primer, e qPCR SYBR- Green mix/Rox (Ludwig Biotec®, Alvorada, Brazil) e água biodestilada para um volume final de reação 10 µL. O gene constitutivo actina foi usado como normalizador. O programa de PCR foi o seguinte: 2 min a 50 °C e 10 min a 90 °C, seguido por 40 ciclos de 16 s a 95 °C e 1 min a 60 °C, e 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, 30 s a 95 °C e 15 s a 60 °C. Os níveis de transcrição foram determinados usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

2.4 Determinação do conteúdo de açúcares

Amostras foliares foram coletadas no fim do dia (1 h antes do escurecer) e submetidas à extração etanólica determinando-se, na fração solúvel, os teores de glicose, frutose e sacarose segundo metodologia descrita por Fernie et al. (2001). Inicialmente, em cada microplaca, foram adicionados em cada poço 160 µL do meio de reação (HEPES/KOH 100 mM com MgCl₂ 3 mM pH 7, ATP 118 mM, NADP⁺ 48,4 mM, e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato - G6PDH (5 mg mL⁻¹)), 30 µL do extrato e 20 µL de etanol 80%. Por meio de um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) foram realizadas leituras das absorvâncias a 340 nm com intervalos entre leituras de 1 min. Uma vez ocorrida a estabilização da densidade ótica (OD), adicionou-se 5 µL, sucessivamente, das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5 U por reação), após intervalo aproximado de 25 min entre cada aplicação. Para estimar a concentração dos açúcares, resultados expressos em µmol g⁻¹, utilizou-se equação baseada na lei de Lambert-Beer: $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 \times 6,22)$

2.5 Determinação do conteúdo de amido

A concentração de amido foi determinada como descrito previamente por Fernie et al. (2001). Aos tubos contendo o precipitado resultante da extração etanólica e o NaOH 0,1 M, foram adicionados 70 μL de ácido acético 1 M, para neutralização do extrato. Uma alíquota de 40 μL da suspensão foi retirada e colocada em uma microplaca, a qual continha 60 μL do mix de hidrólise do amido, composto pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades μL^{-1}) e α -amilase (0,01 U μL^{-1}) ressuspensas em acetato de sódio 0,5 M pH 4,9. A microplaca foi vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425[®]) e incubada por 1 h a 55 °C, com leve agitação. Posteriormente, 25 μL do extrato hidrolisado foram transferidos para uma microplaca nova, que continha 160 μL do meio de reação composto por tampão Hepes/KOH 1M pH 7,0 MgCl_2 3 mM, ATP 118 mM, NADP^+ 48,4 mM e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato– G6PDH (0,7 unidades μL^{-1}), por poço. Por meio de um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) foram lidas as absorvâncias das respectivas amostras a 340 nm, com 1 min de intervalo entre leituras. Uma vez estabilizado a OD, foi adicionado aos poços 2 μL de hexocinase (2 unidades por reação). O conteúdo de amido foi então calculado de acordo com a equação Lambert-Beer e os resultados expressos em μmol de glicose por g^{-1} de massa fresca (MF).

2.6 Perfil metabólico

Amostras foliares foram extraídas em metanol, água e clorofórmio, tendo o ribitol como padrão interno (0,2 mg mL^{-1}) conforme previamente descrito (Lisec et al., 2006). Após extração, a fase superior polar, contendo os metabólitos polares primários foram coletadas e desidratadas em SpeedVac (Concentrador plus, Eppendorf). Essas amostras foram derivatizadas adicionando-se 40 μL de metoxiamino hidrocloreto (20 mg mL^{-1} em piridina) com incubação de 2 h a 37 °C, sob agitação de 950 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf). Em seguida, foram adicionados 70 μL de solução contendo 1 mL de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) e 20 μL de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) e, novamente, incubados durante 30 min a 37 °C, sob agitação de 950 rpm. O volume de 100 μL foi transferido para os vials e usado para a determinação do perfil metabólico por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (Sistema GC-MS TruTOF, Agilent – LECO) (Roessner et al., 2001).

Os cromatogramas e os espectros de massa foram avaliados usando os softwares Chroma TOF 4.4 (Leco) e TargetSearch (Luedemann et al., 2008) alimentado com

biblioteca contendo os tempos de retenção e padrão de fragmentação dos metabólitos primários da base de dados Golm Metaboloma. Depois de identificados, os dados foram normalizados com o padrão interno ribitol e apresentados como valores relativos. Essa análise permitiu a determinação das principais classes de compostos (aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e outros).

2.7 Análises estatísticas

Para as análises de quantificações de açúcares e perfil metabólico a unidade experimental foi constituída por 5 repetições biológicas, composta por um pool de três folhas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para a comparação das médias dos tratamentos, foi realizado o teste de Scott e Knott (Scott e Knott, 1974) a 5% de significância. Para análise de expressão gênica via RT-qPCR foram utilizadas 3 repetições e para a comparação das médias dos tratamentos o teste de Dunnett a 5% de significância foi aplicado.

3. RESULTADOS

No início do desenvolvimento vegetativo as folhas de *P. edulis* são monolobadas de formato lanceolada, lâmina foliar pequena e margem lisa. À medida que a transição de fase ocorre a folha torna-se morfologicamente mais complexa com lâmina foliar maior, margem serrilhada e formação de novos lóbulos. Ademais, a partir da décima folha o padrão morfológico é alterado passando de monolobada para trilobada (Figura 1).

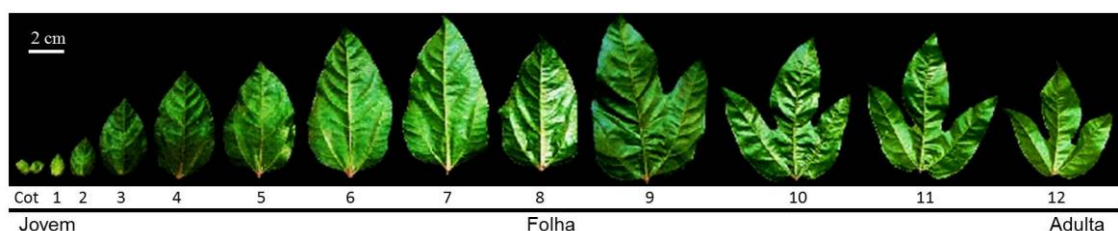


Figura 1. O padrão heteroblástico de folhas de *Passiflora edulis* é alterado ao longo do desenvolvimento vegetativo juvenil-adulto. As folhas da base aumentam gradativamente a maturidade (esquerda para direita) em direção ao ápice caulinar, folhas com 30 dias de idade.

3.1 Expressão de miR156/*SPL9* e miR172 ao longo do desenvolvimento da vegetativo juvenil-adulto

A análise de expressão por RT-qPCR mostrou que não houve variação significativa nos níveis de expressão dos genes do miR156 e do seu alvo *SLP9* (Figuras 2A e 2C). Embora, os níveis de expressão do miR156 mostrem uma tendência de declínio, à medida que ocorre a transição da folha para a fase adulta de *P. edulis*. O miR172, por sua vez, apresentou um padrão oposto de expressão ao do miR156, sendo aproximadamente quatro vezes mais expresso na fase vegetativa adulta de *P. edulis*. Além do mais, o miR172 mostrou uma correlação direta entre a abundância do transcrito com as alterações da morfologia das folhas (heteroblastia), de modo que, a partir da décima folha seus níveis aumentaram significativamente, sobretudo em folha de 30 dias (Figura 2B).

3.2 Níveis de sacarose, glicose, frutose e amido

Houve correlação entre o acúmulo de açúcar com a mudança de fase vegetativa juvenil-adulta de *P. edulis*, independentemente da idade da folha (Figura 3A e 3B). Ao longo do desenvolvimento da parte aérea de *P. edulis* foi observado que o conteúdo de glicose aumentou substancialmente em folhas adultas. Ademais, o acúmulo de glicose acompanhou as mudanças morfológicas das folhas de *P. edulis*, mostrando-se significativo a partir da décima folha, a qual reflete a transição de fase juvenil a adulta da

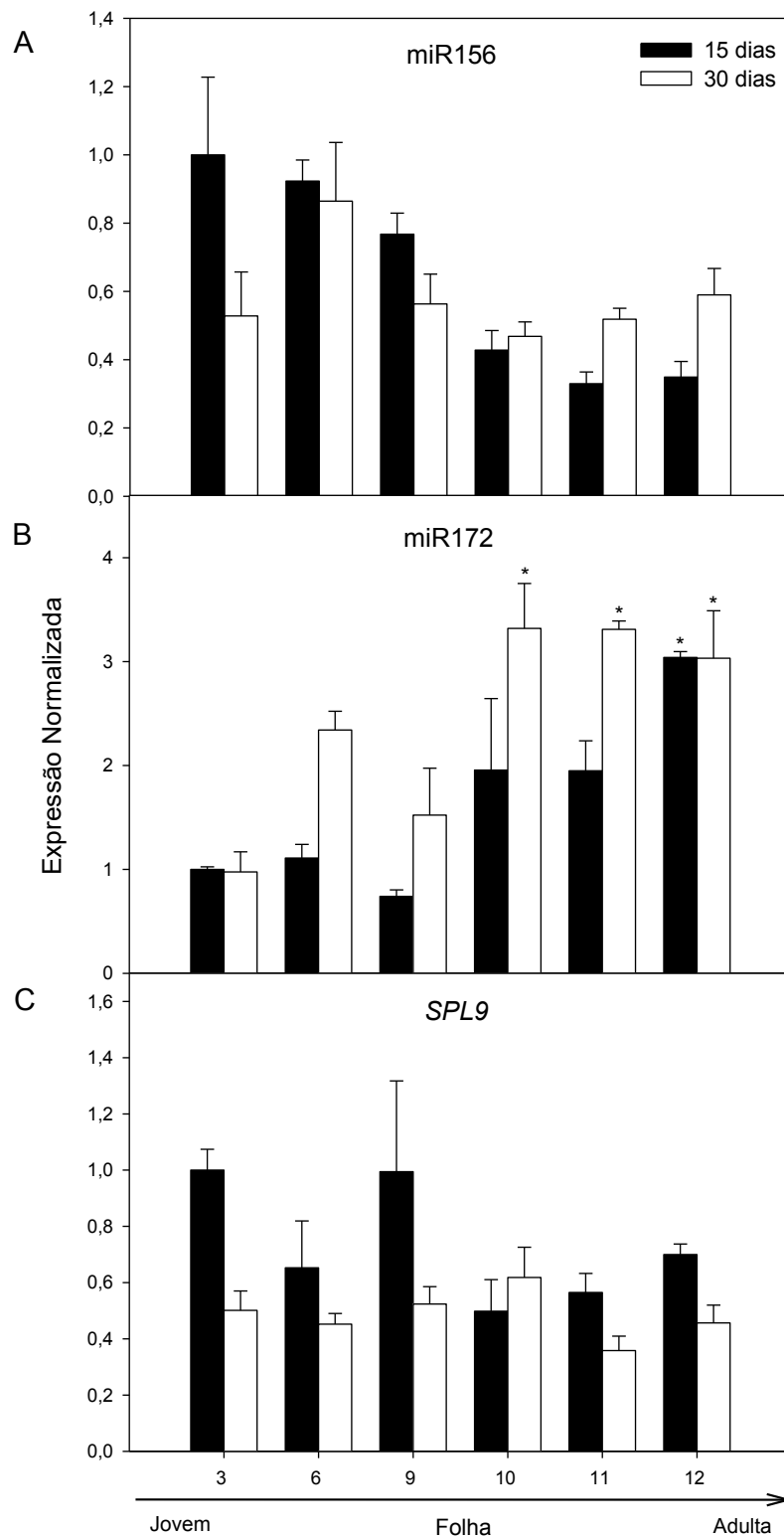


Figura 2. Expressão relativa dos genes miR156 (A), miR172 (B) e *SPL9* (C) folhas de *Passiflora edulis* em expansão (15 dias) e expandidas (30 dias) em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo juvenil-adulto em comparação com o controle (3ª folha com 15 dias de idade). Barras representam o erro padrão e os asteriscos designam diferenças estatísticas pelo teste de Dunnett ($P < 0.05$). Valores são apresentados como médias de três repetições biológicas independentes.

planta (Figura 3A). De maneira geral, o padrão de acúmulo da frutose foi semelhante ao da glicose, aumentando de forma gradativa com a mudança de fase vegetativa (Figura 3B), embora o acúmulo de frutose revelasse valor proporcionalmente 10 vezes menor ($2 \mu\text{mol g}^{-1}$) ao da glicose ($20 \mu\text{mol g}^{-1}$).

A sacarose, diferentemente da glicose e frutose, apresentou variação sutil em seu acúmulo durante a mudança de fase vegetativa, embora tenha exibido médias mais elevadas em folhas jovens em detrimento das folhas adultas. O acúmulo de sacarose foi significativo na terceira e sexta folhas, que exibem características juvenis. Por outro lado, uma redução moderada na concentração desse açúcar foi observada a partir da nona folha quando as mudanças morfológicas são visíveis dando início ao processo de mudança de fase vegetativa da espécie (Figura 3C).

O acúmulo de amido em folhas de *P. edulis* mostrou-se dependente da idade e da fase vegetativa da folha (Figura 3D). Folhas com 30 dias apresentaram um padrão de acúmulo de amido bem determinado. De modo que, no início do desenvolvimento vegetativo entre a terceira e nona folhas o acúmulo de amido mantém uma tendência crescente, tornando-se significativo na décima folha, quando o conteúdo de amido alcança valores próximos de $100 \mu\text{mol g}^{-1}$. A partir da décima folha houve decréscimo no conteúdo de amido a valores comparados aos da terceira folha $40 \mu\text{mol g}^{-1}$, mostrando que no momento de transição de fase juvenil-adulta de *P. edulis* o acúmulo de amido atinge o seu ápice e depois diminui (Figura 3D).

3.3 Perfil metabólico de *P. edulis* ao longo do desenvolvimento vegetativo juvenil-adulto

O perfil metabólico de folhas de *P. edulis* com 15 e 30 dias permitiu a identificação de aproximadamente 50 metabólitos sendo a maioria classificados como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos (Figura 4). Também evidenciou que as variações observadas em folhas de *P. edulis* foram associadas, sobretudo, à mudança de fase vegetativa juvenil-adulta da espécie.

O primeiro grupo abrangeu metabólitos que, em sua maioria, tiveram seus níveis reduzidos em todos os estádios de desenvolvimento vegetativo de folhas de 15 e 30 dias de idade. Nesse grupo, metabólitos como aspartato, espermidina, metionina, ácido maleico e alo-inositol mostraram diminuição mais intensificada de sua abundância em folhas de 30 dias. Por outro lado, um pequeno subgrupo de metabólitos (succinato, serina, 2-oxoglutarato e treonina) aumentou, principalmente, nas folhas adultas de 15 dia

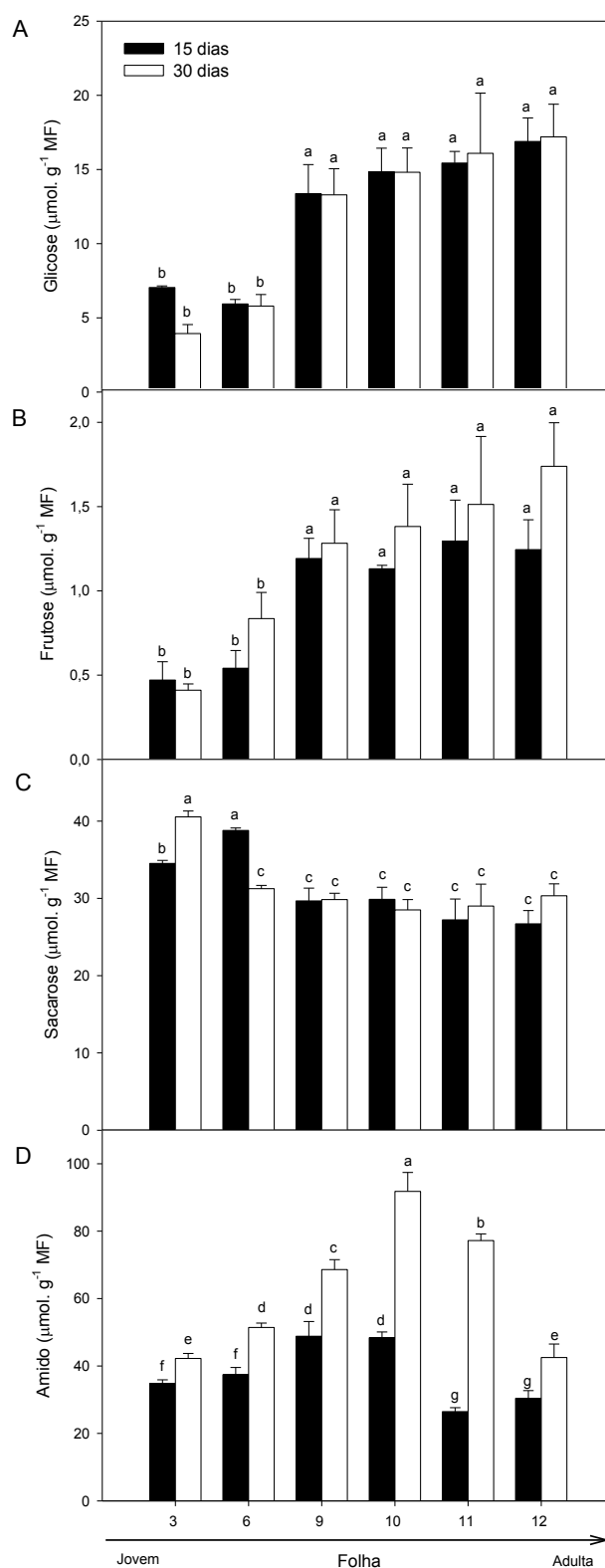


Figura 3. Níveis de glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D) em folhas de *Passiflora edulis* em expansão (15 dias) e expandidas (30 dias) em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo juvenil-adulto. Valores são apresentados como médias de cinco repetições biológicas independentes. Barras representam o erro padrão e letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$).

em relação às folhas de 30 dias. Ainda com relação ao primeiro grupo foi visualizado que glutamato, tirosina e ácido galactônico 1,4-lactona reduziram apenas em folhas de 30 dias e pouco efeito tiveram em folhas de 15 dias.

O segundo grupo agrega metabólitos relacionados ao processo da fotossíntese e fotorrespiração, como ribulose e eritrose (ambas as formas não-fosfatadas) bem como ácido glicérico, respectivamente. Neste grupo, mesmo que o mapa de cor mostre acúmulo de alguns dos metabólitos (i.e eritrose e ribulose), caracteriza-se por ter pouca ou nenhuma diferença significativa entre as amostras sendo, então, considerado um grupo de pouca variação durante a transição de fase vegetativo juvenil-adulta.

O terceiro grupo, por sua vez, é composto principalmente por açúcares. Traçado um paralelo entre os valores encontrados dos açúcares solúveis: glicose, frutose e sacarose no perfil metabólico com aqueles valores quantificados por ensaios espectrofotométricos (Figura 3), é possível notar a mesma tendência e concluir que as duas técnicas mostram estreita correlação e reprodutibilidade dos resultados encontrados. Ainda, esse comportamento similar dos açúcares citados acima podem validar os demais metabólitos encontrados pelo perfil metabólico.

Em relação aos compostos fosfatados de frutose encontrados no perfil metabólico como frutose-6-fosfato e frutose-1-fosfato observou-se um padrão distinto de acúmulo desses dois metabólitos em folhas de 15 e 30 dias durante a mudança de fase citada acima. A frutose-6-fosfato aumentou nas folhas de 15 e 30 dias enquanto frutose-1-fosfato acumulou somente em folhas adultas de 30 dias. Os demais açúcares encontrados isomaltose, sorbose, arabinose, rafinose, trealose e glicohexose apresentaram padrão coordenado, aumentando seus níveis gradativamente conforme ocorre o processo de mudança de fase vegetativa das folhas. Da mesma forma, um subgrupo de aminoácidos e seus derivados (serina o-cetil, beta alanina, putrescina e triptofano), ou mesmo ácidos orgânicos (ácido glicurônico e ácido galacturônico) que também mostraram incremento significativo de seus níveis. Por fim, os metabólitos remanescentes desse grupo (aminoácidos de cadeia ramificada, fumarato bem como maltose) não apresentaram alterações expressivas de seus níveis.

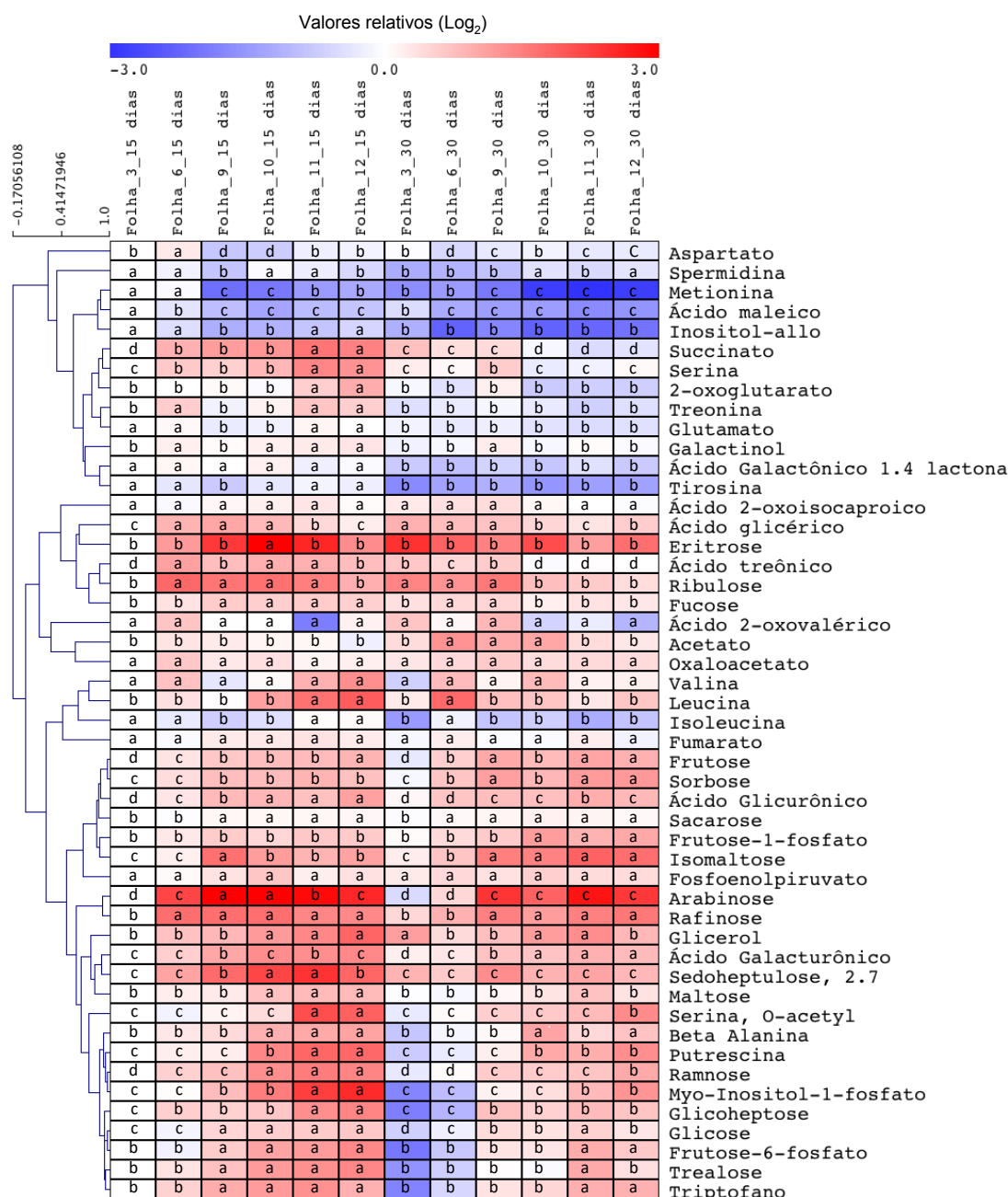


Figura 4. Conteúdo relativo de metabólitos de folhas de *Passiflora edulis* em expansão (15 dias) e expandidas (30 dias) em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo juvenil-adulto em comparação com o controle (3ª folha com 15 dias de idade). Metabólitos representados em vermelhos são acumulados enquanto os representados em azul são reduzidos. Quadrados indicados pela mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Os dados representam a média de cinco repetições biológicas independentes.

4. DISCUSSÃO

Estudos indicam que mudanças nos níveis do miR156 ao longo do desenvolvimento vegetativo regulam a transição da fase juvenil para adulta da planta (Chuck et al., 2007; Wu et al., 2009). Durante o desenvolvimento inicial das folhas, os níveis elevados de miR156 reprimem os genes-alvo *SPLs*, fatores de transcrição relacionados com as características adulta das folhas, favorecendo o crescimento vegetativo juvenil. À medida que a parte aérea cresce, a mudança de fase vegetativa é acompanhada por um declínio na expressão de miR156 seguido pelo acúmulo de *SPLs* que induzem a passagem da fase vegetativa juvenil para adulta, ao permitir que o miR172 seja expresso (Yu et al., 2015). Nossos resultados apontam o miR172 como potencial marcador da idade endógena do desenvolvimento vegetativo de *P. edulis*, dado que, é notável que as alterações na morfologia das folhas, descritas como caracteres morfológicos associados a mudança de fase vegetativa juvenil-adulta em *P. edulis* (Cutri et al., 2013), correspondem ao padrão de expressão desse microRNA, o qual é considerado regulador evolutivamente conservado durante a mudança de fase vegetativa juvenil-adulta tanto em herbáceas quanto em lenhosas (Wu et al., 2009; Wang et al., 2011; Levy et al., 2014). Ademais, a análise de expressão dos miRNAs, a partir de folha de 15 e 30 dias de idade, mostrou comportamento oposto de expressão. Apesar dos níveis de miR156 não terem sofrido alteração significativa, há uma tendência de declínio de expressão à medida que ocorre a transição da folha para a fase adulta em *P. edulis*, tendência essa que também foi encontrada em *Acacia confusa*, *Acacia colei*, *Eucalyptus globulus*, *Hedera helix* e *Quercus acutissima*, que apresentaram maior abundância do miR156 em folhas jovens totalmente expandida do que as folhas adultas (Wang et al., 2011). Nguyen et al. (2017), estudando o desenvolvimento heteroblástico de folhas de *A. thaliana* também encontraram essa diminuição dos níveis de expressão de miR156 com consequente aumento de miR172 na transição de juvenil para adulta.

A melhor compreensão do papel do miR156 durante a transição da fase vegetativa juvenil-adulta tem sido obtida através de superexpressão do gene. Em *A. thaliana*, as plantas que superexpressam miR156 (35S::miR156) produzem mais folhas e ramos laterais, de maneira que permanecem por mais tempo na fase juvenil. Ao passo que, tanto plantas que superexpressam MIM156 (35S::MIM156, reconhece o alvo miR156, mas que não apresenta atividade catalítica), quanto as que perderam a função do miR156 mostraram um fenótipo oposto ao 35S::miR156 com características de folhas adultas

precoce além de florescerem com menor número de folha que o normal (Wu e Poethig, 2006; Wu et al., 2009; Yang et al., 2013; Yu et al., 2013). Em consenso com as alterações observadas no fenótipo desses mutantes, plantas que superexpressam miR156 possuíam metade da quantidade de miR172, enquanto plantas 35S::MIM156 apresentaram mais que o dobro da quantidade desse microRNA (Wu et al., 2009).

Com base em estudos com *A. thaliana* foi demonstrado que alterações nos níveis de miR156 modulam os níveis de miR172 através do seu efeito sobre a expressão do gene miR172B. Análises funcionais têm mostrado que o *SPL9* induz o florescimento ao modular os níveis de miR172 ligando-se ao promotores do gene miR172B (Wu et al., 2009). Além disso, tem sido constatado através de mutantes *spl9* que tiveram seus níveis de expressão reduzidos (perda de função) ou aumentados (ganho de função) que *SPL9* desempenha papel dominante (master) na maioria, senão todas, as características associadas à fase adulta de *A. thaliana* (Jung et al., 2011; Xu et al., 2016). De maneira antagônica, em *P. edulis*, o declínio nos níveis de expressão do miR156 com o passar do tempo não foi acompanhado por um aumento correspondente nos transcritos de *SPL9*. Ao contrário, foi observada pequena expressão de *SPL9*, constante ao longo do desenvolvimento da folha. Esse efeito é similar ao já relatado por Xu et al. (2016), que relataram aumento relativamente pequeno nos níveis de expressão de *SPL*. Ademais, o miR156 pode atuar não somente sobre os transcritos desses genes, como anteriormente imaginado, mas também na repressão do processo traducional (Xu et al., 2016). É possível, ainda, que o *SPL9* não seja o fator de transcrição dominante no processo de heteroblastia em *P. edulis*, o que pode ser justificado pelo elevado grau de redundância funcional observado entre os membros dessa família de *SPLs* (Wu et al., 2009).

As primeiras evidências de que o açúcar derivado das folhas pode ser o sinal que regula o miR156 foram apresentadas por Yang et al. (2013) e Yu et al. (2013), embora estudos precedentes já reportassem a importância de metabólitos primários como o açúcar no desenvolvimento vegetativo (Corbesier et al., 1998; Smeekens et al., 2010). Os resultados obtidos das análises fotométricas e do perfil metabólico permitiram uma compreensão mais ampla da dinâmica de acúmulo de açúcares solúveis e de outros metabólitos primários derivados da folha e sua correlação como perfil de expressão do miR156, seu gene alvo *SPL9* e do miR172 durante a transição de fase vegetativa juvenil-adulta de *P. edulis*.

De maneira geral, os dados obtidos das análises de detecção dos açúcares solúveis de folhas de *P. edulis* evidenciaram correlação direta entre o padrão de acúmulo de

glicose, frutose e sacarose com a mudança de fase vegetativa juvenil-adulta da espécie. Esses resultados concordam com aqueles apresentados por Yu et al. (2013) e Yang et al. (2013) em que sugeriram que açúcares reprimem miR156, mostrando a existência de uma correlação direta entre os conteúdos de açúcares endógenos com o aparecimento de traços adultos nas folhas. Ademais, foi verificado que a remoção das primeiras duas folhas da plântula de *A. thaliana* resultou em um aumento de miR156 levando a um atraso da transição da folha para fase adulta. Contudo, a aplicação exógena de açúcares no local da remoção das folhas reverteu o fenótipo acima ao mesmo tempo em que reduziu os níveis de transcritos de miR156.

Além do mais, valendo-se do uso de mutantes de *A. thaliana* relacionados à fotossíntese trouxe novas evidências de como os açúcares e fotoassimilados estariam envolvidos no processo de heteroblastia (Tsai et al., 1997; Yang et al., 2013). O uso de mutantes de reduzida expressão de *RUBISCO SMALL SUBUNIT (RBCS)* resultou em redução da taxa fotossintética e atraso de mudança de fase juvenil-adulta em plantas de tabaco (Tsai et al., 1997). Ainda, nesse mesmo contexto, mutante *caol/chlorinal (chl)* de *A. thaliana* com reduzido níveis de clorofila (*b*) apresentam fase vegetativa juvenil prolongada com folhas arredondada e ausência de tricomas abaxiais (Yu et al. 2013). Nesses mutantes, os níveis de expressão de miR156 foram analisados e o resultado mostrou aumento de seus transcritos quando houve prejuízo das taxas fotossintéticas, mas a aplicação de açúcar resultou na diminuição dos níveis de miR156, levando à mudança de fase juvenil para adulta (Yu et al., 2013). Sendo assim, integrando as vias do metabolismo do carbono, em especial do processo fotossintético, na modulação do desenvolvimento da parte aérea (Tsai et al., 1997, Yang et al., 2011, Yang et al., 2013, Yu et al., 2013). Em linha com essas observações, técnicas de cultura de tecidos já mostravam que plantas cultivadas em meio de cultura isento de açúcar produziam folhas com características juvenis, enquanto meio acrescido com açúcar metabolizável acelerava o aparecimento de folhas com traços adultos (Allsopp, 1953; Dielen et al., 2001).

A análise fotométrica revelou ainda a predominância de sacarose em folhas de *P. edulis*, esses resultados estão em conformidade como o observado para a maioria das espécies vegetais, como *A. thaliana* (Carbosier et al., 1998; Medeiros et al., 2016). Todavia, comportamento diferente pode ser observado em *Solanum lycopersicum*, em que a quantidade de frutose é notavelmente maior (Nunes-Nesi et al., 2007).

Uma possível explicação para a mudança no comportamento do amido após a transição de fase juvenil-adulta de *P. edulis* pode estar relacionada com sua mobilização. Resultados similares foram descritos no desenvolvimento de folhas de algodão em que o acúmulo de amido teve seu máximo nas folhas adultas seguido por uma diminuição progressiva com a idade da folha (Chang, 1979). Ademais, em consonância com o mencionado acima, trabalho com mutantes de *A. thaliana* incapazes de sintetizar (*pgm*: plastid phosphoglucomutase) e degradar (*sex1*: starch-in-excess1) amido, Carbosier et al. (1998) mostraram que durante dias longos os açúcares resultantes do processo fotossintético são capazes de promover as mudanças de fase vegetativa. Enquanto que em dias curtos a fotossíntese por si só não é capaz de induzir tais mudanças sendo necessário o papel de mobilização de amido como fonte extra de açúcares solúveis.

O principal grupo de metabólitos identificados e que foram induzidos durante a passagem da fase juvenil para adulta em *P. edulis* foi constituído de açúcares. A trealose, oriunda de parede celular, acumulou em maior quantidade em folhas adultas. Esse perfil pode ser encontrado em folhas de tabaco que aumentam os níveis desses compostos concomitantemente com a idade da folha (Zhao et al., 2015).

Como já mencionado acima, o amido encontra-se em maior quantidade entre as nona e décima folhas, o que pode sugerir um aumento das taxas fotossintéticas (Gibon et al., 2004; Webb e Satake, 2005). Ademais, outros metabólitos relacionados à fotossíntese podem suportar essa ideia de aumentadas taxas fotossintéticas, como ribulose, eritrose, ambas formas não-fosfatadas, funcionando como intermediários do ciclo de Calvin-Benson. Esse mesmo comportamento é encontrado em outras espécies durante a transição de fases, como em *Populus tremuloides* e *Nicotiana tabacum* (Jeong et al., 2004; Zhao et al., 2015).

Os níveis de sacarose demonstram variações sutis em folhas adultas sugerindo que *P. edulis* pode ter outro açúcar de reserva ou, ao menos, seja preferencialmente exportado para outros tecidos drenos. Esse papel pode estar sendo exercido pela rafinose, que se acumula em um perfil semelhante à glicose e frutose, sendo considerado um açúcar solúvel de armazenamento e que pode ser translocado para outras partes da planta (Sculz, 2015). A síntese de rafinose utiliza *mio*-inositol-1-P como precursor (Peterbauer e Richter, 2001). E mais, foi verificado que *mio*-inositol-1-P foi induzido dando indícios, a partir do perfil metabólico, que uma parte da via de síntese de rafinose pode estar associada ao desenvolvimento foliar de *P. edulis*.

Ácidos orgânicos sofreram grande alteração durante o processo de heteroblastia de *P. edulis*. Dentre eles, intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico: succinato e 2-oxoglutarato reduziram em direção à fase adulta da folha. Por exemplo, 2-oxoglutarato é utilizado para a síntese de glutamato que também apresentou níveis mais elevados em folhas jovens, visto que é sabido que o mesmo desempenha função importante como precursor da síntese de clorofila durante o desenvolvimento (Yaronskaya et al., 2006). Ademais, o glutamato juntamente com o oxalacetato é utilizado para produção de aspartato (Forde e Lea, 2007). Vale ressaltar que aspartato funciona como precursor de outros aminoácidos, tais como metionina e treonina (Jader e Joshi, 2009), que também mostraram um declínio durante a transição de fase juvenil-adulta. Comportamento similar desses aminoácidos foi verificado na transição do desenvolvimento foliar de *Populus tremuloides* (Joeng et al., 2004).

Diante do exposto, é visível a complexidade das vias metabólicas envolvidas na modulação da forma da folha juvenil para adulta, principalmente em plantas não-modelo ou mesmo aquelas que não possuem o genoma sequenciado como *P. edulis*. Essa abordagem metabólica pode dar indícios de que metabólitos-chave podem determinar o desenvolvimento foliar. O açúcar foi o principal grupo que sofreu alteração durante o processo de heteroblastia. A partir disso, apontamos tanto rafinose quanto *mio*-inositol-1-P como metabólitos candidatos a estudos futuros, uma vez que, açúcares fazem parte não somente de vias de produção de energia, mas possuem funções de sinalização e controle do crescimento e desenvolvimento da planta. Os resultados aqui apresentados fornecem evidência da ligação entre as vias do metabolismo do carbono, em especial os açúcares solúveis, com o aumento da expressão de miR172 ao longo do desenvolvimento vegetativo de *P. edulis*. Dessa forma, o processo de heteroblastia em *P. edulis* foi marcada pelos aumentos dos teores de açúcares solúveis e expressão do miR172.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allsopp A: Experimental and analytical studies of Pteridophytes XXI, Investigations on Marsilea 3. (1953) The effect of various sugars on development and morphology. *Annals of Botany*, 17:447-463.

Canales C, Barkoulas M, Galinha C, Tsiantis M (2010) Weeds of change: *Cardamine hirsuta* as a new model system for studying dissected leaf development. *Journal of Plant Research*, 123:25-33.

Chang C W (1979) Starch and its component ratio in developing cotton leaves. *Plant Physiology*, 63:973-977.

Chen X (2004) A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 303: 2022–2025.

Chuck G, Cigan A M, Saeteurn K, Hake S (2007) The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics*, 39:544-549.

Corbesier L, Lejeune P, Bernier G (1998) The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta*, 206:131-7.

Cunha M A P, Barbosa L V, Faria G A Botânica. In: Lima AA, Cunha MAP (2004a) Maracujá: Produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: *Embrapa-Mandioca e Fruticultura*, 15-35.

Cutri L, Nave N, Ami M B, Chayut N, Samach A , Dornelas MC (2013) Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. *Mechanisms of Development*, 130: 61-69.

Dielen V, Lecouvet V, Dupont S, Kinet J-M (2001) *In vitro* control of floral transition in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), the model for autonomously flowering plants, using the late flowering uniflora mutante. *Journal of Experimental Botany*, 52: 715-723.

Fernie A R, Roscher A, Ratcliffe R G, Kruger N J (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*, 212: 250-263.

Forde B G, Lea P J (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58:2339–2358.

Fouracre J P, Poethig R S (2016) The role of small RNAs in vegetative shoot development, *Current Opinion in Plant Biology*, 29:64–72.

Gibon Y, Blasing O E, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks J H M, Fisahn J, Höhne M, Günther M, Stitt M (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *The Plant Journal*, 39:847–862.

Jander G, Joshia V (2009) Aspartate-derived Amino Acid Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *American Society of Plant Biologists*, 7:0121.

Jeong M L, Jiang H, Chen H S, Tsai C J, Harding S A (2004) Metabolic profiling of the sink-to-source transition in developing leaves of Quaking Aspen. *Plant Physiology*, 136:3364–3375.

Jung J H, Seo P J, Kang S K, Park C M (2011) miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the *SPL3/4/5* genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Molecular Biology*, 76:35–45.

Levy A, Szwerdszarf D, Abu-Abied M, Mordehaev I, Yaniv Y, Riov J, Arazi T, Sadot E (2014) Profiling microRNAs in *Eucalyptus grandis* reveals no mutual relationship between alterations in miR156 and miR172 expression and adventitious root induction during development. *BMC Genomics*, 15:524.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie A R (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1:387–396.

Livak K J, Schmittgen T D (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25:402-408.

Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J. (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatographymass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*, 24:732–737.

Medeiros D B, Martins S C.V, Cavalcanti J H F, Daloso D M, Martinoia E, Nunes-Nesi A, DaMatta F M, Fernie A R, Araújo W L (2016) Enhanced photosynthesis and growth in atqac1 knockout mutants are due to altered organic acid accumulation and an increase in both stomatal and mesophyll conductance. *Plant Physiology*, 170: 86–101.

Meyerowitz E M (2002) Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science*, 295:1482-5.

Moreira C P S, Silva C G, Almeida V L (2012) Propriedades químicas e medicinais do maracujá. *Informe Agropecuário*, 33: 7-16.

Nave N, Katz E, Chayut N, Gazit S, Samach A (2010) Flower development in the passion fruit *Passiflora edulis* requires a photoperiod-induced systemic graft-transmissible signal. *Plant Cell and Environment*, 33, 2065–2083.

Nguyen S T T, Greaves T, McCurdy D W (2017) Heteroblastic development of transfer cells is controlled by the microRNA miR156/*SPL* module. *Plant Physiology*, 173:1676–1691.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe R G, Sweetlove L J, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal*, 50:1093-106.

Pacheco G, Garcia R, Lugato D, Vianna M, Mansur E (2012) Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. *Scientia Horticulturae*, 144: 42-47.

Peterbauer T, Richter A (2001) Biochemistry and physiology of raffinose Family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research*, 11:185–197.

Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, Bartel B, Bartel D P (2002) MicroRNAs in plants. *Genes and Development*, 16:1616–26.

Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie AR (2001) Metabolic profiling and phenotyping of genetically and environmentally modified systems. *The Plant Cell*, 13:11–29.

Schwab R, Palatnik J F, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005) Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8: 517-527.

Smeeckens S, Ma J, Hanson J, Rolland F (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 13:274-9.

Scott RJ, Knott M (1974) A cluster analysis method for grouping mans in the analysis of variance. *Biometrics*, 30: 507-512.

Tsai C H, Miller A, Spalding M, Rodermeel S (1997) Source strength regulates an early phase transition of tobacco shoot morphogenesis. *Plant Physiology*, 115:907-914.

Tsukaya H (2013) Leaf Development. *The American Society of Plant Biologists*, Number 13.

Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton E F, Hellens R P (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3: 1-12.

Wang J W, Park M Y, Wang L J, Koo Y, Chen XY, Weigel D, Poethig R S (2011) MiRNA Control of Vegetative Phase Change in Trees. *PLoS Genetics*, 7: 1002012.

Wang L, Sun S, Jin J, Fu D, Yang X, Weng X, Xu C, Li X, Xiao J, Zhang Q (2015) Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 112:15504-15509.

Webb A A, Satake A (2015) Understanding Circadian Regulation of Carbohydrate Metabolism in *Arabidopsis* Using Mathematical Models. *Plant and Cell Physiology*, 56:586–593.

Wu G, Poethig R S (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target *SPL3*. *Development*, 133: 3539–3547.

Wu G, Park M Y, Conway S R, Wang J, Weigel D, Poethig R S (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138:750-759.

Xu M, Hu T, Zhao J, Park M Y, Earley K W, Wu G, Yang L, Poethig R S (2016) Developmental Functions of miR156-Regulated *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 12:1006263.

Yang L, Conway S R, Poethig R S (2011) Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156. *Development*, 138:245–249.

Yang L, Xu M, Koo Y, He J, Poethig R S (2013) Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of *MIR156A* and *MIR156C*. *eLife*, 2:e00260.

Yaronskaya E, Vershilovskaya I, Poers Y, Alawady A E, Averina N, Grimm B (2006) Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. *Planta*, 224:700–709.

Yu S, Cao L, Zhou C-M, Zhang T-Q, Lian H, Sun Y, Wu J, Huang J, Wang G, Wang J-W (2013) Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *eLife*, 2:e00269.

Yu S, Lian H, Wang W (2015) Plant developmental transitions: the role of microRNAs and sugars. *Current Opinion in Plant Biology*, 27:1–7.

Zhao Y, Zhao J, Zhao C, Zhou H, Li Y, Zhang J, Li L, Hu C, Li W, Peng X, Lu X, Lin F, Xu G (2015) A metabolomics study delineating geographical location-associated primary metabolic changes in the leaves of growing tobacco plants by GC-MS and CE-MS. *Scientific Reports*, 5:16346.

6. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar S1. Determinação do perfil metabólico de folhass de <i>P.edulis</i> ao longo do desenvolvimento foliar. Valores são apresentados como médias $\pm$ erro padrão.												
Perfil metabólico	F_3_15 dias	F_6_15 dias	F_9_15 dias	F_10_15 dias	F_11_15 dias	F_12_15 dias	F_3_30 dias	F_6_30 dias	F_9_30 dias	F_10_30 dias	F_11_30 dias	F_12_30 dias
Ácido maçônico	1 $\pm$ 0,29	0,04 $\pm$ 0,02	19,74 $\pm$ 9,92	12,34 $\pm$ 5,35	30,44 $\pm$ 3,46	10,84 $\pm$ 2,75	35,27 $\pm$ 0,69	54,67 $\pm$ 2,99	44,16 $\pm$ 2,91	56,29 $\pm$ 2,86	34,47 $\pm$ 3,15	43,11 $\pm$ 1,79
Succinato	1 $\pm$ 0,10	1,90 $\pm$ 0,15	2,26 $\pm$ 0,27	2,39 $\pm$ 0,16	3,12 $\pm$ 0,26	2,80 $\pm$ 0,35	1,67 $\pm$ 0,35	1,31 $\pm$ 0,15	1,35 $\pm$ 0,27	0,93 $\pm$ 0,21	0,70 $\pm$ 0,09	0,76 $\pm$ 0,10
Ácido málico	1 $\pm$ 0,02	1 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,03
Triptofano	1 $\pm$ 0,22	1,45 $\pm$ 0,35	1,98 $\pm$ 0,23	2,27 $\pm$ 0,44	2,46 $\pm$ 0,28	1,91 $\pm$ 0,63	0,28 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,12	1,27 $\pm$ 0,30	1,41 $\pm$ 0,32	1,93 $\pm$ 0,38	1,90 $\pm$ 0,48
Frutose	1 $\pm$ 0,06	1,25 $\pm$ 0,08	1,59 $\pm$ 0,05	1,71 $\pm$ 0,07	1,74 $\pm$ 0,14	1,85 $\pm$ 0,16	0,80 $\pm$ 0,06	1,49 $\pm$ 0,12	2,02 $\pm$ 0,06	1,77 $\pm$ 0,09	2,09 $\pm$ 0,12	1,90 $\pm$ 0,13
Metionina	1 $\pm$ 0,16	0,96 $\pm$ 0,08	0,23 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,05	0,36 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01
Ácido maleico	1 $\pm$ 0,13	0,77 $\pm$ 0,13	0,51 $\pm$ 0,09	0,40 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,06
Arabinose	1 $\pm$ 0,13	4,58 $\pm$ 0,46	10,50 $\pm$ 0,72	11,21 $\pm$ 1,46	7,48 $\pm$ 0,70	5,86 $\pm$ 1,48	0,69 $\pm$ 0,06	1,39 $\pm$ 0,40	5,19 $\pm$ 1,03	3,62 $\pm$ 0,92	6,84 $\pm$ 1,03	5,03 $\pm$ 1,36
Valina	1 $\pm$ 0,60	1,66 $\pm$ 1,07	0,78 $\pm$ 0,32	1,05 $\pm$ 0,45	1,89 $\pm$ 0,78	2,51 $\pm$ 0,95	0,63 $\pm$ 0,27	1,74 $\pm$ 0,59	1,11 $\pm$ 0,27	1,77 $\pm$ 0,32	1,12 $\pm$ 0,41	1,14 $\pm$ 0,29
Spermidina	1 $\pm$ 0,11	0,88 $\pm$ 0,10	0,55 $\pm$ 0,08	0,97 $\pm$ 0,16	0,84 $\pm$ 0,117	0,68 $\pm$ 0,14	0,43 $\pm$ 0,06	0,56 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,11	0,75 $\pm$ 0,14	0,68 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,05
Sorbose	1 $\pm$ 0,08	1,32 $\pm$ 0,10	1,71 $\pm$ 0,05	1,74 $\pm$ 0,05	1,85 $\pm$ 0,16	1,68 $\pm$ 0,30	0,93 $\pm$ 0,14	1,62 $\pm$ 0,15	2,20 $\pm$ 0,08	1,82 $\pm$ 0,08	2,27 $\pm$ 0,16	2,30 $\pm$ 0,23
Glicerol	1 $\pm$ 0,35	1,66 $\pm$ 0,59	1,81 $\pm$ 0,41	2,29 $\pm$ 0,82	2,67 $\pm$ 0,49	3,53 $\pm$ 0,62	2,21 $\pm$ 0,31	1,36 $\pm$ 0,32	1,69 $\pm$ 0,43	2,25 $\pm$ 0,48	2,54 $\pm$ 0,48	1,80 $\pm$ 0,37
Ácido galactônico	1 $\pm$ 0,08	1,5 $\pm$ 0,06	2,08 $\pm$ 0,08	2,54 $\pm$ 0,23	2,50 $\pm$ 0,10	2,65 $\pm$ 0,40	1,15 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,07	1,64 $\pm$ 0,13	1,64 $\pm$ 0,07	1,92 $\pm$ 0,14	1,75 $\pm$ 0,15
Leucina	1 $\pm$ 0,98	1,29 $\pm$ 0,73	1,02 $\pm$ 0,35	2,15 $\pm$ 0,08	3,17 $\pm$ 0,27	3,75 $\pm$ 0,56	1,20 $\pm$ 0,03	3,40 $\pm$ 0,90	1,69 $\pm$ 0,19	1,61 $\pm$ 0,30	1,22 $\pm$ 0,37	1,60 $\pm$ 0,26
Putrescina	1 $\pm$ 0,12	1,15 $\pm$ 0,14	1,17 $\pm$ 0,12	2,69 $\pm$ 0,14	3,45 $\pm$ 0,30	3,45 $\pm$ 1,02	0,59 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,11	1,16 $\pm$ 0,15	2,03 $\pm$ 0,31	1,95 $\pm$ 0,29	2,50 $\pm$ 0,35
Ácido treônico	1 $\pm$ 0,08	2,16 $\pm$ 0,08	1,72 $\pm$ 0,17	1,92 $\pm$ 0,08	1,91 $\pm$ 0,10	1,72 $\pm$ 0,13	1,58 $\pm$ 0,08	1,39 $\pm$ 0,05	1,52 $\pm$ 0,17	0,97 $\pm$ 0,05	1,02 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,04
Ácido glicérico	1 $\pm$ 0,07	1,85 $\pm$ 0,06	2,017 $\pm$ 0,12	1,78 $\pm$ 0,19	1,37 $\pm$ 0,14	1,16 $\pm$ 0,06	1,90 $\pm$ 0,10	1,72 $\pm$ 0,04	1,64 $\pm$ 0,15	1,41 $\pm$ 0,08	1,26 $\pm$ 0,13	1,51 $\pm$ 0,13
Treonina	1 $\pm$ 0,12	1,51 $\pm$ 0,20	0,88 $\pm$ 0,04	1,12 $\pm$ 0,04	1,62 $\pm$ 0,15	1,50 $\pm$ 0,18	0,73 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,15	0,81 $\pm$ 0,12	0,63 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,12
Ácido galact 1,4 lactona	1 $\pm$ 0,08	1,08 $\pm$ 0,10	1 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,12	0,59 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,07	0,56 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,10	0,59 $\pm$ 0,07
Isoleucina	1 $\pm$ 0,16	0,81 $\pm$ 0,08	0,61 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,08	1,05 $\pm$ 0,14	0,35 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,11	0,55 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,08	0,55 $\pm$ 0,08
Serina	1 $\pm$ 0,07	1,56 $\pm$ 0,13	1,48 $\pm$ 0,06	1,80 $\pm$ 0,11	2,68 $\pm$ 0,18	2,45 $\pm$ 0,35	1,16 $\pm$ 0,09	1, $\pm$ 0,21	1,52 $\pm$ 0,26	0,83 $\pm$ 0,11	0,87 $\pm$ 0,12	1,05 $\pm$ 0,16
Ramose	1 $\pm$ 0,10	1,47 $\pm$ 0,10	1,68 $\pm$ 0,13	2,51 $\pm$ 0,30	2,92 $\pm$ 0,40	2,74 $\pm$ 0,45	0,80 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,08	1,59 $\pm$ 0,20	1,53 $\pm$ 0,19	1,61 $\pm$ 0,09	2,01 $\pm$ 0,23
Acetato	1 $\pm$ 0,19	1,25 $\pm$ 0,39	1,19 $\pm$ 0,17	1,09 $\pm$ 0,17	1,08 $\pm$ 0,15	0,86 $\pm$ 0,09	1,34 $\pm$ 0,29	2,43 $\pm$ 0,53	2 $\pm$ 0,40	2,08 $\pm$ 0,23	1,33 $\pm$ 0,23	1,22 $\pm$ 0,16
Glicose	1 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,04	1,42 $\pm$ 0,06	1,50 $\pm$ 0,08	1,55 $\pm$ 0,12	1,58 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,09	0,85 $\pm$ 0,17	1,34 $\pm$ 0,09	1,27 $\pm$ 0,12	1,45 $\pm$ 0,06	1,23 $\pm$ 0,06
Ácido aspártico	1 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,11	0,57 $\pm$ 0,04	0,6- $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,08	0,99 $\pm$ 0,07	0,69 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,07
2-oxo isocrapico	1 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,09	1,07 $\pm$ 0,16	1,14 $\pm$ 0,11	1,24 $\pm$ 0,11	1,03 $\pm$ 0,13	1,20 $\pm$ 0,12	1,30 $\pm$ 0,13	1,13 $\pm$ 0,13	1,08 $\pm$ 0,10	1 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,10
Eritrose	1 $\pm$ 0,08	2,28 $\pm$ 0,48	5,05 $\pm$ 0,96	11,12 $\pm$ 3,61	5,87 $\pm$ 2,63	2,57 $\pm$ 0,66	5,41 $\pm$ 0,64	3,60 $\pm$ 0,75	2,79 $\pm$ 0,42	4,32 $\pm$ 2,45	2,21 $\pm$ 0,26	3,24 $\pm$ 0,85
Manose	1 $\pm$ 0,07	1,29 $\pm$ 0,10	2,01 $\pm$ 0,13	1,66, 015	1,40 $\pm$ 0,05	2,55 $\pm$ 0,15	1,74 $\pm$ 0,11	1,49 $\pm$ 0,14	1,99 $\pm$ 0,10	1,91 $\pm$ 0,10	2,03 $\pm$ 0,10	1,81 $\pm$ 0,10
2-oxo glutarato	1 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,13	1,05 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,20	1,50 $\pm$ 0,27	1,98 $\pm$ 0,36	0,92 $\pm$ 0,12	0,75 $\pm$ 0,11	1,14 $\pm$ 0,21	0,59 $\pm$ 0,10	0,61 $\pm$ 0,10	0,62 $\pm$ 0,14
Ribulose	1 $\pm$ 0,14	3,44 $\pm$ 0,21	3,10 $\pm$ 0,24	3,20 $\pm$ 0,39	2,87 $\pm$ 0,86	1,93 $\pm$ 0,48	2,73 $\pm$ 0,33	2,43 $\pm$ 0,42	3 $\pm$ 0,58	1,70 $\pm$ 0,24	1,55 $\pm$ 0,29	1,32 $\pm$ 0,11
Ácido glutâmico	1 $\pm$ 0,02	1,06 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,01	1 $\pm$ 0,12	0,899 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,04	0,85 $\pm$ 0,05	0,75 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,05
alfa Trealose	1 $\pm$ 0,06	1,27 $\pm$ 0,09	1,66 $\pm$ 0,11	2,27 $\pm$ 0,45	2,48 $\pm$ 0,53	2,68 $\pm$ 0,45	0,33 $\pm$ 0,03	0,61 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,15	0,96 $\pm$ 0,07	2,01 $\pm$ 0,35	1,30 $\pm$ 0,37
Ácido glicurônico	1 $\pm$ 0,09	1,24 $\pm$ 0,07	1,77 $\pm$ 0,07	1,81 $\pm$ 0,17	1,68 $\pm$ 0,13	62 $\pm$ 0,28	1,07 $\pm$ 0,15	1,63 $\pm$ 0,29	1,71 $\pm$ 0,11	1,69 $\pm$ 0,07	1,95 $\pm$ 0,13	1,79 $\pm$ 0,17

Perfil metabólico	F_3_15 dias	F_6_15 dias	F_9_15 dias	F_10_15 dias	F_11_15 dia	F_12_15 dias	F_3_30 dias	F_6_30 dias	F_9_30 dias	F_10_30 dia	F_11_30 dias	F_12_30 dia
Rafinose	1 ± 0,06	3,27 ± 0,45	3,25 ± 0,30	3,24 ± 0,22	2,69 ± 0,03	2 ± 0,28	1,39 ± 0,14	1,89 ± 0,13	2,82 ± 0,30	2,24 ± 0,26	2,83 ± 0,49	3,01 ± 0,19
Beta-alanina	1 ± 0,56	1,22 ± 0,08	1,36 ± 0,08	1,92 ± 0,18	2,02 ± 0,13	2,12 ± 0,39	0,56 ± 0,05	0,92 ± 0,06	1,06 ± 0,14	2,11 ± 0,29	1,37 ± 0,30	1,64 ± 0,39
Ácido pirúvico	1 ± 0,03	1,17 ± 0,11	1,33 ± 0,09	1,64 ± 0,25	1,38 ± 0,11	1,33 ± 0,15	1,20 ± 0,20	1,33 ± 0,14	1,58 ± 0,17	1,59 ± 0,17	1,22 ± 0,06	1,37 ± 0,12
Serina - acetil	1 ± 0,17	0,90 ± 0,17	1,11 ± 0,14	1,34 ± 0,10	4,26 ± 0,61	3,65 ± 0,67	0,81 ± 0,12	6 ± 0,12	1,49 ± 0,30	1,57 ± 0,21	1,76 ± 0,61	2,52 ± 1,02
Ácido glutárico	1 ± 0,06	0,99 ± 0,13	0,96 ± 0,16	1,10 ± 0,10	0,88 ± 0,03	1,09 ± 0,17	1,13 ± 0,09	0,98 ± 0,13	1,17 ± 0,25	1,15 ± 0,14	1,12 ± 0,05	0,85 ± 0,07
N-acetilglicosamida	1 ± 0,10	0,99 ± 0,04	1,06 ± 0,10	0,76 ± 0,06	0,73 ± 0,15	0,72 ± 0,14	2,16 ± 0,13	2,06 ± 0,22	1,55 ± 0,06	1,70 ± 0,32	1,12 ± 0,17	1,33 ± 0,14
Sedoheptulose 2,7 fosfato	1 ± 0,09	2,12 ± 0,12	3,36 ± 0,50	4,55 ± 0,45	5,28 ± 1,04	3,47 ± 0,63	1,87 ± 0,14	1,55 ± 0,10	2,54 ± 0,39	1,88 ± 0,24	2,10 ± 0,18	1,80 ± 0,20
Sacarose	1 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1,08 ± 0,02	1,08 ± 0,01	1,08 ± 0,03	1,08 ± 0,04	0,98 ± 0,02	1,06 ± 0,02	1,09 ± 0,02	1,12 ± 0,04	1,09 ± 0,04	1,07 ± 0,02
Tirosina	1 ± 0,04	0,90 ± 0,06	0,39 ± 0,05	0,91 ± 0,05	0,89 ± 0,07	0,88 ± 0,03	1,15 ± 0,06	1,11 ± 0,07	1,01 ± 0,03	1,02 ± 0,03	0,97 ± 0,04	1,03 ± 0,05
Fucose	1 ± 0,10	1,26 ± 0,07	1,53 ± 0,08	1,50 ± 0,08	1,53 ± 0,11	1,48 ± 0,15	1,29 ± 0,12	1,38 ± 0,15	1,42 ± 0,14	1,14 ± 0,08	1,28 ± 0,12	1,22 ± 0,11
2-oxo valérico	1 ± 0,46	1,63 ± 0,99	1,01 ± 0,58	1 ± 0,54	0,27 ± 0,14	1,13 ± 0,93	1,61 ± 1,52	1,07 ± 0,83	1,81 ± 1,14	0,64 ± 0,48	0,83 ± 0,72	0,47 ± 0,33
Ribulose	1 ± 0,07	2,18 ± 0,21	2,39 ± 0,34	2,26 ± 0,42	1,64 ± 0,38	1,63 ± 0,24	2,67 ± 0,45	2,21 ± 0,42	2,12 ± 0,38	1,25 ± 0,13	1,16 ± 0,20	0,97 ± 0,10
Frutose 6 fosfato	1 ± 0,07	0,88 ± 0,09	1,52 ± 0,14	2,11 ± 0,17	2,27 ± 0,42	2,66 ± 0,69	0,25 ± 0,05	0,58 ± 0,13	1,25 ± 0,21	1,24 ± 0,26	1,97 ± 0,33	1,56 ± 0,37
Ácido glicônico 6 fosfato	1 ± 0,13	1,16 ± 0,13	1,30 ± 0,18	1,70 ± 0,41	1,71 ± 0,42	2,34 ± 0,79	1,09 ± 0,08	0,99 ± 0,13	0,98 ± 0,11	1,67 ± 0,32	1,74 ± 0,16	1,73 ± 0,29
Maltotritol	1 ± 0,06	1,26 ± 0,12	1,34 ± 0,24	1,43 ± 0,16	1,73 ± 0,78	1,22 ± 0,07	1,26 ± 0,23	1,48 ± 0,26	1,01 ± 0,05	1,17 ± 0,18	1,07 ± 0,14	1,05 ± 0,15
Glicoheptose	1 ± 0,06	1,49 ± 0,15	1,47 ± 0,25	1,58 ± 0,29	2,50 ± 0,79	2,77 ± 0,59	0,27 ± 0,05	0,47 ± 0,09	1,68 ± 0,27	1,46 ± 0,17	1,75 ± 0,24	1,62 ± 0,09
Ácido fumárico	1 ± 0,06	0,97 ± 0,15	1,19 ± 0,17	1,21 ± 0,22	1,27 ± 0,30	1,18 ± 0,18	0,93 ± 0,05	1,18 ± 0,12	0,98 ± 0,10	0,98 ± 0,13	1,18 ± 0,08	0,89 ± 0,06
Frutose 1 fosfato	1 ± 0,20	1,21 ± 0,16	1,52 ± 0,14	1,40 ± 0,24	1,57 ± 0,33	1,54 ± 0,26	1,04 ± 0,21	1,36 ± 0,18	1,55 ± 0,17	2,23 ± 0,20	1,88 ± 0,28	2,05 ± 0,46
Oxalacetato	1 ± 0,17	1,58 ± 0,10	1,21 ± 0,05	1,31 ± 0,09	1,10 ± 0,15	1,15 ± 0,12	1,23 ± 0,11	1,37 ± 0,14	1,55 ± 0,17	1,33 ± 0,18	1,36 ± 0,12	1,35 ± 0,15
mio-inositol 1 fosfato	1 ± 0,14	1,03 ± 0,19	1,73 ± 0,15	2,90 ± 0,15	4,85 ± 1,72	5,64 ± 0,68	0,29 ± 0,05	0,51 ± 0,08	1,12 ± 0,15	1,32 ± 0,20	1,78 ± 0,36	2,41 ± 0,71
Isomaltose	1 ± 0,10	1,15 ± 0,17	3,20 ± 0,58	2,25 ± 0,16	1,85 ± 0,05	2,15 ± 0,25	1,16 ± 0,15	1,62 ± 0,18	2,86 ± 0,41	2,78 ± 0,22	3,61 ± 0,49	3,26 ± 0,50
Galactinol	1 ± 0,02	1,14 ± 0,14	1,03 ± 0,06	1,15 ± 0,06	1,19 ± 0,08	1,24 ± 0,13	0,87 ± 0,04	0,93 ± 0,03	1,16 ± 0,09	0,93 ± 0,06	1,04 ± 0,12	0,97 ± 0,12
Maltose	1 ± 0,04	1,17 ± 0,07	1,19 ± 0,09	1,67 ± 0,03	1,77 ± 0,09	1,76 ± 0,15	0,99 ± 0,08	0,93 ± 0,04	1,07 ± 0,03	1,25 ± 0,10	1,65 ± 0,20	1,27 ± 0,13
Allo Inositol	1 ± 0,49	0,72 ± 0,20	0,44 ± 0,07	0,46 ± 0,05	0,55 ± 0,03	0,66 ± 0,10	0,45 ± 0,12	0,20 ± 0,03	0,29 ± 0,04	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,24 ± 0,03
Tirosina	1 ± 0,34	0,78 ± 0,10	0,59 ± 0,04	0,0 ± 0,03	0,90 ± 0,06	0,85 ± 0,15	0,31 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,45 ± 0,06	0,34 ± 0,04	0,38 ± 0,05	0,39 ± 0,05
Ácido glicurônico	1 ± 0,22	0,91 ± 0,05	1,18 ± 0,05	1,06 ± 0,02	1,11 ± 0,05	1,02 ± 0,07	0,73 ± 0,07	1,02 ± 0,04	1,11 ± 0,03	1,26 ± 0,09	1,36 ± 0,04	1,23 ± 0,07
Ácido aspártico	1 ± 0,21	2,18 ± 0,36	0,82 ± 0,28	1,14 ± 0,28	1,43 ± 0,10	2,96 ± 1,34	1,16 ± 0,33	0,66 ± 0,16	1,23 ± 0,30	0,99 ± 0,22	1,21 ± 0,31	1,06 ± 0,27
Homoserine	1 ± 0,25	0,88 ± 0,16	1,51 ± 0,34	1,39 ± 0,40	1,06 ± 0,31	1,03 ± 0,35	0,51 ± 0,08	1,06 ± 0,25	1,47 ± 0,42	1,74 ± 0,44	2,29 ± 0,57	2,20 ± 0,61
Fosfoenolpiruvato	1 ± 0,78	1,04 ± 0,10	1,26 ± 0,19	1,60 ± 0,31	1,16 ± 0,12	1,29 ± 0,14	1,19 ± 0,04	1,37 ± 0,13	1,29 ± 0,12	1,59 ± 0,24	1,33 ± 0,19	1,35 ± 0,10
Ácido láctico	1 ± 0,16	4,96 ± 0,21	4,93 ± 0,58	5,26 ± 0,81	4,40 ± 1,69	2,78 ± 0,84	4,81 ± 0,70	4,08 ± 0,95	4,56 ± 1,06	2,14 ± 0,38	1,92 ± 0,30	1,64 ± 0,12

CAPÍTULO II

Açúcares promovem traços heteroblásticos em folhas na organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* SIMS. mediante a modulação das vias miR156 e miR172

Resumo - Em algumas espécies vegetais a transição da fase juvenil para adulta é marcada por mudanças na morfologia foliar (heteroblastia) e pela aquisição de competência reprodutiva. Tais mudanças são mediadas essencialmente por dois microRNAs: miR156 e miR172. Recentemente, em *Arabidopsis thaliana*, mostrou-se que a via miR156/ *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING LIKE PROTEINS* (*SPLs*) responde a açúcares, e que existe uma correlação inversa entre o nível de expressão do miR156 e teor de açúcares endógeno. *Passiflora edulis* tem-se mostrado um potencial modelo para se investigar as redes regulatórias que controlam o processo heteroblástico. Nessa espécie, durante o período vegetativo observa-se mudanças graduais na morfologia foliar, incluindo alteração no tamanho e na forma da folha, de monolobada a trilobada. Aliado a isso e à marcante capacidade organogênica *in vitro* de vários tipos de explantes de *P. edulis* em regenerar plantas, o presente trabalho objetivou analisar o papel de diferentes tipos e concentrações de açúcares na indução da transição de fase juvenil-adulta de *P. edulis in vitro* e o seu efeito sobre a expressão das vias miR156/*SPL9* e miR172. Os resultados evidenciaram que o fornecimento de açúcares aos explantes cotiledonares, em especial glicose a 44 e 88 mM, exerce papel preponderante na modulação da transição da forma juvenil para adulta da folha de *P. edulis in vitro*. Ainda, a adição de STS e AVG influenciou positivamente a frequência de regeneração dos explantes cotiledonares, sobretudo combinada com a concentração de 44 mM de glicose, onde houveram mais folhas com padrão heteroblástico alterado. Os níveis de expressão do miR156 e miR172 foram estreitamente correlacionados com o processo heteroblástico. Coerentemente, houve acúmulo significativo de transcritos de miR156 nos tratamentos com maior emissão de brotos e folhas com características juvenis, enquanto que miR172 apresentou um padrão oposto, com níveis mais expressivos nos tratamentos onde o padrão morfogênico das folhas foi alterado. Na hibridização *in situ*, a expressão de *PeSPL9* mostrou distribuição espacial desse transcrito no meristema apical caulinar e nos primórdios em expansão, sugerindo o envolvimento de *SPL9* na morfogênese foliar durante o desenvolvimento vegetativo de *P. edulis*. Propõe-se aqui um modelo para estudo de heteroblastia, mediante a regeneração *in vitro* a partir de explantes juvenis de *P. edulis*, espécie com relevante importância econômica. Os

resultados aqui apresentados ampliam as bases do conhecimento acerca do papel da glicose como molécula moduladora dos processos heteroblásticos em plantas, via regulação da expressão de miR156 e miR172.

Palavras-chave: Aminoetoxivinilglicina, expressão gênica, glicose, maracujazeiro, morfogênese, tiosulfato de prata.

Abstract– The transition of juvenile-to-adult phase in some plant species can be characterized by changes in leaf morphology (heteroblasty) and reproductive competence acquisition. Such changes are essentially mediated by two microRNAs: miR156 and miR172. Recently, in *Arabidopsis thaliana*, it has been shown that the miR156/*SQUAMOSA PROMOTER-BINDING LIKE PROTEINS* (*SPLs*) via is modulated by sugars, and there is an opposite correlation between miR156 expression levels and endogenous sugar contents. *Passiflora edulis* has been considered a species, prone for investigation on regulatory networks involving heteroblastic processes. Typically, the species displays during vegetative period a gradual change in leaf morphology, including alterations in both size and shape - from monolobate to trilobed leaves. Along with that a remarkable capacity in plant regeneration by means of *in vitro* organogenesis in a range of explants of *P. edulis*, the current work aimed to evaluate the role of different sugars and their concentration in promoting juvenile-to-adult phase transition of *P. edulis in vitro* and to provide further informations on the effect of sugars over the expression of miR156/*SPL9* and miR172 pathway. The findings demonstrated that sugar supply to cotyledonary explants, in especial glucose at 44 and 88 mM, plays an important role in modulating the juvenile-to-adult leaf traits of *P. edulis*. Furthermore, the addition of STS and AVG in cotyledons explants promoted better results regarding to regeneration of leaves and shoot buds mainly when combined with glucose at 44 mM, leading to greater number of leaves with variation on heteroblastic pattern. The expression of miR156 and miR172 levels were strictly correlated with heteroblastic process. Consistently, there was accumulation of miR156 transcripts in the treatments with higher neoformation of shoot buds and leaves with juvenile characteristics. On the other hand, miR172 showed an opposite pattern with higher transcript level in treatments in which the leaf morphogenetic pattern was changed. In *in situ* hybridization, the expression of *PeSPL9* showed a spatial distribution in shoot apex and leaf primordia. This suggests the association of *SPL9* in leaf morphogenesis during vegetative development of *P. edulis*. Here, it is proposed a model for heteroblastic studies through *in vitro* regeneration from juvenile explants of *P. edulis*. The results presented here increase current knowledge on the role of glucose as modulator molecule of the heteroblastic process in plants acting over miR156 and miR172 regulation.

Key words: Aminoethoxyvinilglycine, gene expression, glucose, passion fruit tree, morphogenesis, silver tiosulfate.

1. INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento pós-embrionário uma pequena população de células iniciais pluripotentes, presente no meristema apical caulinar, começa a produzir folhas iniciando a fase vegetativa juvenil da planta (Verdeil et al., 2007; Byrne, 2012; Tsukaya, 2013). Em algumas espécies vegetais a transição da fase juvenil para adulta é marcada por alterações na morfologia foliar, heteroblastia, e pela aquisição de competência reprodutiva mediada por respostas fisiológicas, genéticas e moleculares (Poethig, 2010; Huijser e Schmid, 2011; Poethig, 2013). A caracterização dos mecanismos genéticos e moleculares durante o processo de heteroblastia tem atraído interesse de vários grupos de pesquisa, principalmente em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (Wang et al., 2009; Tsukaya, 2013; Yu et al., 2013). Desde então, trabalhos recentes têm demonstrado que a ação sequencial de miR156 e miR172 modulam o controle temporal do desenvolvimento de fase vegetativa juvenil-adulto (Wu et al 2009; Yu et al., 2013; Wang et al., 2015; Xu et al., 2016; Nguyen et al., 2017).

No genoma de *Arabidopsis*, miR156 é codificado por 10 *loci* que codificam (MIR156A-MIR156j) e sua função biológica é exercida atuando na regulação de seus alvos, fatores de transcrição *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING LIKE PROTEINS* (*SPLs*) (Reinhart et al., 2002; miRBase, release 21.0). Os *SPLs* regulam vários processos fisiológicos durante o desenvolvimento da planta, a exemplo a transição da fase vegetativa juvenil-adulta, a elaboração de serrilhas marginais em folhas e o tempo de floração mediante a ativação de miR172 (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Rubio-Somoza et al., 2014; Yu et al., 2015). Como já relatado em diferentes espécies como *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* e *Solanum lycopersicum*, a expressão ectópica de miR156 promove maior produção de ramos laterais, seguido do aumento do número de folhas em decorrência da redução da dominância apical que, por conseguinte, promove atraso na mudança de fase vegetativa juvenil-adulta fazendo com que estas plantas permaneçam por mais tempo na fase juvenil (Schwab et al., 2005; Chuck et al., 2007; Wang et al., 2015).

O miR156 é altamente expresso em folhas jovens de *A. thaliana* e sua expressão diminui durante a transição da forma juvenil para a adulta, enquanto que miR172 apresenta o padrão oposto de expressão (Wu et al., 2009; Yu et al., 2015; Nguyen et al., 2017). Ainda, em *A. thaliana* mostrou-se que a via miR156/*SPL* é modulada por açúcares. Houve correlação negativa entre o nível de expressão de miR156 e o teor de açúcares endógenos, evidenciando o marcante papel dos açúcares sobre o

desenvolvimento heteroblástico (Yu et al., 2013; Yang et al., 2013). Ademais, estudos utilizando mutantes *caol/chlorinal* (*chl*) de *A. thaliana* com fotossíntese reduzida demonstraram atraso na mudança de fase vegetativa, sustentando o envolvimento dos açúcares e fotoassimilados na modulação dos traços heteroblásticos juvenil para adulto das folhas (Yang et al., 2013). O estudo de vias genéticas reguladas por microRNAs em plantas é relativamente recente, visto que a maioria dos estudos acerca das bases morfogênicas e moleculares que controlam o formato das folhas e a mudança de fase juvenil-adulta concentram-se em espécies como *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Z. mays* e *S. lycopersicum* (Chuck et al., 2007; Zang et al., 2011; Yu et al., 2013; Wang et al., 2015; Xu et al., 2016).

Passiflora edulis tem-se mostrado um potencial modelo para investigar as redes regulatórias que controlam o processo heteroblástico, visto que durante o período vegetativo da espécie observam-se mudanças graduais na morfologia foliar, incluindo alterações no tamanho e formato da folha (Cutri et al., 2013; Chitwood e Otoni, 2016, 2017). Contudo, não há relato na literatura sobre a atuação das redes regulatórias durante a mudança de fase vegetativa de *P. edulis*, principalmente aquelas moduladas via miR156/*SPL* responsáveis pelo processo de heteroblastia. Portanto, tal conhecimento poderá ser utilizado para facilitar o melhoramento e propagação de espécies comerciais de *Passiflora*, bem como subsidiar futuros estudos envolvendo aspectos evolutivos em Passifloraceae e subgêneros correlatos. Notadamente, a capacidade morfogênica do gênero *Passiflora* em regenerar plantas a partir de vários tipos de explantes via organogênese é bem compreendida, embora pouco se saiba sobre o papel modulador dos açúcares na transição de características foliares específicas da fase vegetativa juvenil-adulta de *P. edulis* (Garcia et al., 2011; Otoni et al., 2013; Vieira et al., 2014; Rocha et al., 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou analisar o papel de diferentes tipos e concentrações de açúcares na indução da transição de fase juvenil-adulta de *P. edulis in vitro* e o seu efeito sobre a expressão das vias miR156/*SPL* e miR172. Os resultados evidenciaram a glicose como o principal açúcar envolvido na indução dos processos heteroblásticos *in vitro* de folhas de *P. edulis*, mediante a modulação da via miR156/*SPL*, o que mostra que mudanças nos níveis do miR156 ao longo do desenvolvimento vegetativo regulam a transição da fase juvenil para adulta em *P. edulis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condução do experimento

Para indução da organogênese *in vitro* foram utilizadas sementes maduras de *Passiflora edulis* população FB300 (Viveiros Flora Brasil, Araguari, MG, Brasil). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

2.2 Efeito da sacarose, glicose e frutose na modulação da morfologia foliar durante o processo de heteroblastia *in vitro*

Explantes juvenis de cotilédones (6 mm²), de hipocótilo (8 a 10 mm) e da 4^a e 5^a folhas (6 mm²), oriundos das plântulas de *P. edulis* com 30 dias de cultivo, foram transferidos para frascos de vidro contendo 50 mL de meio ½ DREW (Drew, 1991) constituído de sais MS basais, complexo vitamínico B5, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 10 µM de 6-benziladenina (BA), 5 µM de cinetina, 2,5 µM de ácido indol-3-acético (AIA) e 2,5 g L⁻¹ de Phytigel®. Os tratamentos foram estabelecidos em meio suplementado e não-suplementado com diferentes tipos de açúcares (glicose, frutose e sacarose) em duas concentrações: 44 e 88 mM. Para evitar variáveis osmóticas indesejáveis entre os tratamentos foi utilizada a concentração molar como referência padrão para comparar as diferentes fontes de carbono (Paiva Neto e Otoni, 2003).

2.3 Influência do tiosulfato de prata (STS) e Aminoetoxivinilglicina (AVG) na eficiência regenerativa

A fim de melhorar a eficiência da indução da organogênese adventícia com folhas trilobadas em explantes cotiledonares, empregou-se a incorporação ao meio com inibidores da ação ou síntese de etileno. Para tanto, explantes juvenis de cotilédone (6 mm²) oriundos de plantas germinadas com 30 dias de cultivo, foram incubados em meio ½ DREW, conforme descrito em 2.2., acrescido de sacarose ou glicose a 44 ou 88 mM. A todas essas combinações foram acrescidos 10 µM de STS ou 3 µM de AVG. O meio foi gelificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel® e teve o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As soluções de STS e AVG foram esterilizadas em filtro Millex-GS com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, USA) e adicionadas ao meio de cultura após autoclavagem (15 min a 121 °C e pressão de 1,1 atm). A menos que especificado, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

2.4 Condições de cultivo *in vitro*

As culturas foram estabelecidas em frascos (250 mL de capacidade), vedados com tampa rígida de prolipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 µm de poros (Milipore®), contendo aproximadamente 50 mL de meio de cultura, mantidos sob temperatura de 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro), sob irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por 2 lâmpadas de LED com 17 W (Vilux®, 27 LLTV03, Brasil). A avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo, quando foram quantificados o número de brotações com ± 3 mm, o número de folhas monolobadas e trilobadas, e a taxa de mortalidade.

2.5 Extração de RNA e síntese de cDNA via ‘*pulsed-stem loop*’ RT-PCR

O RNA total foi isolado utilizando a solução TRI-Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América) e tratado com DNase I (Thermo Scientific NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, EUA), conforme recomendações do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada com auxílio do NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™) e a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (*RNAse free*).

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a metodologia *Pulsed-stem loop* RT-qPCR (Varkonyi-Gasic et al., 2007) a partir de 500 ng do RNA total. Juntamente com o RNA total tratado com DNase I foi adicionado 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl (1 mM) do iniciador RT específico do miRNA maduro e 1 µl de oligodT (500 ng/µl). As amostras foram incubadas a 70 °C por 10 min para desnaturação das estruturas secundárias e depois incubadas a 4 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 4 µl do tampão 5x RT e 1 µl da enzima MMLV *Reverse Transcriptase* (Ludwig Biotec®, Alvorada, Brasil). As reações foram incubadas a 16 °C, por 30 min, seguidas por transcrição reversa de 60 ciclos de 30 °C por 30 s, 42 °C por 30 s, e 50 °C por 1 s. Para inativação da enzima MMLV RT *Reverse Transcriptase*, a reação foi incubada a 85 °C durante 5 min. Subsequentemente, as reações foram armazenadas a -20°C.

2.6 Análise de RT-qPCR

Os perfis de expressão dos miR156, *SPL9* e miR172 foram analisados por RT-qPCR em tempo real utilizando um sistema *StepOnePlus*™ *Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Iniciadores dos genes miR156 e miR172, reguladores da transição

de fase vegetativo-reprodutivo da planta foram sintetizados de acordo com Varkonyi-Gasic et al. (2007). No caso do gene alvo *SPL9*, os iniciadores foram desenhados a partir de uma sequência do gene *SPL9* oriunda da clonagem gênica. Todas as amostras de RT-qPCR foram realizadas utilizando 20 ng de cDNA, 400 nM de cada primer, e qPCR SYBR- Green mix/Rox (Ludwig Biotec[®], Alvorada, Brasil) e água biodestilada (ddH₂O) para um volume final de reação 10 µL. O gene constitutivo actina foi usado como normalizador. As reações foram incubadas a 2 min a 50 °C e 10 min a 90 °C, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 16 s, 60 °C por 1 min, 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min, 95 °C por 30 s e 60 °C por 15 s. Os níveis de transcrição foram determinados usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

2.7 Amplificação e clonagem da sequência codificadora do gene *SPL9*

Para amplificação da sequência codificadora do gene *SPL9* de *P. edulis* (*PeSPL9*), um cDNA fita simples foi sintetizado a partir de 3,0 µg do RNA total proveniente de amostras de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento. Iniciadores degenerados (Tabela suplementar S1) foram desenhados a partir dos domínios conservados do gene *SPL9* de diferentes espécies vegetais disponíveis no National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para reação de PCR foram utilizados 2,0 µL de cDNA, dNTPs (0,2 mM cada), 200 nM de cada iniciador e 0,2 µL da Taq DNA polimerase Platinum High Fidelity[®] (Invitrogen). A reação foi realizada em termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) usando: desnaturação a 94 °C, seguido de 35 ciclos a 94 °C (1 min), 54 °C (1 min), 68 °C (1 min) e extensão final a 68 °C (5 min).

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, e purificados com o Kit Wizard[®] SV Gel and PCR clean up (Promega[®]). Os fragmentos foram ligados no vetor pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega[®]) e introduzidos em células ultracompetentes de *Escherichia coli* (DH 5α), por choque térmico. A presença do inserto foi confirmada a partir da clivagem do DNA plasmidial das colônias brancas com a enzima de restrição *EcoRI*.

2.8 Obtenção da sequência completa do gene *SPL9* por 5' e 3' RACE (*Rapid Amplification cDNA Ends*)

Para obtenção da cDNA full-length do gene *SPL9*, RNA poli A+ foi isolado a partir do RNA total de folhas, utilizando o kit Dynabeads[®] mRNA Purification (Life

Technologies), e usado como molde para construção de uma biblioteca de cDNA fita-dupla usando o kit Marathon[®] cDNA Amplification (Clontech). Iniciadores internos específicos, senso e antisenso, foram desenhados (Tabela suplementar S1) a partir dos clones anteriormente sequenciados e combinados com os primers AP1 e AP2 do adaptador. As reações de 5' e 3' RACE foram conduzidas, utilizando a Taq DNA polimerase Advantage[®] (Clontech), seguindo as recomendações do fabricante. Os fragmentos foram clonados conforme descrito anteriormente.

2.9 Análise de sequências e inferência filogenética do gene *SPL9* de *P. edulis*

Clones selecionados pela análise de restrição foram sequenciados nos sentidos senso e antisenso, com os iniciadores universais M13. O sequenciamento foi realizado pela empresa MacroGen, Coreia do Sul. Os cromatogramas foram processados usando o programa PHRED (Ewing et al., 1998) e a montagem das sequências consensos realizada pelo programa CAP3 (Huang e Madan, 2005). Os contigs gerados foram comparados com as sequências disponíveis nos bancos de dados do NCBI e TAIR com o emprego do algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997). O programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) foi utilizado para identificação do frame de leitura e predição da proteína. A identificação dos domínios conservados foi realizada através do banco CDD (*Conserved Domain Database*) do NCBI, por meio da ferramenta BlastP. Um alinhamento múltiplo com sequências de outras proteínas *SPL9* disponíveis foi gerado usando o CLUSTALW (Thompson et al., 1994). O relacionamento filogenético da sequência de *P. edulis* com outras espécies vegetais foi verificado por meio de uma árvore construída com o método *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987) no programa MEGA versão 7.0 (Kumar et al., 2016). A confiabilidade de cada ramo foi estimada via *Bootstrap* (Felsenstein, 1985) para 1000 repetições.

2.10 Caracterização do padrão de expressão do gene *SPL9* por hibridização *in situ*

2.10.1 Produção das sondas sense e antisense

Sondas de RNA sense e antisense foram construídas a partir de um fragmento clonado 3' RACE contendo parte do domínio C-terminal e a região 3'UTR do gene, flanqueado pelos promotores T7 e SP6. O fragmento foi amplificado a partir do DNA plasmidial com os iniciadores T7 e SP6. As sondas marcadas com digoxigenina

conjugada (DIG-UTP) foram sintetizadas por transcrição *in vitro* usando o *DIG RNA Labeling Kit* (SP6/T7), segundo recomendações do fabricante (Roche Applied Science).

2.10.2 Localização de transcritos do gene *SPL9* por hibridização *in situ*

Amostras de setores dos explantes hipocotiledonares, com estruturas caulinares formadas via organogênese adventícia *in vitro*, foram coletadas e fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 16 h. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente e gradativamente infiltradas em parafina Histosec[®] (MERCK, Alemanha). Secções de 4 µm, obtidas em micrótno de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA), foram transferidas para lâminas histológicas silanadas Fisherbrand[®] (Fisher Scientific, EUA). A hibridização foi realizada com uma mistura contendo 60 ng de sonda e 60 ng de tRNA de levedura (Gibco BRL[®]) e 100 µL de tampão de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 NaCl 300 mM, formamida 50 %, EDTA 1 mM pH 8,0; solução de Denhardt 1X). As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro, por 16 h. As etapas de lavagem das lâminas, detecção imunológica e coloração foram conduzidas conforme Vieira (2015). A análise e registro das imagens foram realizados em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-Photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.), usando o programa Spot Basic.

2.11 Determinação do conteúdo de açúcares

Amostras de cotilédones, hipocótilos e folhas foram submetidas à extração etanólica determinando-se, na fração solúvel, os teores de glicose, frutose e sacarose segundo metodologia descrita por Fernie et al. (2001). Inicialmente, em cada microplaca foram adicionados em cada poço 160 µL do meio de reação (HEPES/KOH 100 mM com MgCl₂ a 3 mM pH 7, ATP a 118 mM, NADP⁺ a 48,4 mM, e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato - G6PDH (5 mg mL⁻¹), totalizando 50 µL do extrato. Por meio de um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) foram realizadas leituras das absorvância a 340 nm com intervalos entre leituras de um minuto. Uma vez ocorrida a estabilização da densidade ótica (OD), adicionou-se 5 µL, sucessivamente, das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5 U por reação), após intervalo aproximado de 25 minutos entre cada aplicação. Para estimar a concentração dos açúcares, resultados

expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$, utilizou-se equação baseada na lei de Lambert-Beer: $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD}/(2,85 \times 6,22)$.

2.12 Determinação do conteúdo de amido

A concentração de amido foi determinada como descrito previamente por Fernie et al. (2001). Aos tubos contendo o precipitado resultante da extração etanólica e o NaOH 0,1 M, foram adicionados 70 μL de ácido acético 1 M, para neutralização do extrato. Uma alíquota de 40 μL da suspensão foi retirada e colocada em uma microplaca, o qual continha 60 μL do mix de hidrólise do amido, composto pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades μL^{-1}) e α -amilase (0,01 U μL^{-1}) ressuspendidas em acetato de sódio 0,5 M pH 4,9. A microplaca foi vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425®) e incubada por uma hora a 55 °C, com leve agitação (400 rpm). Posteriormente, 50 μL do extrato hidrolisado foram transferidos para uma microplaca nova, que continha 160 μL do meio de reação composto por tampão Hepes/KOH a 1M pH 7,0 MgCl_2 a 3 mM, ATP a 118 mM, NADP⁺ a 48,4 mM e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato— G6PDH (0,7 unidades μL^{-1}), por poço. Por meio de um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) foram lidas as absorvâncias das respectivas amostras a 340 nm, com um minuto de intervalo entre leituras. Uma vez estabilizado a OD, foi adicionado aos poços 2 μL de hexocinase (2 unidades por reação). O conteúdo de amido foi então calculado de acordo com a equação Lambert-Beer e os resultados expressos em μmol de glicose por g de matéria fresca (MF).

2.13 Avaliações e análises estatísticas

A unidade experimental dos parâmetros avaliados como morfogênese *in vitro*, e quantificações de açúcares, foi composta de cinco repetições constituídas cada por um frasco, contendo 10 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para a comparação das médias dos tratamentos, foi realizado o teste de Scott e Knott a 5% de significância. Para análise de expressão gênica 3 repetições foram utilizadas e o teste de Dunnett a 5% de significância foi aplicado.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito do fornecimento de açúcares na manutenção ou perda das características juvenis de *P. edulis in vitro*

No presente trabalho foi observado que o processo organogênico em explantes de cotilédones, hipocótilos e folha de *P. edulis* foi assincrônico. Estruturas foliares e gemas caulinares, em diferentes estádios de desenvolvimento foram observadas no mesmo explante após 30 dias de cultivo. Além disso, os dados evidenciaram uma correlação entre o tipo de explante e concentrações de açúcares fornecidos com a mudança de fase vegetativa juvenil-adulta de *P. edulis in vitro* (Tabela 1). Os explantes hipocotiledonares, quando cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de açúcares, apresentaram maior número de brotações em relação aos cotiledonares e foliares, contudo o mesmo não foi acompanhado do alongamento das estruturas caulinares formadas via organogênese adventícia *in vitro*. Por outro lado, explantes cotiledonares apresentaram as melhores médias quanto ao número de folhas monolobadas para todos os tratamentos (Tabela 1). Ademais, quando os mesmos foram cultivados em meio suplementado com glicose a 44 e 88 mM e frutose a 88 mM, houve notáveis alterações na morfologia das folhas associada ao processo de heteroblastia, sobretudo quanto à maior frequência de regeneração de folhas trilobadas. Não obstante, foi também verificado que os tratamentos com frutose (44 e 88 mM) foram os que apresentaram maiores valores de mortalidade (Tabela 1) em decorrência da despigmentação dos explantes. Por isso, os tratamentos de frutose foram retirados das análises adicionais descritas abaixo. Em contrapartida, os tratamentos de sacarose e glicose mostraram menores valores de mortalidade.

Em resumo, os resultados mostraram que mesmo hipocótilo apresentando melhores valores quanto ao número de brotações, os explantes cotiledonares sobressaíram em relação à indução de folhas monolobadas e trilobadas. Destaque-se que os resultados sugerem que o fornecimento de açúcares aos explantes cotiledonares, em especial glicose, pode ter um papel preponderante na modulação da transição da forma juvenil para adulta da folha de *P. edulis in vitro*. Diante do exposto, a fim de melhorar a eficiência da indução da organogênese adventícia em explantes cotiledonares, e à busca do maior controle e reprodutibilidade da modulação da obtenção de folhas adultas, empregou-se a incorporação ao meio com inibidores da ação ou síntese de etileno.

Tabela 1. Efeito da adição de açúcares nas respostas morfológicas durante o processo de heteroblastia de folhas *Passiflora edulis in vitro*.

BROTAÇÕES (%)				
Açúcares	Explantes			
	Cotilédone	Hipocótilo	Folha	
Sem açúcares	48 Aa	1 Cb	4 Ab	
Sacarose 44 mM	50 Ab	88 Aa	14 Ac	
Sacarose 88 mM	38 Aa	24 Ba	10 Aa	
Glicose 44 mM	48 Ab	92 Aa	12 Ac	
Glicose 88 mM	44 Ab	72 Aa	14 Ac	
Frutose 44 mM	22 Ab	76 Aa	0 Ab	
Frutose 88 mM	30 Aa	2 Cb	8 Ab	
FOLHAS MONOLOBADA (%)				
Açúcares	Explantes			
	Cotilédone	Hipocótilo	Folha	
Sem açúcares	38 Aa	0 Bb	4 Ab	
Sacarose 44 mM	32 Aa	36 Aa	6 Ab	
Sacarose 88 mM	16 Aa	6 Ba	4 Aa	
Glicose 44 mM	32 Aa	4 Bb	10 Ab	
Glicose 88 mM	40 Aa	12 Bb	8 Ab	
Frutose 44 mM	20 Aa	4 Bb	1 Ab	
Frutose 88 mM	28 Aa	4 Bb	6 Ab	
FOLHAS TRILOBADAS (%)				
Açúcares	Explantes			
	Cotilédone	Hipocótilo	Folha	
Sem açúcares	4 Ba	0 Aa	2 Aa	
Sacarose 44 mM	0 Ba	0 Aa	4 Aa	
Sacarose 88 mM	2 Ba	2 Aa	0 Aa	
Glicose 44 mM	10 Aa	0 Aa	2 Aa	
Glicose 88 mM	20 Aa	8 Ab	6 Ab	
Frutose 44 mM	4 Ba	0 Aa	0 Aa	
Frutose 88 mM	12 Aa	0 Ab	4 Ab	
MORTALIDADE (%)				
Açúcares	Explantes			
	Cotilédone	Hipocótilo	Folha	
Sem açúcares	32 Bb	98 Aa	26 Bb	
Sacarose 44 mM	14 Ba	0 Ba	22 Ba	
Sacarose 88 mM	16 Ba	2 Ba	10 Ba	
Glicose 44 mM	22 Ba	0 Bb	44 Aa	
Glicose 88 mM	22 Ba	0 Ba	8 Ba	
Frutose 44 mM	47 Aa	0 Bb	54 Aa	
Frutose 88 mM	50 Aa	0 Bb	72 Aa	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Valores são apresentados como médias de cinco repetições biológicas independentes.

A adição de STS e AVG, combinada com as concentrações de glicose e sacarose aumentou, aproximadamente, duas vezes a frequência média de regeneração dos explantes cotiledonares (Tabela 2) quando comparadas com os mesmos tratamentos mostrados na Tabela 1. A incorporação de STS ou AVG ao meio de cultura contribuiu para o aumento das médias do número de brotações e folhas monolobadas. Todavia, não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações dos açúcares, com exceção do tratamento glicose a 88 mM, acrescido com AVG, que promoveu redução da média de folhas monolobadas. Os explantes cotiledonares cultivados em meio adicionado de STS ou AVG mostraram-se mais responsivos no que diz respeito à alteração do padrão heteroblástico, especialmente, quando combinados com a concentração de 44 mM de glicose onde ocorreu maior frequência de emissão de folhas trilobadas.

Tabela 2. Efeito de combinações de açúcares com inibidores da ação (STS) e síntese (AVG) de etileno sobre morfogênese *in vitro* em explantes cotiledonares de *Passiflora edulis*

Açúcares		Brotações (%)	Folha Monolobada (%)	Folha Trilobada (%)	Mortalidade (%)
Sem açúcar		47 b	42 B	0 b	33 a
Sem açúcar	STS	48 b	37 B	3 b	27 a
Sem açúcar	AVG	58 b	50 B	0 b	22 b
Glicose 44 mM	STS	93 a	85 A	48 a	0 c
Glicose 44 mM	AVG	97 a	88 A	42 a	2 c
Glicose 88 mM	STS	85 a	73 A	13 b	3 c
Glicose 88 mM	AVG	73 a	56 B	8 b	17 b
Sacarose 44 mM	STS	100 a	91 A	17 b	0 c
Sacarose 44 mM	AVG	87 a	70 A	17 b	8 c
Sacarose 88 mM	STS	93 a	78 A	15 b	0 c
Sacarose 88 mM	AVG	92 a	68 A	18 b	0 c

STS: tiossulfato de prata; AVG: aminoetoxivinilglicina

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott ($P < 0.05$). Valores são apresentados como médias de seis repetições biológicas independentes.

Nesta fase, os dados encontrados corroboram com os achados anteriores em que glicose desempenha um papel chave na modulação da forma juvenil para adulta da folha de *P. edulis*, alterando o padrão morfogênico de monolobada para trilobada, indicativo de mudança de fase vegetativa da espécie. Na Figura 1, pode-se observar alterações do padrão heteroblástico de *P. edulis in vitro*, tais como mudanças na forma e no tamanho das folhas, como sucessiva perda das características juvenis.

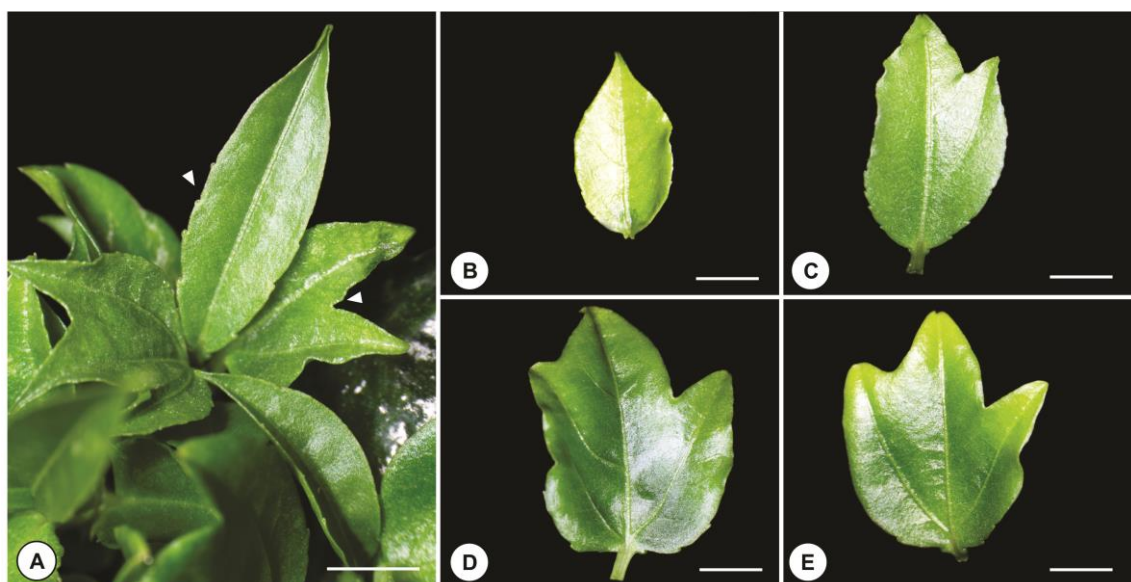


Figura 1. Marcadores visíveis de transição de desenvolvimento foliar juvenil-adulta *in vitro* de *Passiflora edulis*. (A) As folhas jovens diferem das folhas adultas na relação comprimento/largura da lâmina foliar, produção de serrilha na margem foliar e formação de lóbulos (seta branca); (B) Folha jovem (monolobada); (C-D) Folha em fase intermediária de desenvolvimento, em que ambos os tipos de marcadores juvenil-adulta estão presentes na mesma folha; (E) Folha adulta (trilobada). Barra = 3mm.

3.2 Efeito dos diferentes tipos de explantes e fontes de carbono no perfil de expressão gênica de miR156, *SPL9* e miR172

Tendo em vista que os tipos de explantes diferem na frequência de emissão de folhas monolobadas e trilobadas, sendo dependente da fonte de carbono, o próximo passo foi investigar o perfil de expressão gênica dos microRNAs (miR156 e miR172) bem como *SPL9* via RT-qPCR, nas condições anteriormente citadas (Figura 2).

Em relação ao perfil de expressão de miR156, no meio sem fonte de açúcar não houve diferença significativa entre os diferentes tipos de explantes (Figura 2A). A adição de glicose ou de sacarose afetou de maneira distinta o padrão de expressão do miR156, dependendo do tipo de explante. A glicose regulou positivamente a expressão de miR156 em cotilédones, nas duas concentrações testadas (44 e 88 mM), porém apenas a concentração de 88 mM foi capaz de estimular a expressão de miR156 em hipocótilo. Ademais, vale ressaltar que glicose não teve efeito quanto ao cultivo de explantes foliares. Quando a sacarose foi usada como fonte de carbono em explantes cotiledonares não houve indução da expressão de miR156, enquanto que nos hipocotiledonares, sob 44 mM de sacarose, e foliares, em ambas concentrações, houve aumento dos níveis de expressão de miR156.

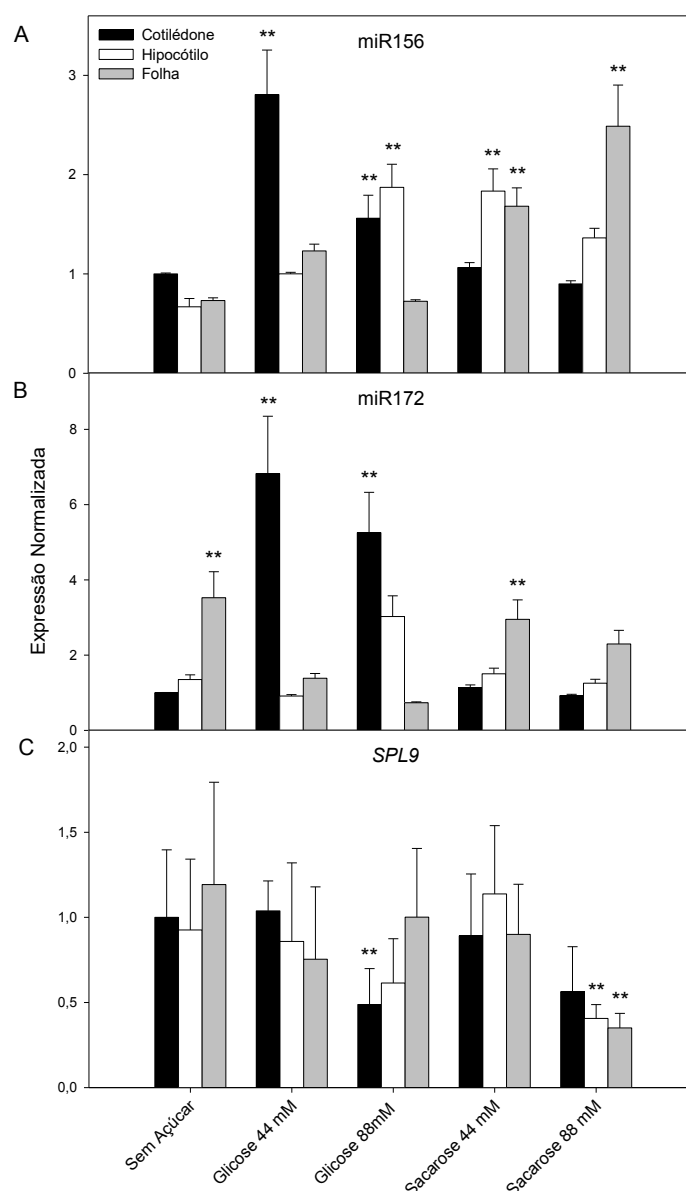


Figura 2. Expressão relativa dos genes miR156 (A), miR172 (B) e *SPL9* (C) durante a mudança da fase juvenil-adulta via organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* em diferentes tipo de explante e concentrações de açúcares. Barras representam o erro padrão e os asteriscos designam diferenças estatísticas ($P < 0.05$) pelo teste de Dunnett. Valores são apresentados como médias de três repetições biológicas independentes.

As diferentes fontes de açúcares modularam o perfil de expressão de miR172 de maneira distinta entre os explantes avaliados. Os tratamentos suplementados com glicose mostraram aumento significativo nos níveis de miR172 em explantes cotiledonares (Figura 2B). Por outro lado, quanto esse explante foi cultivado em meio suplementado com sacarose não houve variação nos níveis de transcritos de miR172. Contrastando ao mostrado anteriormente, os explantes foliares tiveram aumento significativo de expressão

de miR172 nos tratamentos sem fontes de açúcar ou apenas na menor concentração de sacarose testada. Finalmente, os transcritos de miR172 de explante hipocotiledonar não se mostrou respondente a qualquer um dos tratamentos avaliados (Figura 2B).

Por fim, o gene que codifica o fator de transcrição *SPL9* foi avaliado (Figura 2C). O transcrito de *SPL9* apresentou um padrão de expressão com pouca variação entre os diferentes tratamentos de fontes de açúcares analisados. O tratamento de glicose resultou em redução dos níveis dos transcritos do gene *SPL9* em explante cotiledonar não mostrando alterações desse transcrito nos demais explantes. Por outro lado, quando avaliado o tratamento suplementado com sacarose, o mesmo padrão de diminuição de expressão de *SPL9* foi observado somente em explantes hipocotiledores e foliares. Interessante que os demais tratamentos não apresentaram variações significativas quanto ao perfil de *SPL9*, e mais, que apenas altas concentrações de glicose ou sacarose foram capazes de diminuir a expressão de *SPL9* em explantes cotiledonar ou hipocotiledonar e foliar, respectivamente (Figura 2C).

3.3 Clonagem de *SPL9* de *P. edulis* (*PeSPL9*) e análise filogenética

A amplificação da sequência codante do gene *PeSPL9* usando primers degenerados, seguidos por complementação das sequências por RACE possibilitou a sua clonagem e caracterização da sequência completa em *P. edulis*. O RNA mensageiro completo possui 1534 pb sendo a ORF (*Open Reading Frame*) de 1110 pb, codificando uma proteína de 339 aminoácidos. A comparação da sequência da proteína *PeSPL9* com outras espécies disponíveis no NCBI e Tair revelou similaridade de 72%, 65%, 60%, 60% e 43% com *Ricinus communis*, *Vitis vinifera*, *Eucalyptus grandis*, *Citrus sinensis* e, *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. O grau de conservação das sequências e a presença do domínio estrutural SBP característico dessa proteína é observado no múltiplo alinhamento das sequências, bem como o sítio alvo de ligação do miR156. O domínio SBP possui aproximadamente 80 resíduos de aminoácidos, com a presença dos dois sítios de ligação do tipo zinc-finger: Zn1 com característica Cys-Cys-His-Cys e outro Zn2 Cys-Cys-Cys-His conservados (Figura 3).

A árvore filogenética construída a partir do alinhamento com proteínas *SPL9* de outras espécies vegetais mostrou a formação de grupos distintos, sustentados por valores de bootstrap acima de 50%. A sequência clonada agrupou-se no clado referente a *SPL9* indicando o sucesso do procedimento de clonagem e que a sequência gerada é adequada

para construção da sonda complementar para o uso de estudo de expressão gênica via hibridização *in situ*. Ademais, *P. edulis* sendo membro da família Passifloraceae teve seu

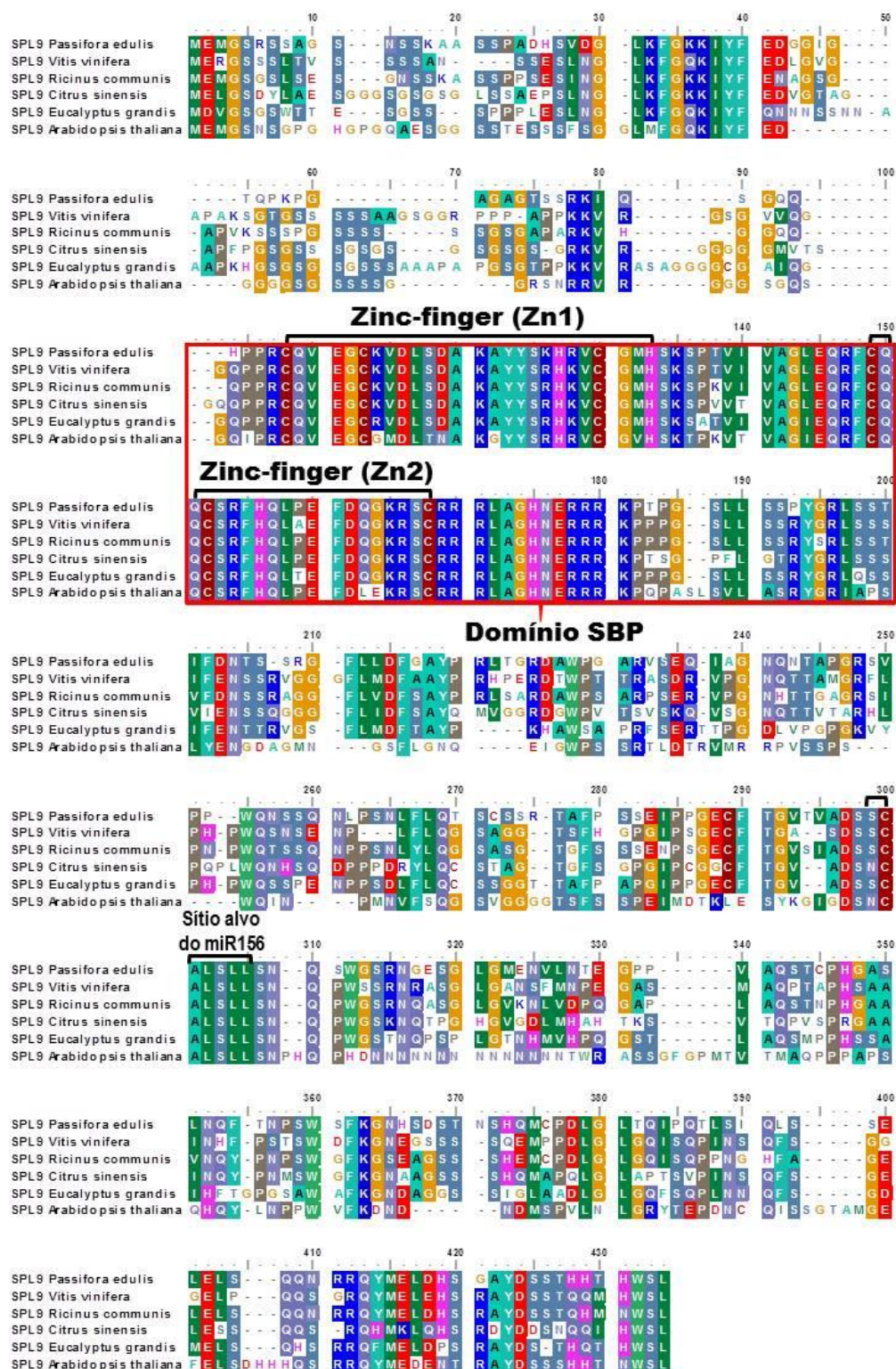


Figura 3. Comparação da sequência de aminoácidos deduzidos de *SPL9* de *Passiflora edulis*, *Vitis Vinifera*, *Ricinus communis*, *Citrus sinensis*, *Eucalytus grandis* e *Arabidopsis thaliana* usando o software ClustalW. O alinhamento entre as sequências revela as duas estruturas zinc-finger que fazem parte do domínio conservado SBP-box dos fatores de transcrição da família *SPL*. Gaps incluídos para otimizar o alinhamento são indicados por “-”.

gene *PeSPL9* agrupando-se próximo as espécies como: *Jatropha curcas*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis* (membros da família Euphorbiaceae) e *Populus euphratica* (membro da família Saliciaceae), todas, bem como *P.edulis*, pertencentes a Ordem das Malpighiales.

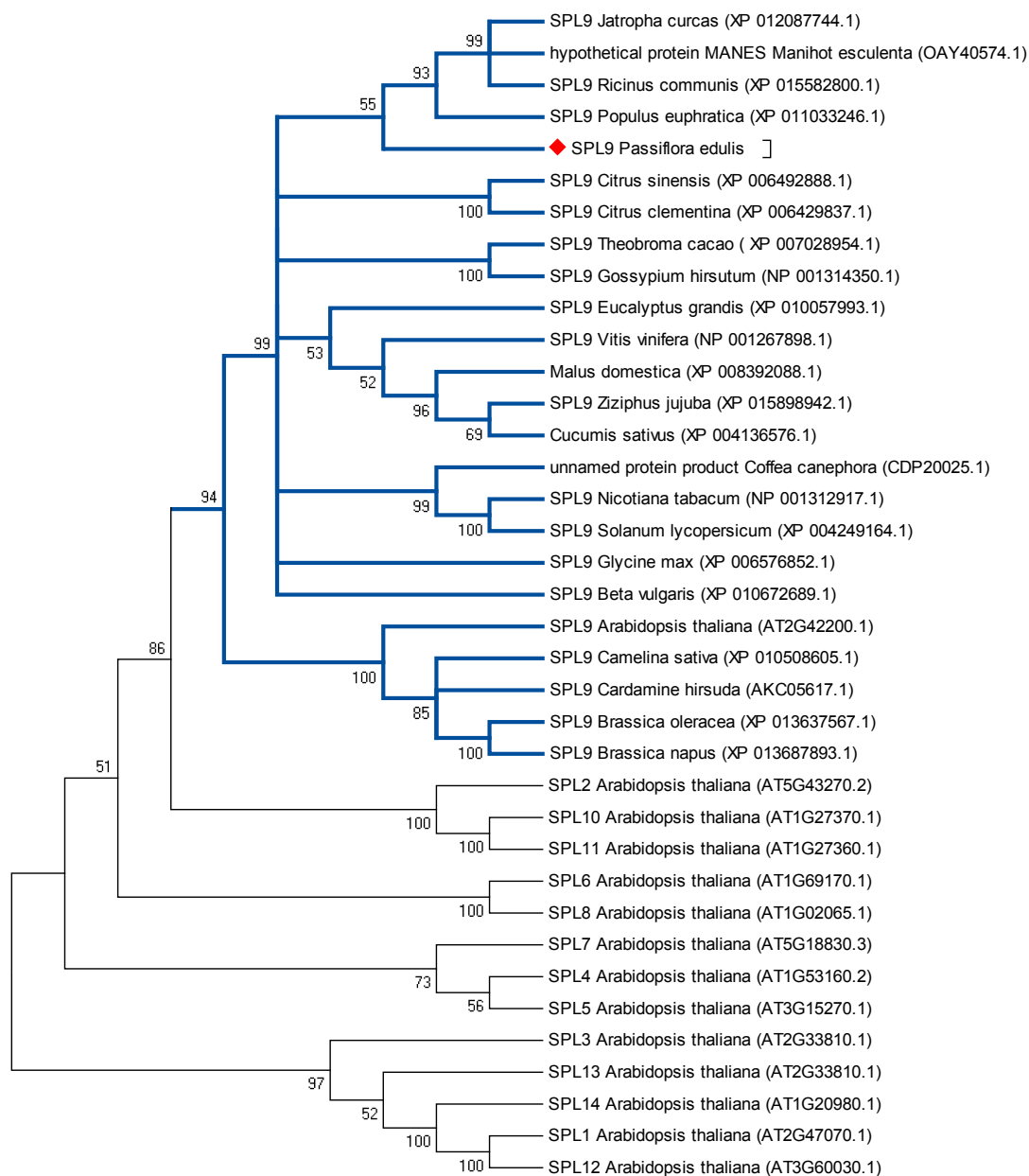


Figura 4. Árvore filogenética de 37 sequências de aminoácidos deduzidos da família SPL. A árvore filogenética foi criada usando o software MEGA7 enquanto que a matriz de distância foi baseada no método neighbor-joining. Os números nas ramificações indicam valores de Bootstrap em que são apresentados apenas os valores acima de 50%. Os nomes das sequências bem como os códigos de acesso no banco de dados do NCBI e TAIR estão presentes na figura.

3.4 Distribuição espacial de *PeSPL9* durante a formação de primórdios foliares de *P. edulis* via hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* possibilitou a caracterização da expressão do gene *PeSPL9* ao longo da neoformação de gemas caulinares e folhas de brotos formados via organogênese *in vitro*. Em segmentos de hipocótilo, evidenciou-se a neoformação direta de meristemoides em diferentes estádios de desenvolvimento, 15 dias após a indução (Figura 5A), com subsequente desenvolvimento de gemas caulinares (Figura 5B). As análises anatômicas desse processo evidenciaram que os explantes hipocotiledonares em fases iniciais de regeneração, apresentaram células epidérmicas e corticais em desdiferenciação com subsequente formação de meristemoides. Pode-se observar nessas regiões a coloração vermelho escuro a marrom, sinal característico da presença de transcritos do gene *PeSPL9* quando tratados com a sonda antisenso (Figura 5C). Por sua vez, nas regiões subepidérmicas onde não foram observados os processos de desdiferenciação celular e formação de meristemoides o sinal de expressão de *PeSPL9* não foi detectado (Figura 5C). Em gemas caulinares desenvolvidas a partir dos meristemoides foram detectados transcritos do gene *PeSPL9*, bem como nos flancos de iniciação dos primórdios foliares (Figura D). Interessantemente, nos primórdios foliares em expansão, houve forte sinal de expressão do gene *PeSPL9*, principalmente em células epidérmicas da face abaxial da lâmina foliar (Figura 5E e F).

3.5 Quantificação de glicose, frutose, sacarose e amido nos diferentes explantes crescidos em concentrações distadas de açúcares

As análises bioquímicas revelaram que entre os diferentes explantes não houve alterações significativas no conteúdo de glicose endógeno, quando cultivados em condição de ausência de açúcar (Figura 6A). No geral, ambos os tratamentos de sacarose mostraram os valores mais altos de glicose endógenos. Embora, o tratamento sacarose 44 mM tenha mostrado que explante foliar teve maior conteúdo de glicose endógeno entre os explantes analisados, nenhuma distinção foi observada entre os explantes quanto estes foram submetidos a concentração de sacarose 88 mM, mesmo que os valores de glicose endógenos tenham sido mais elevados. Por sua vez, o tratamento de glicose a 44 mM mostrou um padrão semelhante ao tratamento sem açúcar no meio de cultura no que diz respeito ao conteúdo de glicose endógeno nos diferentes explantes. Curiosamente, o explante cotiledonar comportou-se de maneira distinta dos outros dois explantes, quando

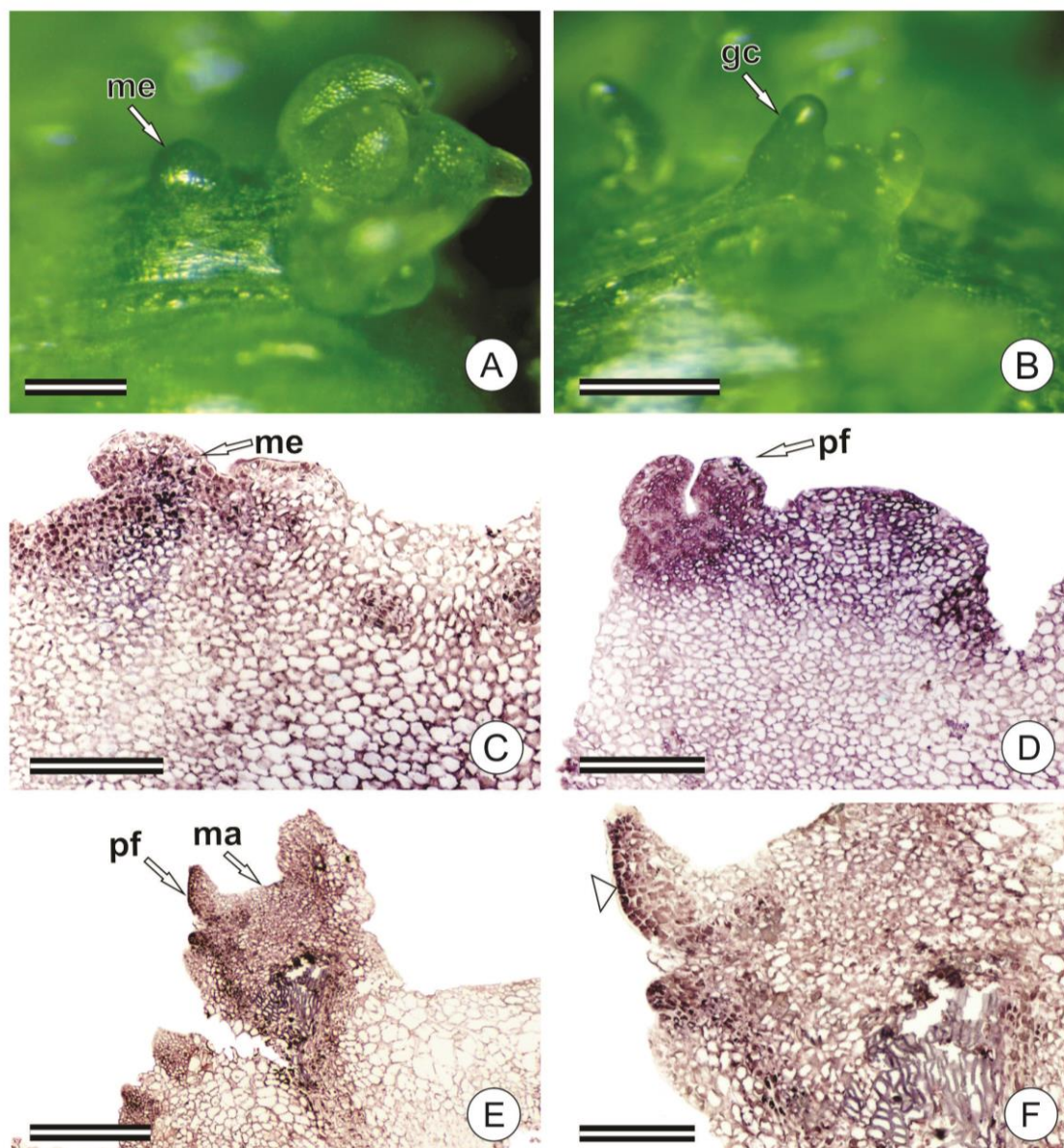


Figura 5. Hibridização *in situ* evidenciando a expressão do gene *PeSPL9* durante a indução de organogênese *in vitro* em explantes hipocotiledonares em *Passiflora edulis*. (A-B) Caracterização morfológica do início da formação do meristemoides, seguida do desenvolvimento de gemas caulinares; (C) Cortes histológicos do início da formação do meristemoides, evidenciando a expressão do gene *PeSPL9* em células epidérmicas e parenquimáticas durante o processo de desdiferenciação; (D-E) Detecção do transcrito do gene *PeSPL9* na região do meristema apical caulinar e nos flancos de iniciação dos primórdios foliares; (F) Sinal de expressão do gene *PeSPL9* em células epidérmicas da face abaxial da lâmina foliar (ponta de seta). Legenda: **me**: meristemoides; **gc**: gema caulinar; **ma**: meristema apical caulinar; **pf**: primórdio foliar. Foto de estereomicroscópio (A e B). Microscopia de luz (C, D, E e F). Barra = **200 µm** (A e B), **150 µm** (C, D e F), **400 µm** (E).

cultivados em meio acrescido de 88 mM de glicose, revelando aumento dos valores de glicose endógenos. Contudo, esse valor encontrado em explantes cotiledonares, nos tratamentos de glicose, é ainda igual ou aproximadamente 2 vezes menor do que os tratamentos de sacarose a 44 e 88 mM, respectivamente.

O mesmo padrão, mostrado acima, foi encontrado para o conteúdo de frutose endógeno, nos diferentes tratamentos (Figura 6B). Novamente, os valores mais expressivos de frutose endógenos foram encontrados nos tratamentos com sacarose. No tratamento sacarose a 44 mM, tanto o explante cotiledonar quanto o foliar foram duas apresentaram conteúdo de frutose endógeno duas vezes maiores do que nos explantes hipocotiledonares. E mais, no tratamento de sacarose a 88 mM, todos os explantes aumentaram os valores de frutose endógenos quando comparado com tratamento sacarose a 44 mM. Porém, mas foi o explante cotiledonar que apresentou os mais altos valores para frutose endógenos. Ambos os tratamentos de glicose mostraram poucas variações quando comparados ao tratamento controle (sem açúcar), revelando concentrações basais de frutose endógena.

Uma considerável redução no conteúdo de sacarose endógena foi observada em explante de hipocótilo, quando cultivado em condição de ausência de açúcar (Figura 6C). Por sua vez, explantes cultivados em meio suplementado com glicose 44 mM apresentaram poucas alterações na concentração de sacarose endógena, não diferindo significativamente entre si. Não obstante, a concentração 88 mM de glicose no meio mostrou altos valores de sacarose endógena somente em explante hipocotiledonar. Por outro lado, o tratamento sacarose 44 mM não evidenciou diferença significativa no conteúdo endógeno de sacarose entre os explantes, ao passo que na maior concentração de sacarose 88 mM foi observado valores expressivos de sacarose endógena apenas no explante hipocotiledonar.

Por fim, os valores de amido nos diferentes explantes e sua variação em relação aos tratamentos avaliados foram mensurados (Figura 6D). Em todos os tratamentos, os explantes hipocotiledonares e foliares sofreram poucas alterações na concentração de amido. Em contrapartida, o explante cotiledonar mostrou variação no conteúdo de amido nos tratamentos de glicose (44 e 88 mM). Nesses tratamentos, os valores de amido foram, aproximadamente, duas vezes menores quando comparados ao tratamento controle (ausência de açúcar). Com relação aos tratamentos de sacarose, os resultados mostraram que amido tende a não alterar sua abundância, mantendo-se semelhante com os valores

do tratamento controle sendo encontrado aproximadamente duas vezes mais do que aquele medidos nos tratamentos com glicose.

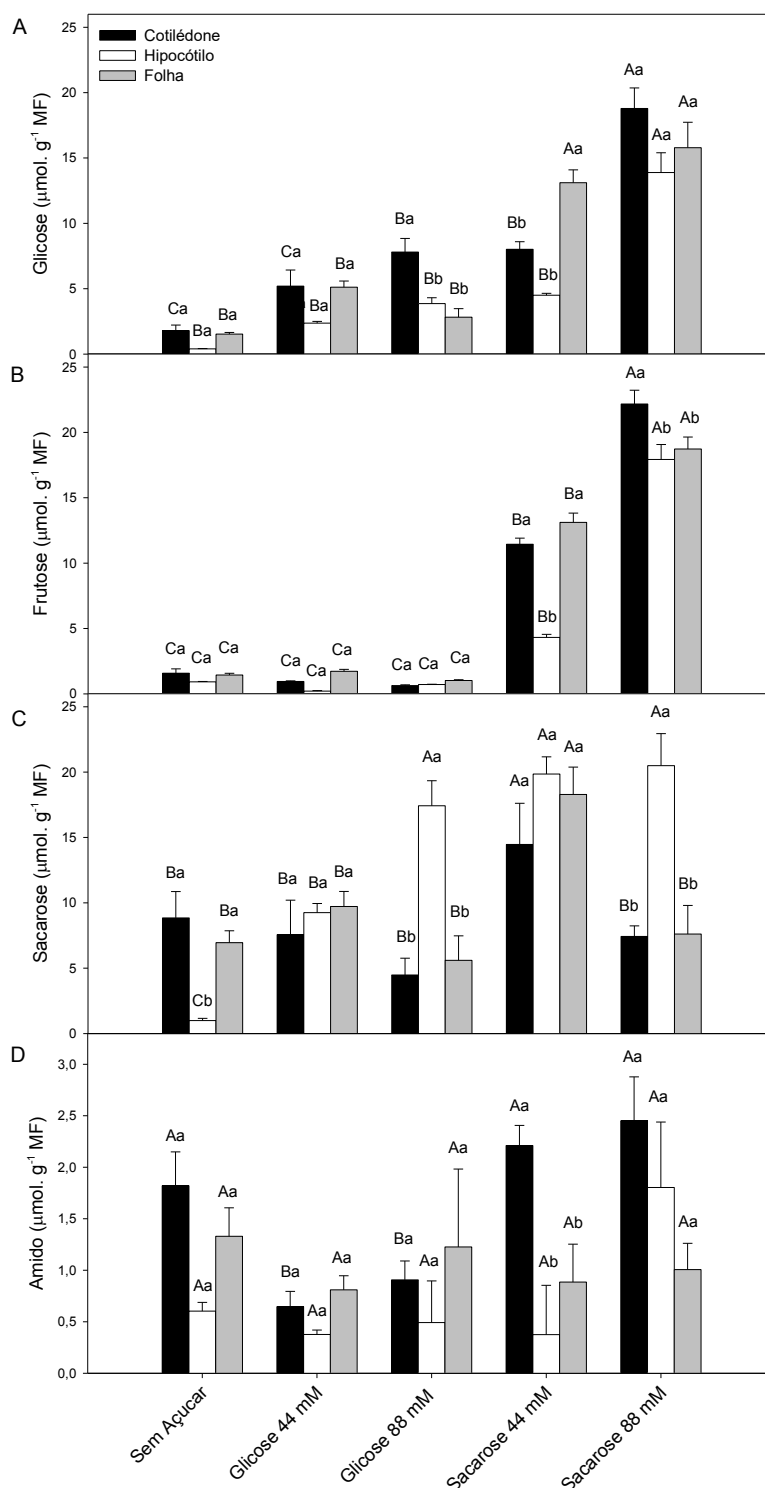


Figura 6. Variação no conteúdo de glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D) entre os diferentes explantes durante a indução de mudança da fase juvenil-adulta via organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis*. Barras representam o erro padrão e letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$). Valores são apresentados como médias de cinco repetições biológicas independentes.

4. DISCUSSÃO

Estudos realizados ao longo de várias décadas têm evidenciado o efeito significativo dos açúcares metabolizáveis sobre o desenvolvimento heteroblástico *in vitro* (Allsopp, 1953; Sussex e Clutter, 1960; Feldman e Cutter, 1970). Allsopp (1953), demonstrou que plantas de *Marsilea drummondii* cultivadas na ausência de fonte exógena de açúcar produziram apenas folhas jovens, não obstante meio suplementado com açúcares metabolizáveis acelerava a produção de folhas adultas. Além disso, foi observado que a cultura de ápices de ramos adultos, bem como explantes foliares em meio contendo baixa concentração de açúcar prolonga a produção de traços juvenis da folha (Sussex e Clutter, 1960; Orkiszewski e Poethig, 2000). Os resultados aqui obtidos (Tabela 1) mostraram, que dentre os diferentes explantes cultivados em presença de fonte de açúcar, cotilédones sobressaíram em relação à indução de folhas com características adultas, evidenciando, pois, uma ligação entre o tipo de explante e o fornecimento de açúcar com a mudança de fase vegetativa juvenil-adulta de *P. edulis in vitro*.

Estudos recentes com *A. thaliana* sugerem que o efeito marcante do açúcar sobre o desenvolvimento heteroblástico é atribuível a seu efeito regulatório sobre a expressão de miR156, regulador evolutivamente conservado durante a mudança da fase vegetativa juvenil-adulta (Wang et al., 2009; Yang et al., 2013; Fouracre e Poethig, 2016). Yang et al. (2011) demonstraram em *A. thaliana*, que a identidade foliar juvenil *versus* adulta foi atrasada quando as duas primeiras folhas da plântula foram removidas; além disso esse efeito foi associado ao aumento significativo dos níveis de expressão do miR156, sugerindo que a mudança de fase vegetativa é promovida por um sinal derivado das folhas.

Em *A. thaliana*, o envolvimento de carboidratos na mudança de fase vegetativa foi testado examinando o efeito de vários açúcares sobre a modulação da expressão de miR156. Os resultados demonstraram que a glicose ou a sacarose acelerava a mudança de fase vegetativa, reduzindo a expressão de miR156 quando aplicadas em plântulas, primórdios foliares isolados, bem como quando aplicadas no pecíolo após a remoção da folha (Yang et al., 2013 e Yu et al., 2013). Em consonância com os resultados anteriores, em *P. edulis* o fornecimento de açúcar exógeno aos explantes cotiledonares, em especial glicose, mostrou ter um papel preponderante na modulação de características foliares específicas da transição de fase vegetativa juvenil-adulta *in vitro* (Tabela 1).

Traçando um paralelo entre os resultados de regeneração anterior com os obtidos após a adição de STS ou AVG é possível notar que ambos os inibidores de etileno

influenciaram positivamente a frequência média de regeneração dos explantes cotiledonares (Tabela 2), quando comparado com os mesmos tratamentos mostrados na Tabela 1. Nossos resultados foram consistentes com os encontrados em outras espécies, *Passiflora cincinnata* (Dias et al., 2010) e *Capsicum annuum* L. (Batista et al., 2013), em que baixos níveis de etileno durante o período de indução aumenta a eficiência de regeneração *in vitro*. Além disso, os dados obtidos corroboram com os resultados anteriores em que o padrão heteroblástico de *P. edulis* foi alterado na presença de glicose exógena, sobretudo no tratamento 44 mM de glicose com STS ou AVG. Contudo, o etileno não pode ser associado com as mudanças específicas da transição juvenil-adulta da folha de *P. edulis* (Tabela 2), via organogênese *in vitro*, uma vez que essas mudanças não foram observadas nos demais tratamentos com STS ou AVG.

Adicionalmente, verificou-se que a adição de glicose ou sacarose no meio de indução afetou de maneira distinta a expressão do miR156 e miR172 dependendo do explante utilizado no processo de regeneração (Figura 2). E mais, os níveis desses transcritos foram estreitamente correlacionados com o processo heteroblástico, dado que houve acúmulo significativo dos transcritos de miR156, especialmente nos tratamentos com maior emissão de brotos e folhas com características juvenis, enquanto que o miR172 apresentou um padrão oposto, com níveis mais expressivo nos tratamentos onde o padrão morfogênico das folhas foi alterado (Wang et al., 2011; Jung et al., 2011; Yu et al., 2015; Nguyen et al., 2017). Ainda, evidências têm demonstrado que a sacarose, bem como seu produto hidrolítico, a glicose, acelera a mudança de fase vegetativa em *A. thaliana* diminuindo gradualmente os níveis do miR156 com o passar do tempo (Yang et al., 2011; Yu et al., 2013). O uso de glicose como fonte exógena de carbono induziu acúmulo expressivo tanto de miR156 quanto de miR172, em explantes cotiledonares de *P. edulis*. Esse perfil de expressão pode ser devido ao maior número de emissão de folhas monolobadas e trilobadas nos tratamentos glicose 44 mM e 88 mM (Tabela 1). Tais resultados podem ser atribuídos ao processo organogênico assincrônico, onde há presença de diversidade de estruturas foliares tanto com relação a folhas jovens e adultas em momentos distintos de desenvolvimento.

O miR172 promove florescimento e também algumas das características adultas das folhas de *Arabidopsis thaliana* (Jung et al., 2011). Como já vastamente relatado na literatura, as expressões de miR156 e miR172 apresentam padrões inversos durante o desenvolvimento vegetativo. Um declínio na expressão de miR156 favorece o acúmulo de *SPLs*, alvos diretos desse microRNA, que induzem a passagem da fase vegetativa

juvenil para adulta, ao permitir que o miR172 seja expresso (Yu et al., 2015). Como resultado, os parâmetros morfológicos da folha de plantas transgênicas de *A. thaliana* que superexpressam miR172 (35S::miR172) apresentam já na segunda folha da roseta a forma ovalada, comparativamente semelhante à sétima folha de plantas selvagens. Ademais, em plantas 35S::miR172 as folhas mostram precocemente outros traços adultos como produção de tricomas abaxiais, elaboração de serrilha na margem das folhas, bem como floração antecipada (Wu et al., 2009; Jung et al., 2011). Resultados semelhantes na arquitetura foliar de 35S::miR172 são observadas em plantas nocaute de genes alvos de miR172, como *toe1*, *toe2* e o triplo mutante *toe1toe2xsmz* (Jung et al., 2011). Quanto tomados em conjunto, os resultados obtidos nesses trabalhos ressaltam o envolvimento de outros fatores de transcrição *SPL* no desenvolvimento foliar (Wu et al., 2009; Jung et al., 2011).

Análises funcionais têm mostrado que o fator de transcrição *SPL9* modula diversas vias relacionadas à maioria das características associadas à fase adulta de *A. thaliana*, seja através da ativação ou repressão da transcrição dos seus alvos, desempenhando papel dominante na transição de fase juvenil para a adulta (Wu et al., 2009; Jung et al., 2011; Xu et al., 2016). Por exemplo, *SPL9* permite a formação de serrilha na margem das folhas ao se ligar ao TCP4 (*TEOSINTE BRANCHED1/ CYCLOIDIN/DEA/PCF*) permitindo a expressão de genes *CUC* (Rubio-Somoza et al., 2014). Assim como, induz o florescimento ao modular os níveis de miR172 ligando-se ao promotores do gene *MIR172B* (Wu et al., 2009). Contudo, o transcrito de *SPL9* apresentou padrão de expressão com pouca variação entre os diferentes tratamentos analisados. Ademais, os dados aqui obtidos com relação aos miR156 e *SPL9* são diferentes daqueles observados na literatura em que o perfil desses dois transcritos mostra aumento do miR156 e redução de *SPL9* (Xu et al., 2016). Assim, esse estudo em *Passiflora edulis* sugere-se que avaliações adicionais de outros genes relacionados à família *SPL* devam ser testados, no intuito de detectar outros *SPLs* candidatos que possivelmente realizem uma sobreposição de função com *SPL9*. Dentre esses fatores de transcrição destacam-se *SPL13* e *SPL15*, que juntamente com *SPL9*, são os principais responsáveis pela mudança morfologia foliar durante a transição da fase vegetativa juvenil-adulta (Xu et al., 2016). Contudo, ainda é *SPL9* o alvo principal na coordenação do balanço existente entre esses dois miRNA em que miR156 atua sobre *SPL9* levando a repressão de miR172 na fase juvenil sendo que nas fases posteriores de desenvolvimento vegetativo o contrário é observado (Wu et al., 2009; Yu et al., 2015; Nguyen et al., 2017).

Ainda, a hibridização *in situ* nos permitiu avaliar o comportamento de *SPL9* de *P. edulis* por uma abordagem diferente de RT-PCR quantitativa. Antes, foi necessário a clonagem e sequenciamento do cDNA completo de *PeSPL9*. O fragmento de *PeSPL9* mostrou uma região conservada de aproximadamente 80 resíduos de aminoácidos que apresentaram dois domínios de ligação ao DNA do tipo *zinc-finger*: Zn1 com característica Cys-Cys-His-Cys e outro Zn2 Cys-Cys-Cys-His (Figura 3). Esse resultados estão de acordo com Yamasaki et al. (2004) e Zhang et al. (2015) que mostraram que tais domínios são característicos da família *SPL* e necessários para os fatores de transcrição do tipo *SPLs* reconheçam e liguem-se aos promotores de genes contendo o motivo SBP-box. Ademais, uma análise filogenética da sequência de aminoácidos deduzidas de *PeSPL9* comparadas com aquelas depositadas em banco de dados, como NCBI e TAIR mostrou que *PeSPL9* tem similaridade com espécies sistematicamente próximas pertencentes à mesma Ordem (Malpighiales) (Figura 4). Tais observações sugerem que *SPL9* seja conservado através dos táxons, uma vez que os genes alvos de miR156 da família *SPL* evoluíram a partir de eventos de duplicação gênica (Tang, 2010).

Em brotações de *P. edulis* com 30 dias de idade, a visualização do sinal de hibridização do gene *PeSPL9* foi detectado nos flancos de iniciação dos primórdios foliares (Figura 5D) e, interessantemente, se intensificou em células epidérmicas da face abaxial da lâmina foliar em estádios subsequentes do desenvolvimento (Figura 5E). Esses resultados são consistentes com padrão de expressão de *SPL9* observado em outros estudos com *A. thaliana* (Wang et al., 2008; Wu et al., 2009), os quais utilizaram hibridização *in situ* para investigar o perfil de expressão de *SPL9* espacial e temporalmente, mostrando a presença desse transcrito tanto em primórdios foliares emergentes quanto naqueles em expansão. Ainda, vale ressaltar que outros genes *SPL* podem também participar dos processos de desenvolvimento foliar. Nesse contexto, tanto *SPL13* quanto *SPL15* apresentam o mesmo padrão de expressão daquele mencionado por *SPL9* em *A. thaliana* e *P. edulis*, mantendo-se uniformemente expressos no meristema apical caulinar e nos primórdios foliares (Xu et al., 2016; Figura 5F). Quanto tomados em conjunto, os achados de expressão via RT-qPCR e hibridização *in situ* sugerem uma sobreposição de funções de outros membros da família *SPLs* com *SPL9* corroborando que o processo evolutivo dos genes alvos de miR156 surgiram para assegurar a manutenção de um controle fino das redes regulatórias regidas pelos microRNAs (Tang, 2010; Xu et al., 2016).

Vários trabalhos no gênero *Passiflora* têm relatado a neoformação de estruturas caulinares via organogênese *in vitro* utilizando-se diferentes explantes, dos quais os mais comuns são cotilédones, hipocótilos e folhas (Dornelas e Vieira, 1994; Becerra et al., 2004; Fernando et al., 2007; Dias et al., 2009; Pinto et al., 2010; Vieira et al., 2014). Importante mencionar que a diferença com relação ao processo de organogênese deste trabalho com os demais citados acima referem-se a ausência ou presença de diferentes concentrações de fontes de carbono (glicose 44 e 88 mM e sacarose 44 e 88 mM). Dessa forma, vislumbrando se fontes de carbono são capazes de induzir mudanças de transição de fases vegetativas desde que o açúcar atue como molécula moduladora controlando expressão de genes (Yang et al., 2013; Yu et al., 2015).

Primeiramente, foi possível avaliar o efeito entre os explantes na ausência de fontes de carbono (Figura 6). Nesse tratamento, mostrou que apenas cotilédone foi capaz de promover brotações bem como folhas jovens mostrando que carboidratos de reservas presentes nos tecidos foram capazes de sustentar, ao menos parcialmente, os estádios iniciais de regeneração via organogênese. Esses resultados estão de acordo com pesquisas que mostraram que carboidratos de reserva (como amido) são mais eficientes para produção de brotos do que aqueles providos por sacarose (Miller et al., 1993; Langens-Gerrits et al., 2003). Ainda com relação aos tratamentos de glicose (44 e 88 mM) que foram os mais eficazes em promover as mudanças heteroblásticas, os conteúdos desses açúcares não acumularam quando comparados aos tratamentos com sacarose (Figura 6). Isso sugere que a glicose presente no meio pode ter sido usada como produção de energia para sustentar os processos biossintéticos durante a formação de gemas caulinares e folhas via organogênese *in vitro*. Ademais, tem sido sugerido o papel chave da glicose como molécula moduladora do controle das redes regulatórias da via miR156/*SPL* (Yu et al., 2015). Tomados em conjunto, é visto que ambas as idéias citadas acima da glicose funcionando como geradora de energia e moduladora do controle de expressão gênica podem ser integradas quando realçado o papel da enzima hexocinase 1, a qual atua tanto no processo inicial da glicólise quanto no controle de expressão gênica por modular o conteúdo de glicose intracelular (Yang et al., 2013; Yu et al., 2013). O mutante nocaute de hexocinase 1, *gin2-1*, elucidou, ao menos parcialmente, o efeito modulador da glicose no controle de expressão de miR156 (Yang et al., 2013). Esse mutante mostrou menor expressão desse transcrito quando comparado ao seu tipo selvagem, e essa baixa expressão permaneceu ao longo do desenvolvimento vegetativo (Yu et al., 2013).

Os resultados aqui apresentados ampliam as bases do conhecimento acerca do papel da glicose como molécula moduladora dos processos heteroblásticos em plantas, assim como demonstram seu papel na regulação da expressão de miR156 e miR172. Embora os níveis de expressão de *PeSPL9* não tenham revelado um perfil esperado como já descrito na literatura para outras espécies, a distribuição espacial desse transcrito visualizado via hibridização *in situ* mostra envolvimento de *PeSPL9* na morfogênese foliar durante o desenvolvimento vegetativo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allsopp A (1953) Experimental and analytical studies of Pteridophytes XXI. Investigations on *Marsilea* 3. The effect of various sugars on development and morphology. *Annals of Botany*, 17:447–463.

Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.

Batista D S, Dias L L C, Macedo F, Rêgo M M, Rêgo E R, Floh E I S, Finger F L, Otoni W C (2013) Suppression of ethylene levels promotes morphogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 49:759–764.

Becerra D C, Forero A P, Góngora G A (2004) Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79:87-90.

Byrne M E (2012) Making leaves. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:24-30.

Chitwood D H, Otoni W C (2016) Divergent heteroblastic trajectories underlie disparate leaf shapes among *Passiflora* species. *bioRxiv*. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/067520>.

Chitwood D H, Otoni W C (2017) Morphometric analysis of *Passiflora* leaves: the relationship between landmarks of the vasculature and elliptical Fourier descriptors of the blade. *GigaScience*, 6:1-13.

Chuck G, Cigan A M, Saeteurn K, Hake S (2007) The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics*, 39:544-549.

Cutri L, Nave N, Ami M B, Chayut N, Samach A, Dornelas M C (2013) Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. *Mechanisms of Development*, 130: 61-69.

Dias L L C, Santa-Catarina C, Ribeiro D M, Barros R S, Floh E I S, Otoni W C (2009) Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99:199-208.

Dias L L C, Ribeiro D M, Santa-Catarina C, Barros R S, Floh E I S, Otoni W C (2010) Ethylene and polyamine interactions in morphogenesis of *Passiflora cincinnata*: effects

of ethylene biosynthesis and action modulators, as well as ethylene scavengers. *Plant Growth Regulation*, 62:9–19.

Dornelas M C, Vieira, M L C (1994) Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36:211-217.

Drew R A (1991) *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 26: 23-27.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8: 175-185.

Feldman L J, Cutter E G (1970) Regulation of leaf form in *Centaurea solstitialis* L. I. Leaf development on whole plants in sterile culture. *Botanical Gazette*, 131:31–39.

Felsenstein J (1995) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.

Fernando J A, Vieira M L C, Machado S R, Appezzato-da-Gloria B (2007) New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 91:37-44.

Fernie A R, Roscher A, Ratcliffe R G, Kruger N J (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*, 212: 250-263.

Fouracre J P, Poethig R S (2016) The role of small RNAs in vegetative shoot development, *Current Opinion in Plant Biology*, 29:64–72.

Garcia R, Pacheco G, Falcão E, Borges G, Mansur E (2011) Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106:47- 54.

Huang X, Madan A (2005) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9:868-877.

Huijser P, Schmid M (2011) The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 138:4117–4129.

Jung J H, Seo P J, Kang S K, Park C M (2011) miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the *SPL3/4/5* genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Molecular Biology*, 76:35-45.

Kumar S, Glen Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33:1870-1874.

Langens-Gerritsa M, Kuijpersa A M, Klerka G J D, Croesb A (2003) Contribution of explant carbohydrate reserves and sucrose in the medium to bulb growth of lily regenerated on scale segments *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 117:245–255.

Livak K J, Schmittgen T D (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25:402-408.

Miller W B (1993) *Lilium longiflorum*. In: De Hertogh AA, Le Nard M (eds) Physiology of Flower Bulbs. *Elsevier*, Amsterdam, pp 391–422.

Nguyen S T T, Greaves T, McCurdy D W (2017) Heteroblastic development of transfer cells is controlled by the microRNA miR156/SPL module. *Plant Physiology*, Online first. doi: 10.1104/pp.16.01741.

Orkiszewski J A, Poethig R S (2000) Phase identity of the maize leaf is determined after leaf initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97:10631–10636.

Otoni W C, Paim-Pinto D L, Rocha D I, Vieira L M, Dias L L C, Silva M L, Silva C V, Lani E R G, Silva L C , Tanaka F A O (2013) Organogenesis and Embryogenesis in Passionfruit (*Passiflora* spp.). In: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (eds) Somatic Embryogenesis and Gene Expression. Narosa Publishing House, New Delhi-India, pp 1-17.

Paiva Neto V B, Otoni W C (2003) Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Scientia Horticulturae* 97:193–202.

Pinto APC, Monteiro-Hara ACBA, Stipp LCL, Mendes BMJ (2010) In vitro organogenesis of *Passiflora alata*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 46: 28-33.

Poethig R. S (2010) The Past, Present, and Future of Vegetative Phase Change. *American Society of Plant Biologists*, 2:541-544.

Poethig R S (2013) Vegetative phase change and shoot maturation in plants. *Current Topics in Developmental Biology*, 105:125-52.

Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, Bartel B, Bartel D P (2002) MicroRNAs in plants. *Genes and Development*, 16:1616–26.

- Rocha D I, Monte-Bello C C, Dornelas M C (2015) Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from in vitro cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis Sims*) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120: 1087-1098.
- Rubio-Somoza I, Zhou C-M, Confraria A, Martinho C, Born P, Baena-Gonzalez E, Wang J-W, Weigel D (2014) Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes. *Current Biology*, 24:2714–2719.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sussex I M, Clutter M E (1960) A study of the effect of externally supplied sucrose on the morphology of excised fern leaves *in vitro* . *Phytomorphology*, 10:87–99.
- Schwab R, Palatnik J F, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005) Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8:517-527.
- Tang G (2010) Plant microRNAs: An insight into their gene structures and evolution. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 8:782–789.
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Tsukaya H (2013) Leaf Development. *The American Society of Plant Biologists*, Number 13.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton E F, Hellens R P (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3: 1-12.
- Verdeil J L, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger T J (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *TRENDS in Plant Science*, 2:245-52.
- Vieira L M, Rocha D I, Taquetti M F, da Silva L C, de Campos J M S, Viccini L F, Otoni W C (2014) In vitro plant regeneration of *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 50: 738-745.
- Vieira, L M (2015) Embriogênese somática em *Passiflora cincinnata* Mast. e *P. setacea* D.C.: caracterização morfo-anatômica, mobilização de reservas e expressão dos genesm SERK e BBM.Tese. Tese em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Viçosa, 26 p.

Wang J W, Schwab R, Czech B, Mica E, Weigel D (2008) Dual effects of miR156-targeted *SPL* genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 20:1231–1243.

Wang J W, Czech B, Weigel D (2009) miR156-Regulated *SPL* transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 138: 738-749.

Wang J W, Park M Y, Wang L J, Koo Y, Chen X Y, Weigel D, Poethig RS (2011) miRNA control of vegetative phase change in trees. *PLoS Genetics*, 7:e1002012.

Wang L, Sun S, Jin J, Fu D, Yang X, Weng X, Xu C, Li X, Xiao J, Zhang Q (2015) Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 112:15504-15509.

Wu G, Park M Y, Conway S R, Wang J, Weigel D, Poethig R S (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138:750-759.

Xu M, Hu T, Zhao J, Park M Y, Earley K W, Wu G, Yang L, Poethig R S (2016) Developmental Functions of miR156-Regulated *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 12:1006263.

Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2004) A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors. *Journal of Molecular Biology*, 337:49-63.

Yang L, Conway S R, Poethig R S (2011) Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156. *Development*, 138:245–249.

Yang L, Xu M, Koo Y, He J, Poethig R S (2013) Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of *MIR156A* and *MIR156C*. *eLife*, 2:e00260.

Yu S, Cao L, Zhou C-M, Zhang T-Q, Lian H, Sun Y, Wu J, Huang J, Wang G, Wang J-W (2013) Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *eLife*, 2:e00269.

Yu S, Lian H, Wang W (2015) Plant developmental transitions: the role of microRNAs and sugars. *Current Opinion in Plant Biology*, 27:1–7.

Zhang X, Zou Z, Zhang J, Zhang Y, Han Q, Hu T, Xu X, Liu H, Li H, Ye Z (2011) Over-expression of *sly-miR156a* in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the *sft* mutant. *FEBS Letters*, 585:435–439.

Zhang Shu-Dong, Ling L-Z, Ting-Shuang Yi (2015) Evolution and divergence of SBP-box genes in land plants. *BMC Genomics*, 16:787.

Zhang T Q, Lian H, Tang H, Dolezal K, Zhou C M, Yu S, Chen J H, Chen Q, Liu H, Ljung K, Wang J W (2015) An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants. *The Plant Cell*, 27:349–360.

6. MATERIAL SUPLEMENNTAR

Tabela Suplementar S1. Iniciadores utilizados para amplificação da sequência completa e análise da expressão do gene *SPL9* e do miR156 e miR172 maduro em *Passiflora edulis*.

Iniciadores	Sequências
<i>SPL9</i> F	CCDAGRTGYCARGTDGARGGNTG
<i>SPL9</i> R	CCDAGRTGYCARGTDGARGGNTG
3R <i>SPL9</i> F1	CAGGCCATAATGAGCGGCGAAGGAAGCC
3R <i>SPL9</i> F2	GCTGCTGACTCGAGCTGTGCTCTCT
5R <i>SPL9</i> R1	GGCTTCCTTCGCCGCTCATTATGGCCTG
5R <i>SPL9</i> R2	TCGGCTACATTGCTGGCAAAACCTT
Pe <i>SPL9</i> RT F	TTGACCAAGGAAAACGGAGC
Pe <i>SPL9</i> RT F1	GATTTCATCAACTTCCTGAATTTGACCA
Pe <i>SPL9</i> RT R	TGAAGAGAGCCTGCCATAGG
Pe <i>SPL9</i> RT R1	GCTTCCTTCGCCGCTCATTATG
miR156 RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGCTCT
miR156 F maduro	CCTGAGTGACAGAAGAGAGTG
miR172 RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACATGCAG
miR172 maduro	CCTGAGAGAATCTTGATGATG
Reverso universal	GTGCAGGGTCCGAGG

W = A ou T; R = A ou G; M = A ou C; Y = C ou T; H = A ou C ou T; S = C ou G; D = A, G ou T. F: Forward, R: Reverse.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados aqui apresentados forneceram evidências do envolvimento da via miR156/*SPL* e miR172 na regulação do processo heteroblástico ao longo da transição de fase vegetativa de *Passiflora edulis*. Assim, as principais conclusões desta tese são:

- ✓ O padrão heteroblástico das folhas de *P. edulis* foi alterado com a maturidade da folha ao mesmo tempo em que os níveis de transcritos de miR172 aumentaram com a idade da folha. E mais, mostrou uma correlação positiva entre os açúcares solúvel como: glicose, frutose e sacarose com a abundância do miR172 ao longo do desenvolvimento foliar.
- ✓ Determinação do perfil metabólico revelou ainda que os açúcares foram o principal grupo que sofreu alteração durante o processo heteroblástico. Assim, apontamos a rafinose e mio-inositol 1-fosfato como açúcares candidatos os quais devem ser posteriormente investigados seu envolvimento no padrão heteroblástico de *P. edulis*.
- ✓ As investigações *in vitro* evidenciaram que o fornecimento de açúcar aos explantes cotiledonares, em especial a glicose, induzem traços heteroblásticos durante a neoformação de folhas de *P. edulis*, mediante a modulação da via miR156/*SPL*.
- ✓ Foi clonado e identificado o cDNA completo do gene que codifica o fator de transcrição *SPL9* de *Passiflora edulis* (*PeSPL9*).
- ✓ *PeSPL9* mostrou uma distribuição espacial no meristema apical caulinar e nos primórdios foliares em expansão quando visualizado via hibridização *in situ*. Esses achados revelaram o envolvimento de *PeSPL9* na morfogênese foliar durante o desenvolvimento vegetativo.

Portanto, os resultados aqui apresentados ampliam as bases do conhecimento acerca do papel do metabolismo do carbono, principalmente da glicose, na modulação da via de miR156/*SPL* e miR172 durante o desenvolvimento e neoformação foliar de *P. edulis*. Assim, as mudanças nos níveis do miR156 ao longo do desenvolvimento vegetativo da planta regulam a transição da fase juvenil para adulta não somente em plantas-modelo como *Arabidopsis*, mas parece ser um processo ubíquo em outras espécies vegetais, a exemplo de *P. edulis*.