

LORENA MELO VIEIRA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Passiflora cincinnata* MAST. E *P. setacea*  
D.C.: CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA, MOBILIZAÇÃO DE  
RESERVAS E EXPRESSÃO DOS GENES *SERK* E *BBM***

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  
2015

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

T

V657e  
2015  
Vieira, Lorena Melo, 1985-  
Embriogênese somática em *Passiflora cincinnata* Mast. e *P. setacea* D.C. : caracterização morfo-anatômica, mobilização de reservas e expressão dos genes SERK e BBM / Lorena Melo Vieira. – Viçosa, MG, 2015.  
xiii, 114f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Maracujá - Propagação in vitro. 2. *Passiflora cincinnata*.  
3. *Passiflora setacea*. 4. Embriogênese somática. 5. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. 6. Expressão gênica.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.  
II. Título.

CDD 22. ed. 583.626

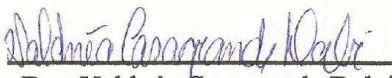
LORENA MELO VIEIRA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Passiflora cincinnata* MAST. E *P. setacea* D.C.: CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA, MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS E EXPRESSÃO DOS GENES *SERK* E *BBM***

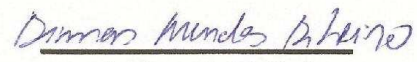
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


Aprovada 25 de março de 2015

  
Dra. Andréa Dias Koehler  
Coorientadora

  
Dra. Valdneia Casagrande Dalvi

  
Prof. Marcelo de Oliveira Santos

  
Prof. Dimas M. Ribeiro

  
Wagner Campos Otoni  
Orientador

*Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele  
lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.*

*Johann Goethe*

Meu grande exemplo e minha maior saudade,  
Vovó Honória (*in memoriam*)

*Dedico*

Aos meus pais pelo amor incondicional,  
Aos meus familiares e amigos pelo apoio,  
Ao meu orientador pelo exemplo e compreensão

*Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

- À Deus, pelo sopro de vida, e por ser responsável por todas as maravilhas em minha vida;
- À painho, exemplo de homem e de caráter, e mainha pelo amor e dedicação incondicional, vocês são meu porto seguro;
- À minha vovó Honória (*in memorian*) que esteve sempre ao meu lado e agora, em um plano superior, derrama suas bênçãos sobre mim;
- Ao meu noivo, pelo amor, carinho, cuidado e companheirismo;
- À meu irmão Leony e meus sobrinhos Davi e Pedro, que mesmo distantes, moram em meu coração;
- Aos meus familiares que torceram para que esta conquista fosse alcançada;
- À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de cursar o doutorado;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que me concedeu recursos financeiros para realização desse curso;
- 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;
- Aos professores do programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal por todo conhecimento transmitido;
- Ao professor Wagner Campos Otoni pelo grande incentivo, compreensão, confiança, amizade e exemplo de ser humano e profissional;
- À Dra. Andréa Dias Koehler pela coorientação e amizade durante esses anos de desafios e descobertas;
- À Dra. Ana Claudia F. Cruz pela coorientação e dedicação durante os momentos difíceis da pesquisa e as alegrias que a vida acadêmica nos proporciona;
- Aos professores Marcelo Oliveira dos Santos, Dimas M. Ribeiro e a Dra. Valdneá Casagrande Dalvi por aceitarem compor a banca examinadora;
- Ao grupo SERK, nas pessoas de Elyabe M. de Matos e Marcos V. M. Pinheiro, que além dos laços de amizade, me permitiu compreender a força e os benefícios do trabalho em grupo;
- As minhas queridas estagiárias Débora Freitas e Tatiane, pelo apoio e confiança durante esses 4 anos de doutorado, à técnica Lili pela amizade e a dona Elci, por nos adotar como filhos e proporcionar momentos incríveis na família LCT;

Ao LCT, minha segunda família, nas pessoas de Maria, Márcia, Anyela, Rafael Perácio, Itainá, Priscila, Denise, Kellen, Luciana, Thalita, Raquel, Helen, Duanny, Kamilla, Maíra, Ludmila, Thais, Daniele, Sérgio, Kristhiano, Vinicius, Gabriel, Wellington, Matheus, Ricardo, Evelyn, Gabriela, Dani (gata);

Aos meus amigos da Fisiologia Vegetal, Diego, João Henrique, Camilla Pedroza e especialmente a Ana Carla, pela amizade e companheirismo nas lutas diárias;

Aos amigos de Mutans, à turma da graduação na Unimontes e do curso de mestrado em Botânica, pessoas distantes, mas sempre presentes;

E a todos aqueles que contribuíram para concretização desse sonho.

*Muito obrigada!*

## BIOGRAFIA

LORENA MELO VIEIRA, filha de Pedro Jorge Veiga Vieira e Gercina da Costa Melo Vieira, nasceu em 22 de dezembro de 1985 no município de Caetité, estado da Bahia.

Cursou o ensino médio no Colégio Luís Eduardo Magalhães, em Guanambi, BA, concluindo em 2002.

No ano de 2004, ingressou na Universidade Estadual de Montes Claros e graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas em dezembro de 2008.

Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica durante três anos, e monitora nas disciplinas de Anatomia Vegetal e Propagação de plantas. Nesse período, desenvolveu trabalhos com microenxertia *ex vitro* em Passifloráceas.

Em março de 2009 ingressou no programa de Pós-graduação em Botânica, em nível de Mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido dissertação em fevereiro de 2011 com o título “Expressão do gene *ASYMMETRIC LEAVES1 (ASI)* em explantes radiculares de *Passiflora edulis* Sims e organogênese *in vitro* em *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae)”.

Neste mesmo ano ingressou no programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de doutorado, pela Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em março de 2015.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	5
<b>2.1. OBJETIVO GERAL</b> .....	5
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	5
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	6

### **CAPÍTULO I - GENES PUTATIVOS DE *SERK* E *BABY BOOM* SÃO EXPRESSOS DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Passiflora cincinnata* MAST.**

<b>RESUMO</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
2.1. Material vegetal para indução de embriogênese somática.....	20
2.2. Coleta de amostras.....	20
2.3. Extração de RNA.....	20
2.4. Síntese de cDNA fita simples (Superscript II - Invitrogen™).....	21
2.5. Amplificação e clonagem da sequência codificadora de genes da família <i>SERK</i> e <i>BBM</i> .....	22
2.6. Caracterização e análise de sequências dos genes <i>SERK</i> e <i>BBM</i> em <i>P. cincinnata</i> .....	23
2.7. Análise filogenética.....	24
2.8. Caracterização do padrão de expressão temporal e espacial dos genes <i>SERK</i> e <i>BBM</i> de <i>P. cincinnata</i> por hibridização <i>in situ</i> .....	24
2.8.1. Coleta do material .....	24
2.8.2. Construção de sondas <i>sense</i> e <i>antisense</i> .....	25
2.8.3. Hibridização <i>in situ</i> .....	26
2.8.4. Caracterização anatômica .....	27
<b>3. RESULTADOS</b> .....	28
3.1. Isolamento e análise da provável sequência codificadora de <i>SERK</i> e <i>BBM</i> em <i>P. cincinnata</i> .....	28
3.2. Análise Filogenética.....	31
3.3. Análise estrutural e caracterização do padrão de expressão de <i>BBM</i> e <i>SERK</i> por hibridização <i>in situ</i> .....	31
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	33
4.1. Isolamento de possíveis homólogos de <i>SERK</i> e <i>BBM</i> durante a ES em <i>P. cincinnata</i> .....	35
4.2. Comparação entre Pc contig1 e 2 de <i>SERK</i> e Pc contig1 de <i>BBM</i> com os genes <i>SERK</i> e <i>BBM</i> de outras espécies.....	40
4.3. Expressão dos genes <i>SERK</i> e <i>BBM</i> em embriões somáticos de <i>P.</i>	

<i>cincinnata</i> .....	42
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45
<b>6. FIGURAS E LEGENDAS</b> .....	56
<b>7. TABELAS</b> .....	65

**CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA E EXPRESSÃO DOS GENES *SERK* E *BABY BOOM* POR HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* EM *Passiflora setacea* D.C E *P. cincinnata* MAST.**

<b>RESUMO</b> .....	67
<b>ABSTRACT</b> .....	69
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	71
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	75
2.1. Material vegetal e indução de embriogênese.....	75
2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	77
2.3. Caracterização anatômica e histoquímica.....	77
2.4. Hibridização <i>in situ</i> .....	78
<b>3. RESULTADOS</b> .....	78
3.1. Análise estrutural .....	79
3.2. Caracterização histoquímica.....	80
3.3. Análise da expressão dos genes <i>BBM</i> e <i>SERK</i> .....	81
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	82
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	94
<b>6. FIGURAS E LEGENDAS</b> .....	106
<b>7. TABELA</b> .....	113
<b>8. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	114

## RESUMO

VIEIRA, Lorena Melo, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Embriogênese somática em *Passiflora cincinnata* Mast. e *P. setacea* D.C.: caracterização morfo-anatômica, mobilização de reservas e expressão dos genes *SERK* e *BBM*.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadoras: Andréa Dias Koehler e Ana Claudia F. Cruz

A aquisição de competência embriogênica por células somáticas é um processo intrigante e necessita da junção de dados genético-moleculares e citológicos para melhor compreensão dos mecanismos e mudanças celulares envolvidas. À vista disso, os objetivos desse trabalho foram isolar e caracterizar o padrão de expressão dos genes *SERK* e *BBM* por hibridização *in situ* durante o processo de embriogênese somática em *Passiflora cincinnata*, avaliar a responsividade morfogênica *in vitro* de *P. setacea* e *P. cincinnata* submetidas a condições de indução de embriogênese somática, bem como, acompanhar a mobilização de reservas e a expressão dos genes supracitados durante a embriogênese somática. Para tal, a partir de calos embriogênicos de *P. cincinnata*, com 20 dias em meio de indução (MI), extraiu-se o RNA total e obteve-se o cDNA, o qual serviu como molde para amplificação da sequência codante utilizando-se primers degenerados para *SERK* e *BBM*. A responsividade de embriões zigóticos maduros de *P. setacea* e *P. cincinnata* foi avaliada mediante o cultivo em meio de indução alternativo constituído por sais MS suplementado com 31,06  $\mu\text{M}$  de Picloram + 2,22  $\mu\text{M}$  de BA + 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ (MIP) + 500  $\text{mg L}^{-1}$  de Extrato de Malte (EM) + 13,77  $\mu\text{M}$  de Espermidina (Spd). Após 30 dias as culturas foram transferidas ao meio de maturação (MM) composto de meio MS acrescido de 1,0% de carvão ativado e ausência de reguladores de crescimento. Amostras com 0, 10, 20 e 30 dias foram coletadas para microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, testes histoquímicos e hibridização *in situ*, todas seguindo protocolos específicos. Para visualização da expressão dos genes *SERK* e *BBM* foi gerada uma sonda de RNA a partir de um clone sequenciado de *P. cincinnata*. Para *P. setacea* utilizou-se uma sonda heteróloga *sense* e *antisense* de *P. cincinnata*. O relacionamento filogenético das sequências isoladas de *P. cincinnata* comparadas às de outras espécies apontou que as funções das proteínas podem ser conservadas na espécie. Em *SERK*, o Pc contig1 agrupou-se com membros de SERK1 e SERK2, enquanto o Pc contig2 agrupou-se com membros de SERK3/BAK1. Por sua vez, o Pc contig1 de *BBM*, agrupou-se com membros de *BBM1*

e BBM2. A expressão do gene *SERK* foi constatada em embriões zigóticos e gradualmente diminuída até os 20 dias em MI. Aos 30 dias em MI, embriões somáticos globulares foram intensamente marcados, assim como em embriões com 5 e 40 dias em MM. Transcritos do *BBM* foram observados em embriões zigóticos, no entanto, a expressão foi cessada no decorrer do desenvolvimento dos embriões somáticos. A expressão foi retomada em embriões somáticos cotiledonares após 40 dias em MM, assemelhando-se ao observado no embrião zigótico. Observou-se que em *P. setacea*, durante o processo embriogênico, houve formação de protuberâncias que deram origem a zonas pró-embriogênicas, as quais se desenvolveram em embriões somáticos. Já em *P. cincinnata* houve proliferação das células do meristema fundamental e formação de meristemoides, caracterizando regiões organogênicas. Quando transferidos ao meio de maturação não houve regeneração de plantas a partir de embriões somáticos em *P. setacea*. Em *P. cincinnata* houve intumescimento das regiões calejadas e, em alguns casos, formação de primórdios foliares. Quanto à expressão gênica, em *P. setacea* foi constatada expressão de *BBM* e *SERK* em todas as fases analisadas, especialmente em protuberâncias e embriões somáticos formados. *P. cincinnata*, por sua vez, também apresentou transcritos dos genes *BBM* e *SERK* em todas as fases analisadas, sendo intensificado o sinal de hibridização na periferia dos explantes e regiões meristemáticas após 20 dias em MI. *P. setacea* apresentou corpos proteicos com decréscimo gradativo até os 30 dias em meio de indução. Houve presença de carboidratos e amido no explante e seu decréscimo após 10 dias, e verificou-se a síntese *de novo* de amido aos 30 dias de indução, quando há formação de embriões somáticos. Não foi verificada a presença de corpos lipídicos durante o processo embriogênico. Já em *P. cincinnata*, constatou-se corpos proteicos e amido de forma moderada em todas as etapas de desenvolvimento e a presença de carboidratos totais e corpos lipídicos foi averiguada nas fases iniciais de indução. Após 20 dias, houve mobilização dessas substâncias de reserva concomitantemente com a formação e desenvolvimento de meristemoides. Deste modo, sugere-se que a expressão desses genes está associada aos processos de aquisição de competência embriogênica e podem servir como marcadores moleculares desse processo. Os resultados do isolamento e expressão dos genes *SERK* e *BBM* em *P. cincinnata* são inéditos e contribuem para o melhor entendimento dos processos que envolvem a embriogênese somática na espécie. Nosso trabalho apresenta dados inéditos da indução de embriões somáticos em *P. setacea* e como as espécies estudadas apresentam respostas morfogênicas divergentes quando submetidas ao mesmo meio de

indução. E ainda, relatamos à expressão dos genes *BBM* e *SERK* e a mobilização de compostos de reserva no decorrer dos eventos morfogênicos *in vitro* em *P. setacea* e *P. cincinnata*.

## ABSTRACT

VIEIRA, Lorena Melo, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March, 2015. **Somatic embryogenesis in *Passiflora cincinnata* Mast. and *P. setacea* D.C.: morphoanatomical characterization, reserve mobilization and expression of genes *SERK* and *BBM*.** Advisor: Wagner Campos Otoni. Co-advisor: Andréa Dias Koehler and Ana Claudia F. Cruz

The acquisition of embryogenic competence in somatic cells is intriguing process and requires both molecular-genetic and cytological knowledge to better understand the mechanisms and cellular changes involved. Based on this, the aim of this study was to isolate and characterize the expression of *SERK* and *BBM* genes in somatic embryos of *Passiflora cincinnata*, as well as to evaluate the morphogenic *in vitro* response of *Passiflora setacea* and *P. cincinnata* somatic embryogenesis induced and monitoring the reserve mobilization and expression of the these genes during embryogenesis. For this, RNA was extracted and cDNA was obtained from embryogenic calli of *P. cincinnata* after 20 days in induction medium (IM), which was used as template for the coding sequence amplification with degenerate primers of *SERK* and *BBM*. Mature zygotic embryos of *P. setacea* and *P. cincinnata* were inoculated on MS medium supplemented with 31.06  $\mu\text{M}$  of picloram + 2.22  $\mu\text{M}$  of benzyladenine + 2.27  $\mu\text{M}$  of thidizuron + 500mg L<sup>-1</sup> of malt extract + 13.77  $\mu\text{M}$  of spermidine. After 30 days, the cultures were transferred to the maturation medium (MM), composed of MS medium supplemented with 1 % of activated charcoal without growth regulators. Samples with 0, 10, 20 and 30 days were collected for light microscopy, scanning electron microscopy, histochemical analyzes and *in situ* hybridization, following specific protocols. A RNA probe from *P. cincinnata* cDNA was generated to figure out the expression of *SERK* and *BBM* genes, whereas to *P. setacea* a heterologous sense and antisense probe of *P. cincinnata* was used. The phylogenetic relationship of *P. cincinnata* isolated sequences compared with other species suggests that the functions of the proteins are preserved. In *SERK*, the Pc contig1 grouped up with SERK1 and SERK2 members, while the Pc contig2 grouped with SERK3/BAK1 members. On the other hand, the *BBM* Pc contig1 was grouped with BBM1 and BBM2 members. The expression of *SERK* gene was found in zygotic embryos and gradually decreased until 20 days in the IM. After 30 days in the IM, globular somatic embryos were intensely marked with the hybridization signal, as well as embryos with 5 and 40 days in the MM.

*BBM* transcripts were observed in zygotic embryos, but the expression was stopped during the somatic embryos development. The expression was resumed in somatic globular embryos after 40 days in the MM, similar to that observed in zygotic embryos. In the second chapter, in *P. setacea* embryogenesis process, it was observed the formation of lumps that originate pro-embryogenic zones, which developed into somatic embryos. In *P. cincinnata* a proliferation of the ground meristem cells and meristemoids formation occurred, emphasizing organogenic regions. When transferred to MM, there was no plant regeneration from somatic embryos of *P. setacea*. In *P. cincinnata*, swelling of callus regions and, in some cases, formation of leaf primordia was observed. Regarding the gene expression, in *P. setacea* there was *BBM* and *SERK* expression in all stages, especially in lumps and somatic embryos. Also *P. cincinnata* showed transcripts of *BBM* and *SERK* genes in all stages, with intensification of the hybridization signal at the explants edges and meristematic regions after 20 days in the IM. Protein bodies were found in *P. setacea*, decreasing gradually until 30 days in the IM. Carbohydrate and starch levels decreased after 10 days, but there was *de novo* synthesis of starch at 30 days of induction, coupled with the somatic embryos formation. No lipid bodies during the embryogenic process were verified. In *P. cincinnata* protein bodies and starch were moderately present in all development stages whereas carbohydrates and lipid bodies were present only at the early stages of induction. After 20 days, these reserve substances were mobilized, along with the meristemoids formation and development. Therefore, it is suggested that the expression of these genes is associated with embryogenic competence acquisition process and can be a molecular marker of this process. These results of isolation and expression of *SERK* and *BBM* genes in *P. cincinnata* are original and contribute to a better understanding of the processes involving somatic embryogenesis in this species. This work brings a new approach for somatic embryogenesis induction in *P. setacea* and highlights how these two species show different responses when submitted to the IM. In addition, the expression of the genes *BBM* and *SERK* as well as the mobilization of reserve compounds during *in vitro* morphogenic events in *P. setacea* and *P. cincinnata* were related.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Diversos estudos têm sido executados no intuito de estabelecer protocolos de cultivo e regeneração *in vitro* via embriogênese somática em espécies do gênero *Passiflora* (Silva et al. 2009; Paim-Pinto et al. 2011; Rosa et al. 2015). Entretanto, pouco se tem avançado no entendimento dos mecanismos moleculares e fisiológicos que governam a aquisição de competência celular. A transição do estado de células somáticas para células com competência embriogênica é intrigante, e a compreensão dos mecanismos e mudanças celulares que norteiam esse processo dar-se-á pela confluência de dados genético-moleculares e citológicos a esse respeito (Féher et al. 2003; Rocha e Dornelas 2013; Féher 2014).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática se destaca, uma vez que, apresenta um sistema eficiente para regeneração de plantas em larga escala, utilização em programas de transformação genética (Shang et al. 2009), bem como para a compreensão dos aspectos moleculares e morfofisiológicos envolvidos na diferenciação celular (Féher et al. 2003; Perez-Nuñez et al. 2009; Kurczyńska et al. 2012). Embora muitas características comuns tivessem sido identificadas entre os mecanismos moleculares que controlam ambos o desenvolvimento da embriogênese somática e zigótica (Féher et al. 2003), o processo da embriogênese somática requer um sinal de indução das células somáticas para se diferenciarem e adquirirem competência embriogênica (Komamine et al. 2005; Yang et al. 2010).

A indução da embriogênese somática *in vitro* está associada às condições do ambiente *in vitro*, aos níveis de reguladores de crescimento exógenos e outros fatores de estresse (Pasternak et al. 2002; Elhiti et al. 2013; Parveen e Shahzad 2014; Rocha et al. 2015). Em muitas espécies de plantas, a concentração exata de auxina acrescida ao meio de cultivo *in vitro* é crucial para a indução da embriogênese somática (Féher et al. 2003;

2005). A utilização de auxinas como reguladores de crescimento é de suma importância no processo morfogênico, já que, em geral a aplicação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para a indução de embriões somáticos reforça sua capacidade em evocar respostas à auxina e ao estresse (Féher 2005). E ainda, a eficiência do 2,4-D em ativar as rotas embriogênicas pode estar relacionada à sua aptidão em induzir genes do estresse que contribuem na reprogramação celular de células somáticas para embriogênicas (Fehér 2014; Parveen e Shahzad 2014).

Dentre os genes importantes na regulação dos processos morfogênicos, estão alguns pertencentes a família *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*) e *BBM* (*Baby Boom*), estando envolvidos tanto na aquisição de competência embriogênica (Sucharitakul et al. 2014), quanto na organogênese (Ge et al. 2010; Zakizadeh et al. 2010). Genes da família estão inseridos como um subgrupo de RLKs (*Repeat-Like Kinases*) na qual se encontra a subclasse LRR (*Leucine Rich Repeat*) e foi descrito como marcador da transição de células somáticas para embriogênicas em diversas espécies, a exemplo, *Daucus carota* (Schmidt et al. 1997), *Dactylis glomerata* (Somleva et al. 2000), *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al. 2001) e pode servir como marcador molecular característico para distinção entre células competentes e não competentes (Chugh e Khurana 2002). O gene *BBM* pertence à família de fatores de transcrição AINTEGUMENTA-like (AIL) que, por sua vez, está contida na superfamília AP2/ERF (Horstman et al. 2014). Esses genes apresentam funções no estabelecimento de meristemas, iniciação e crescimento de órgãos, bem como, são expressos em tecidos jovens e em divisão (Horstman et al. 2014; Yang et al. 2014). Estudos funcionais de *BBM* indicaram que esse gene ativa rotas de transdução de sinais levando a indução do desenvolvimento do embrião a partir da diferenciação de células somáticas (Boutillier et al. 2002).

Análises de hibridização *in situ* e a caracterização morfo-anatômica dos sistemas de embriogênese somática permitem acompanhar o padrão temporal e espacial da expressão gênica, além de fornecer descrições detalhadas das alterações envolvidas na aquisição de competência embriogênica e histodiferenciação de embriões (Boutillier et al. 2002; Moura et al. 2008; Moura et al. 2010; Solís-Ramos et al. 2010; Du et al. 2012). E ainda, os métodos histoquímicos tem permitido o monitoramento da mobilização e síntese de compostos de reserva durante o desenvolvimento embriogênico, possibilitando reconhecer regiões e/ou tecidos que requerem alta demanda energética (Cangahuala-Inocente et al. 2004; Cangahuala-Inocente et al. 2009). Visto que as reservas são cruciais para os eventos morfogênicos *in vitro*, vários estudos tem correlacionado a dinâmica de mobilização destes componentes com o padrão de desenvolvimento organogênico ou de embriões somáticos (Cangahuala-Inocente et al. 2004; Cangahuala-Inocente et al. 2009; Moura et al. 2010; Almeida et al. 2012).

Muitas espécies do gênero *Passiflora* tem sido potencialmente exploradas em estudos científicos em função de apresentarem reconhecida importância econômica pelo valor nutricional de seus frutos, propriedades farmacêuticas e o valor ornamental de suas flores (Ulmer e MacDougal 2004; Campos 2010). Esse gênero compreende cerca de 650 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, das quais 150 espécies são nativas do Brasil (Crochemore et al. 2003; Ortiz et al. 2011). Dentre essas, algumas espécies silvestres de *Passiflora*, como *P. cincinnata* e *P. setacea*, não cultivadas comercialmente, tem chamado atenção por apresentarem características de interesse potenciais em programas de melhoramento genético, em termos de rendimento, qualidade dos frutos e resistência a pragas e doenças (Vieira e Carneiro 2004; Faleiro et al. 2006; Zerbini et al. 2008).

*Passiflora cincinnata* tem apresentado excelentes respostas morfogênicas *in vitro*, mostrando elevado potencial organogênico (Lombardi et al. 2007; Zerbini et al. 2008; Silva et al. 2011) e embriogênico (Reis et al. 2007; Silva et al. 2009; Paim-Pinto et al. 2010), tendo sido considerada uma espécie padrão para prossecução e adequação de estudos morfogênicos *in vitro* nesse gênero (Rocha et al. 2012). *Passiflora setacea*, conhecida como maracujá do sono, é considerada uma excelente fonte de resistência a patógenos que acometem as espécies comerciais (Passos e Bernacci 2005; Faleiro et al. 2006; Cerqueira-Silva et al. 2012), no entanto, a dificuldade de produção de mudas e a desuniformidade da germinação das sementes, limitam o cultivo dessa espécie (Campos 2010; Cerqueira-Silva et al. 2012). Assim, as técnicas de cultura de tecidos e programas de melhoramento genético podem ser alternativas viáveis para sua propagação (Faleiro et al. 2008; Campos 2010; Santos et al. 2011; Vieira et al. 2014).

Em virtude da importância do entendimento dos mecanismos que governam a aquisição de competência celular à organogênese ou embriogênese, a caracterização gênica, análises histológicas e histoquímicas dos processos de regeneração *in vitro* tornam-se necessárias para melhor esclarecimento e validação do seu uso em estudos de cunho científico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Fornecer subsídios para o melhor entendimento da embriogênese somática em *Passiflora setacea* e *P. cincinnata*, utilizando-se ferramentas anatômicas e moleculares.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Isolar e caracterizar genes das famílias *SERK* e *BBM* expressos durante o processo de indução de embriões somáticos em *Passiflora cincinnata*;
- 2- Averiguar a dinâmica da expressão desses genes, em nível temporal e espacial, pela técnica de hibridização *in situ*;
- 3- Comparar a responsividade morfogênica de embriões zigóticos maduros de *Passiflora setacea* e *P. cincinnata* submetidos a um meio alternativo de indução de embriogênese somática;
- 4- Caracterizar anatomicamente as respostas morfogênicas *in vitro* e avaliar o perfil de expressão dos genes *SERK* e *BBM* em *P. setacea* e *P. cincinnata*;
- 5- Monitorar a síntese e mobilização de substâncias de reservas durante as diferentes etapas de indução da embriogênese somática.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida M, de Almeida CV, Mendes Graner E, Ebling Brondani G, Fiori de Abreu-Tarazi M (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant Cell Reports* 31:1495- 1515
- Boutillier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C, van Lammeren AAM, Miki BLA, Custers JBM, Campagne MML (2002) Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell* 14:1737-1749
- Campos AVS (2010) Características físico-químicas e composição mineral de polpa de *Passiflora setacea*. Universidade de Brasília, pp- 90
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Maldonado SB, Guerra MP (2009) Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:217-224
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Santos M, Guerra MP (2004) Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224:33–40
- Cerqueira-Silva CB, Santos ES, Conceicao LD, Cardoso-Silva CB, Pereira AS, Oliveira AC, Correa RX (2012) Genetic variation in a wild population of the 'sleep' passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. *Genetics and Molecular Research* 11:731- 738
- Chugh A, Khurana P (2002) Gene Expression during Somatic Embryogenesis-Recent Advances. *Current Science* 86:715-730

- Crochemore ML, Molinari HBC, Vieira LGE (2003) Genetic Diversity in Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Evaluated by RAPD Markers. Brazilian Archives of Biology and Technology 46:521-527
- Du J, Yin H, Zhang S, Wei Z, Zhao B, Zhang J, Gou X, Lin H, Li J (2012) Somatic embryogenesis receptor kinases control root development mainly via brassinosteroid-independent actions in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Integrative Plant Biology 54:388-399
- Elhiti M, Stasolla C, Wang A (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 49:631-642
- Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (2006) Maracujá: demandas para a pesquisa. Embrapas Cerrados, Panaltina, DF
- Faleiro FG, Junqueira NTV, Fávero AP, Lopes MA (2008) Pré-melhoramento de plantas: experiências de sucesso. In: Faleiro FG, Farias Neto AL, Ribeiro Junior WQ (eds) Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: Estratégias e desafios. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 43–62
- Féher A, Pasternack TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74:201–228
- Féher A (2005) Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujid A, Samaj J (eds) Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs, volume 2, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, p. 85-101
- Féher A (2014) Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. Biochimica et Biophysica Acta <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- Ge X-X, Fan G-E, Chai L-J, Guo W-W (2010) Cloning, molecular characterization and expression analysis of a *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* gene (*CitSERK1-like*) in Valencia sweet orange. Acta Physiologiae Plantarum 32:1197-1207

- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schimit DI, Boutilier K, Grossnicklaus U, de Vries SC (2001) The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* gene is expressed in development ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology and Biochemistry* 127:803-816
- Horstman A, Willemsen V, Boutilier K, Heidstra R (2014) AINTEGUMENTA-LIKE proteins: hubs in a plethora of networks. *Trends in Plant Science* 19:146-157
- Komamine A, Murata N, Nomura K (2005) Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41:6-10
- Kurczyńska EU, Potocka I, Dobrowolska I, Kulinska-Lukaszek K, Sala K, Wrobel J (2012) Cellular markers for somatic embryogenesis. In: Sato K-i (ed) *Embryogenesis*. InTech, Rijeka, pp. 307-332
- Lombardi SP, Passos IRS, Nogueira MCS, Appezzato-da-Glória B (2007) *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50:239–247
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY, de Sá Júnior AQ, Carvalho M, Manfio CE (2008) Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95:175-184
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY (2010) Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola* 67:399-407
- Ortiz DC, Bohórquez A, Duque MC, Tohme J, Cuéllar D, Mosquera Vásquez T (2011) Evaluating purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) genetic variability in individuals from commercial plantations in Colombia. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:1089-1099

- Otoni WC, Paim-Pinto DL, Rocha DI, Vieira LM, Dias LLC, Silva ML, Silva CV, Lani ERG, Silva LCd, Tanaka FAO (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
- Paim-Pinto DL, Almeida Barros B, Viccini LF, dos Campos JMS, da Silva ML, Otoni WC (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103:71-79
- Paim-Pinto DL, de Almeida AMR, Rêgo MM, da Silva ML, de Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107:521-530
- Parveen S, Shahzad A (2014) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *Cassia angustifolia* from immature cotyledon-derived callus. *Biologia Plantarum* 58:411- 418
- Passos IRS, Bernacci LC (2005) Cultura de tecidos aplicada a conservação *in vitro* de germoplasma e melhoramento de maracujá (*Passiflora* spp.). In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento. Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, pp 361–383
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology* 129:1807–1900
- Perez-Nuñez MT, Souza R, Saenz L, Chan JL, Zuniga-Aguilar JJ, Oropeza C (2009) Detection of a *SERK-like* gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Reports* 28:11-19

- Reis LB, Silva ML, Lima ABP, Oliveira MLP, Paim-Pinto DL, Lani ERG, Otoni WC (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. *Acta Horticulturae* 738:425- 431
- Rocha D, Dornelas MC (2013) Molecular overview on plant somatic embryogenesis. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 8: 1-17
- Rocha DI, Monte-Bello CC, Dornelas MC (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
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Silva LC, Otoni WC (2012) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249:747–758
- Rosa YBCJ, Bello CCM, Dornelas MC (2015) Species-dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 69- 72
- Santos EA, Souza MM, Abreu PP, da Conceição LDHCS, Araújo IS, Viana AP, de Almeida A-AF, Freitas JCdO (2011) Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. *Euphytica* 184:389-399
- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124: 2049-2062
- Shang H, Liu C, Zhang C, Liu F, Hong W, Li F (2009) Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between *Agrobacterium*

transformed embryogenic and non-embryogenic calli of cotton. Journal of Integrative Plant Biology DOI: 10.1111/J.17 44-7909.2009.00624.X

Silva CV, Oliveira LS, Loriato VAP, Silva LCd, Campos JMS, Viccini LF, Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 107:407- 416.

Silva ML, Paim-Pinto DL, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009) A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 99:47-54

Solís-Ramos LY, Andrade-Torres A, Carbonell LAS, Salín CMO, Serna ES (2010) Somatic Embryogenesis in Recalcitrant Plants In: [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com), pp 598-618

Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. Plant Cell Reports 19:718–726

Sucharitakul K, Rakmit R, Boonsorn Y, Leelapon O, Teerakathiti T, Bunnag S, Chanvivattana Y (2014) Isolation and expression analysis of a *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* gene in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. Journal of Agricultural Science 6: 207-217

Ulmer T, MacDougal JM (2004) *Passiflora: Passionflowers of the world*. Cambridge

Vieira LM, Rocha DI, Taquetti MF, da Silva LC, de Campos JMS, Viccini LF, Otoni WC (2014) In vitro plant regeneration of *Passiflora setacea* D.C.(Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. In Vitro Cell Development Biology 50:738- 745

- Vieira MLC, Carneiro MS (2004) *Passiflora* spp. Passionfruit. In: Litz RE (ed) Biotechnology of fruit and nut crops. CABI Publishing, Oxford, pp 435-453
- Yang C, Zhao T, Yu D, Gai J (2010) Isolation and functional characterization of a *SERK* gene from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Plant Molecular Biology Reporter 29:334-344
- Yang HF, Kou YP, Gao B, Soliman TMA, Xu KD, Ma N, Cao X, Zhao LJ (2014) Identification and functional analysis of *BABY BOOM* genes from *Rosa canina*. Biologia Plantarum 58:427-435
- Zakizadeh H, Stummann BM, Lütken H, Müller R (2010) Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101:331-338
- Zerbini FM, Otoni WC, Vieira MLC (2008) Transgenic passionfruit. In: Kole C HT (ed) Compendium of transgenic crop plants: tropical and subtropical fruits and nuts. John Wiley and Sons, Berlin, pp 213–234

## CAPÍTULO I

---

### GENES PUTATIVOS DE *SERK* E *BABY BOOM* SÃO EXPRESSOS DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Passiflora cincinnata* MAST.

**Resumo** - Dentre o grupo dos principais genes envolvidos na embriogênese somática destacam-se o *SERK* e o *BBM*. Os genes *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*) são expressos em diferentes estádios de desenvolvimento do embrião além de terem relação com a aquisição da competência e da indução da embriogênese somática. O gene *BBM* (*BABY BOOM*), membro da subfamília *AP2*, tem papel no desenvolvimento de embriões e proliferação de células em regiões meristemáticas. Por conseguinte, este trabalho objetivou isolar e caracterizar a expressão desses genes no processo de formação de embriões somáticos em *Passiflora cincinnata*. Para tal, o RNA total de culturas embriogênicas com 20 dias em meio de indução foi extraído e obtido o cDNA. Esse serviu como molde para amplificação da sequência codante utilizando-se primers degenerados de *SERK* e *BBM*. Os fragmentos de tamanhos previstos foram purificados do gel, ligados ao vetor e introduzidos em células ultracompetentes. Verificou-se que as sequências de aminoácidos deduzidas dos clones escolhidos de *SERK* e *BBM* apresentaram similaridades com as proteínas *SERK* e *BBM* depositadas no banco de dados do NCBI. O relacionamento filogenético das sequências isoladas de *P. cincinnata* comparadas às de outras espécies apontou que as funções das proteínas podem ser conservadas na espécie. Ademais, a topologia das árvores gerou grupos bem sustentados, tanto para *SERK* quanto para *BBM*. Em *SERK*, o Pc contig1 agrupou-se com membros de *SERK1* e *SERK2*, enquanto o Pc contig2 agrupou-se com membros de *SERK3/BAK1*. Por sua vez, o Pc contig1 de *BBM*, agrupou-se com membros de *BBM1* e *BBM2*. A expressão do gene *SERK* foi constatada em embriões zigóticos e gradualmente diminuída até os 20 dias em meio de indução. Aos 30 dias em meio de indução, embriões somáticos globulares foram intensamente marcados com o sinal de hibridização, assim como em embriões com 5 e 40 dias em meio de maturação. Transcritos do *BBM* foram observados em embriões zigóticos, no entanto, a expressão foi cessada no decorrer do desenvolvimento dos embriões somáticos. A expressão foi retomada em embriões somáticos cotiledonares após 40 dias em meio de maturação, assemelhando-se ao observado no embrião zigótico. De maneira congruente, a sonda *sense* não apresentou sinal positivo nos estádios avaliados. Deste modo, sugere-se que a expressão desses genes está associada aos processos de aquisição de competência embriogênica e

no desenvolvimento de embriões somáticos podendo servir como marcadores moleculares desse processo. Os resultados do isolamento e expressão dos genes *SERK* e *BBM* em *P. cincinnata* são inéditos e contribuem para o melhor entendimento dos processos que envolvem a embriogênese somática na espécie.

**Palavras-chave:** *Passiflora*, embriogênese somática, *SERK*, *BBM*, hibridização *in situ*, análise filogenética.

**Abstract** - Among the key genes involved in somatic embryogenesis, the *SERK* and *BBM* are highlighted. The *SERK* genes (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*) are expressed in different stages of embryonic development as well as being associated with the acquisition of competence and somatic embryogenesis induction. *BBM* gene (*BABY BOOM*), member of AP2 subfamily, plays a role at the embryo development and cell proliferation in meristematic regions. Thus, this study aimed to isolate and characterize these genes expression at the formation of somatic embryos in *Passiflora cincinnata*. For this, total RNA of 20-days-embryos in induction medium was extracted and the cDNA obtained. This served as a template for the coding region amplification using degenerate primers of *SERK* and *BBM*. The predicted size fragments were purified from the gel, linked to the vector and introduced into ultracompetent cells. The deduced amino acid sequences of the *SERK* and *BBM* selected clones showed similarities with *SERK* and *BBM* proteins deposited on the NCBI database. The phylogenetic relationship between isolated sequences of *P. cincinnata* and other species showed that the protein functions can be preserved in this species. Furthermore, the topology of the trees generated very coherent groups for both *SERK* and *BBM*. In *SERK*, the Pc contig1 grouped up with *SERK1* and *SERK2* members, while the Pc contig2 grouped with *SERK3/BAK1* members. On the other hand, the *BBM* Pc contig1 was grouped with *BBM1* and *BBM2* members. The expression of *SERK* gene was found in zygotic embryos and gradually decreased until 20 days in the induction medium. After 30 days in the induction medium, globular somatic embryos were intensely marked with the hybridization signal, as well as embryos with 5 and 40 days in the maturation medium. *BBM* transcripts were observed in zygotic embryos, but the expression was stopped during the somatic embryos development. The expression was resumed in somatic globular embryos after 40 days in the maturation medium, similar to that observed in zygotic embryos. Likewise, the sense probe did not show positive signal at the evaluated stages. Therefore, it is suggested that the expression of these genes is associated with embryogenic competence acquisition process and can be a molecular marker of this process. These results of isolation and expression of *SERK* and *BBM* genes in *P. cincinnata* are original and contribute to a better understanding of the processes involving somatic embryogenesis in this species.

**Keywords:** *Passiflora*, somatic embryogenesis, *SERK*, *BBM*, *in situ* hybridization, phylogenetic analysis.

## 1. INTRODUÇÃO

Os eventos morfogênicos *in vitro* decorrentes da reprogramação celular rumo à aquisição da competência para a regeneração estão intimamente associados à plasticidade de células somáticas vegetais e constituem as bases de aplicação da cultura de tecidos em processos biotecnológicos. Nesse sentido, tem sido crescente a busca ao maior entendimento da regulação dos processos morfogênicos *in vitro* organogênese e embriogênese somática em níveis celular, fisiológico e molecular (Namasivayam 2007; Kurczynska et al. 2012; Elhiti et al. 2013).

O processo morfogênico via embriogênese somática é análogo à embriogênese zigótica, em que uma única célula ou um grupo de células somáticas se tornam precursoras de embriões somáticos (Namasivayam 2007; Rocha e Dornelas 2013). A iniciação da embriogênese somática requer sinais hormonais únicos que culminam na formação de estruturas bipolares, dando origem a uma planta completa, sem que haja a fusão de gametas (Komamine et al. 2005; Yang et al. 2010).

Notadamente, a embriogênese somática tem sido utilizada em sistemas de propagação *in vitro*, além de muito explorada em programas de transformação genética de plantas e contribui para a compreensão dos aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da diferenciação celular durante a embriogênese vegetal (Perez-Nuñez et al. 2009; Pinto et al. 2011).

As auxinas são importantes tanto para a aquisição de competência embriogênica quanto para o desenvolvimento do embrião (Raghavan 2004). A capacidade do 2,4-D em ativar as rotas embriogênicas pode estar relacionada à sua aptidão em induzir genes do estresse que contribuem na reprogramação celular de células somáticas para embriogênicas (Parveen e Shahzad 2014). A mobilidade dessas pequenas moléculas e as respostas que elas evocam ressalta seu potencial a este

respeito. Mudanças temporal e espacial nos níveis endógenos de auxinas são importantes fatores que controlam o destino celular embriogênico (Féher et al. 2003).

Segundo van Arnold (2008), a embriogênese somática pode ser aplicada com eficiência no cultivo *in vitro* de todas as espécies de plantas, desde que condições favoráveis sejam aplicadas. Essa técnica se mostrou bem sucedida em sistemas de regeneração para muitas espécies (Yang e Zhang 2010). Em *Passiflora*, o emprego da embriogênese somática foi relatado para *P. giberti* (Otoni 1995; Otoni et al. 1996; Rosa et al. 2015), *P. cincinnata* (Reis et al. 2007; Silva et al. 2009) e *P. edulis* (Paim-Pinto et al. 2011; Rosa et al. 2015), *P. alata* e *P. crenata* (Rosa et al. 2015). Esse sistema de regeneração se demonstra mais atraente que a organogênese em função do número expressivo de regenerantes e do baixo nível de variação somaclonal (Gaj 2001; Paim-Pinto et al. 2010).

A transição de células somáticas para células com competência embriogênica deve abranger a associação entre a reprogramação da expressão gênica a fatores anatômicos e fisiológicos, que reflete os processos de desdiferenciação, ativação da divisão celular e mudança no destino das células (Santos et al. 2005). Neste contexto, diversos trabalhos envolvendo genes marcadores do processo embriogênico tem sido desenvolvidos em diferentes espécies, a fim de monitorar e caracterizar os processos de desenvolvimento *in vitro*. Assim, os genes da família *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*) e *BBM* (*Baby Boom*), entre outros, tem sido bastante promissores nesses estudos. Os primeiros relatos da expressão do gene *SERK* foi em cenoura (*Daucus carota*) por Schmidt et al. (1997) e do gene *BBM* em *Arabidopsis thaliana* e *Brassica napus* por Boutillier et al. (2002). Schmidt et al. (1997) observaram que o gene *SERK* codifica um receptor de proteína quinase do tipo RLKs (*Repeat-Like Kinases*) na qual se encontra a subclasse LRR (*Leucine Rich Repeat*). As proteínas que apresentam o

domínio LRR são responsáveis pela transdução de sinais e acredita-se que medeiam informações proteínas-proteínas (Shiu e Bleecker 2001). Segundo Schimdt et al. (1997) o *screening* diferencial entre células embriogênicas e não-embriogênicas, apontou expressão do *SERK* somente em células embriogênicas, reiterando o papel do *SERK* como componente da via de transdução de sinais que indica embriogênese somática e zigótica.

Com a associação da expressão do gene *SERK* à embriogênese, tem-se elevado o número de pesquisas que envolvem o mecanismo da aquisição de competência celular para a embriogênese em diversas espécies, como *Zea mays* (Baudino et al. 2001; Zhang et al. 2011), *Medicago truncatula* (Nolan et al. 2009), Valencia sweet orange (*CitSerk1-Like*) (Ge et al. 2010), *Arabidopsis* (Hecht et al. 2001), *Oryza sativa* (Hu et al. 2005), *Cocos nucifera* (Perez-Nuñez et al. 2009), *Dactylis glomerata* (Somleva et al. 2000), *Vitis vinifera* (Schellenbaum et al. 2008), *Solanum tuberosum* (Sharma et al. 2008), *Rosa canina* (Kedong et al. 2011), *Rosa hibrida cv. Linda* (Zakizadeh et al. 2010), *Saccharium* spp (Vicentini et al. 2009), *Triticum aestivum* (Singla et al. 2008), *Theobroma cacao* (Santos et al. 2005), *Musa acumminata* (Huang et al. 2009), *Araucaria angustifolia* (Steiner et al. 2011), *Momordica charanthia* (Talapatra et al. 2013) e *Coffea arabica* (Silva et al. 2014).

O gene *BABY BOOM (BBM)*, juntamente com *AINTEGUMENTA (ANT)* e *PLETHORA (PLT)* compõem a família de fatores de transcrição AINTEGUMENTA-Like (AIL) presente na superfamília AP2/ERF (Horstman et al. 2014). Esses genes são expressos em tecidos jovens e em divisão e tem papel de estabelecer e manter meristemas, bem como, iniciação e crescimento de órgãos (Horstman et al. 2014; Yang et al. 2014). Análises funcionais de *BBM* indicaram que esse gene ativa rotas de transdução de sinais levando à indução do desenvolvimento do embrião a partir da

diferenciação de células somáticas (Boutillier et al. 2002). A expressão do *BBM* provocou a formação espontânea (sem a adição de reguladores de crescimento) de calos embriogênicos e embriões somáticos em *Arabidopsis*, *Brassica napus* e *Glycine max* (Boutillier et al. 2002; El Ouakfaoui et al. 2010). Em *Coffea arabica* o *CaBBM* pode ser utilizado como marcador molecular do processo de embriogênese *in vitro* e pode ser um bom parâmetro para avaliar a aquisição da capacidade embriogênica de tecidos em diferenciação (Silva et al. 2014). Técnicas de hibridização *in situ* permitem acompanhar a localização espacial e temporal dos genes *SERK* e *BBM* nos tecidos durante a formação e desenvolvimento de embriões somáticos.

*Passiflora cincinnata* Masters, conhecida popularmente como ‘maracujá-domato’, tem sido utilizada como planta modelo para estudos morfogênicos *in vitro*, e demonstra relevante potencial de ser explorada em aspectos celulares envolvidos na aquisição de pluripotência em sistemas organogênicos com elevadas frequências de brotações (Lombardi et al. 2007; Dias et al. 2009; Silva et al. 2011) ou totipotência celular e é uma das poucas espécies do gênero em que a embriogênese somática foi descrita (Reis et al. 2007; Silva et al. 2009; Paim-Pinto et al. 2010; Rocha et al. 2012)

Considerando a importância da espécie-alvo do presente trabalho, sua elevada responsividade para a embriogênese somática (Silva et al. 2009; Paim-Pinto et al. 2011; Rocha et al. 2012) e a inexistência de trabalhos envolvendo aspectos moleculares dessa importante via morfogênica em Passifloraceae, objetivou-se isolar e caracterizar os genes *SERK* e *BBM* em culturas embriogênicas de *P. cincinnata*, bem como, averiguar o padrão de expressão desses genes ao longo do processo de indução embriogênica.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal para indução de embriogênese somática**

As sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. foram obtidas a partir de frutos colhidos no pomar de polinização aberta do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Foram utilizadas culturas embriogênicas de *Passiflora cincinnata* na etapa de indução (MI) e maturação (MM). Durante a etapa de indução embriões zigóticos foram expostos ao meio MS acrescido de 2,4-D (18,1  $\mu$ M) e BA (4,5  $\mu$ M) sob condição de escuro. Na etapa de maturação as culturas foram submetidas ao meio MS acrescido de carvão ativado e livre de fitorreguladores, segundo protocolo de embriogênese somática descrito por Silva et al. (2009).

### **2.2. Coleta de amostras**

Foram coletadas amostras para extrações de RNA, análises de hibridização *in situ* e histológicas com 0, 10, 20 e 30 dias no MI e amostras com 5 e 40 dias no MM. As amostras coletadas tanto para extração de RNA quanto para hibridização *in situ* estavam isentas de RNases.

### **2.3. Extração de RNA**

O RNA total foi extraído a partir de culturas embriogênicas com 20 dias em meio de indução, utilizando o Tris-Reagent<sup>®</sup> (Sigma), de acordo as instruções do fabricante. Aproximadamente 500 mg da amostra foi macerada em nitrogênio líquido, com o auxílio de gral e pistilo (livre de RNases), e em seguida, transferida para tubo Eppendorf<sup>®</sup> com volume de 1,5 mL contendo 500  $\mu$ L de Tris-Reagent<sup>®</sup> e 50  $\mu$ L da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1, v/v). Homogeneizou-se em vórtex, durante 30 segundos, seguido de incubação em gelo por cinco minutos e centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, a fase aquosa (sobrenadante)

foi recolhida para um tubo tipo Eppendorf<sup>®</sup> novo, e adicionou-se o mesmo volume de isopropanol para a precipitação do RNA durante uma hora a -20 °C. Após a centrifugação os *pellets* foram lavados em 1000 µL de etanol 70 % (livre de RNAses) e centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm a 4 °C; o sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos em capela de fluxo laminar, para retirada do excesso de etanol e secagem. Logo após, o RNA foi ressuscitado em 30 µL de água tratada com Dietil pirocarbonato (DEPC, Sigma) e mantido a -20 °C.

A quantificação do RNA foi realizada em NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies<sup>™</sup>) com absorvância de 260 nm e a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2 % (RNase free).

#### **2.4. Síntese de cDNA fita simples (Superscript II – Invitrogen<sup>™</sup>)**

Para síntese do cDNA fita simples utilizou-se 3 µg de RNA total e 500 ng de oligo d(T) (Promega, USA) em um volume final de 12 µL em água DEPC. A mistura foi aquecida a 65 °C para desnaturação por cinco minutos e, em seguida colocada no gelo por dois minutos. Foram então adicionados 4 µL de tampão de síntese da primeira fita de DNA, 1 µL da mistura de dNTPs (10 mM cada), 2 µL de DTT e 1 µL (200 U) da enzima transcriptase reversa (*SuperScript<sup>™</sup> First-Strand Synthesis System*, Invitrogen<sup>™</sup>). A reação de síntese ocorreu em um ciclo de 42 °C durante 50 minutos seguidos de 15 minutos a 70 °C para inativação da enzima no termociclador (Biocycler MJ25). O cDNA foi armazenado a -20 °C, até o momento do uso.

## 2.5. Amplificação e clonagem da sequência codificadora de genes da família

### *SERK* e *BBM*

O cDNA obtido a partir do RNA total de calos embriogênicos foi utilizado como molde para a amplificação da sequência codificadora de *SERK* e *BBM* em *P. cinnamomata*. Para amplificação de genes da família *SERK* foram utilizados iniciadores degenerados desenhados a partir de sequências presentes em regiões altamente conservadas nas combinações S1-S3, S1-S5 e S2-S5 (Baudino et al. 2001) (Tabela 1; Figura 1).

Para amplificação de genes da família *BBM*, iniciadores degenerados foram previamente desenhados a partir de sequências de *BBM* pertencentes à superfamília de fatores de transcrição *AP2/ERF* (*ethylene-responsive transcription factor*) de diferentes espécies disponíveis no banco de dados do Centro Nacional de informações em Biotecnologia (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os iniciadores foram desenhados em regiões conservadas do gene que codificam parte do domínio funcional AP2 das espécies *Arabidopsis thaliana* (NM121749.2), *Arabidopsis lyrata* (XM002873782.1), *Brassica napus* (AF317904.1), *Medicago truncatula* (AY899909.1), *Glycine max* (XM006590107.1), *Brachypodium distachyon* (XM010931856.1) e *Zea mays* (XM008682526.1).

A reação de PCR ocorreu em um volume final 50 µL contendo 2 µL de cDNA, 5 µL de tampão 10 X, 1 µL de dNTPs, 2 µL de MgSO<sub>4</sub> (50mM), 1 µL de cada iniciador e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity - Invitrogen<sup>TM</sup>). A reação no termociclador (Bio-Rad C1000 Touch<sup>TM</sup> Thermal Cycler) foi programada da seguinte forma: desnaturação a 94 °C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C (1 minuto), 50 °C (1 minuto), 68 °C (1 minuto) e uma extensão final a 68 °C por cinco minutos.

Os produtos da amplificação dos genes *SERK* e *BBM* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0 %. Os fragmentos amplificados foram purificados do gel com o Kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR clean up (Promega<sup>®</sup>), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a purificação, os fragmentos foram ligados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega<sup>®</sup>), na proporção de 3:1 de inserto:vetor, com a enzima T4 DNA ligase (Promega<sup>®</sup>), de acordo com as recomendações do fabricante. Os plasmídeos obtidos foram introduzidos em *Escherichia coli* (DH 5 $\alpha$ ), por choque térmico. Para transformação foram utilizados 5  $\mu$ L da ligação (inserto) e 100  $\mu$ L de células ultracompetentes DH5 $\alpha$  ( $1 \times 10^8$ ). Após incubação a 37 °C por 1 hora, as células foram plaqueadas em meio seletivo LB (Sambrook e Russel 2001) sólido contendo 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de ampicilina, 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (X-Gal) e 0,1 mM de isopropil-beta-D (IPTG) e mantidas a 37 °C, por aproximadamente 14 horas. Para confirmação da presença do inserto no vetor, o DNA plasmidial das colônias brancas foi clivado com a enzima de restrição *EcoRI* e os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose 1,0 %.

## **2.6. Caracterização e análise de sequências dos genes *SERK* e *BBM* em *P.***

### ***cinnata***

Clones selecionados pela análise de restrição foram sequenciados nos sentidos *sense* e *antisense*, com os iniciadores universais M13. O sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen, localizada na Coreia do Sul.

A análise dos cromatogramas e a montagem das sequências *consensus* foi realizada no programa CodonCode<sup>™</sup> Aligner-software (Li-COR, Inc., MA, USA ).

As sequências *consensus* obtidas foram comparadas com as sequências já existentes no banco de dados do NCBI, utilizando-se os algoritmos Blastn (Altschul et al. 1997). O programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) foi utilizado para identificação da fase de leitura e predição das proteínas. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas com sequências homólogas das proteínas SERK e BBM disponíveis no banco de dados do NCBI que apresentaram maior identidade com as de *P. cincinnata*, para identificação dos domínios conservados.

## **2.7. Análise filogenética**

O relacionamento filogenético das sequências de SERK e BBM de *P. cincinnata* com as de outras espécies foi inferido, mediante análises de árvores filogenéticas. Para confecção das árvores não enraizadas utilizou-se o programa MUSCLE (Edgar 2004) implementado no MEGA versão 6.0 (Tamura et al. 2011) disponível em <http://www.megasoftware.net/mega6>, e utilizado o método de distância *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou e Nei 1987), com modelo de substituição JTT (Jones et al. 1992) e distribuição Gamma. A confiabilidade de cada ramo foi estimada via *Bootstrap* (Felsenstein 1985) para 1000 repetições.

## **2.8. Caracterização do padrão de expressão temporal e espacial dos genes**

### ***SERK e BBM de P.cincinnata por hibridização in situ***

#### **2.8.1. Coleta do material**

Foram coletadas amostras com 0, 10, 20, 30 dias em meio de indução e 5 e 40 dias em meio de maturação e imediatamente imersas em solução fixadora (paraformaldeído 4 % em água tratada com DEPC autoclavada e pH 7,5). As amostras foram submetidas a vácuo durante 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a

solução fixadora foi substituída por uma nova e as amostras foram mantidas 16 horas a 4 °C.

Depois, as amostras foram desidratadas em série etílica (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100 %), por 1 hora cada. As amostras foram infiltradas em parafina histológica (Parafina Histosec<sup>®</sup>, Merck), sendo submetidas a séries crescentes de etanol: xilol nas proporções 3:1; 1:1; 1:3 v/v e xilol puro (duas trocas), em que cada etapa teve duração mínima de 4 horas. Durante a etapa do xilol puro, as amostras foram mantidas em estufa a 60 °C. Após a substituição completa do xilol pela parafina, as amostras foram emblocadas com parafina nova em moldes de papel e, após a completa polimerização, foram fixadas em suportes de madeira e estocadas a 4 °C.

Foram realizadas secções de 4 µm em micrótomo rotativo (modelo CUT 4055, Olympus America Inc.) e colocadas em banho-maria contendo água tratada com DEPC, aquecida a 42 °C, para distender as secções, sendo depois dispostas em lâminas histológicas Fisherbrand<sup>®</sup> (Fisher Scientific), e livre de RNAses. Em seguida, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e armazenadas a 4 °C até momento de uso. Antes da hibridização, a parafina foi removida com lavagens em xilol 100 %, xilol:etanol (1:1, v/v), etanol puro, duas vezes de cinco minutos cada.

### **2.8.2. Construção de sondas *sense* e *antisense***

Dois clones contendo as sequências parciais dos genes *SERK* e *BBM* de *P. cincinnata* foram selecionados conforme a orientação correta 5'- 3' dos insertos no vetor, e utilizados como molde para a amplificação de fragmentos gênicos flanqueados pelos promotores T7 e SP6. Reações de PCR foram feitas a partir de 10 ng do DNA plasmidial com os primers T7 (*sense*) e SP6 (*antisense*), utilizando as mesmas condições de PCR mencionadas anteriormente. Os produtos de PCR foram purificados

com fenol/clorofórmio 1:1 e em seguida em clorofórmio puro para total remoção do fenol residual. A precipitação do DNA foi obtida com acetato de sódio 3M (1/10 volumes) e 2 volumes de etanol absoluto. Os fragmentos purificados foram quantificados em Nanodrop e também analisados em gel de agarose 1,0% utilizando-se o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen<sup>TM</sup>).

Sondas *sense* e *antisense* do gene *SERK* foram construídas utilizando como molde o fragmento de 557 pb de uma região conservada que codifica desde o domínio LRR, o domínio SPP, o qual é específico de *SERK*, e ausente nas demais proteínas LRR quinases, o domínio transmembrana e parte do domínio quinase (primer S5-S2). Para o gene *BBM* utilizou-se como molde um fragmento de 288 pb de uma região conservada que codifica o domínio AP2.

As sondas de RNA marcadas com digoxigenina conjugada (DIG-UTP) foram sintetizadas por transcrição *in vitro* com 1 µg dos fragmentos purificados utilizando-se para tanto o *DIG RNA Labeling Kit* (SP6/T7), segundo recomendações do fabricante (*Roche Applied Science*). As concentrações das sondas foram verificadas por gel de agarose 1,2% utilizando-se 100 e 200 ng do controle positivo de RNA marcado do mesmo *Kit* e a marcação confirmada por ‘dot blot’. A sonda *sense* (T7) foi utilizada como controle negativo da reação para a hibridização *in situ*.

### **2.8.3. Hibridização *in situ***

Para a etapa de hibridização uma alíquota de 60 ng de tRNA de levedura (Gibco BRL<sup>®</sup>) e 60 ng de sonda foram desnaturados a 80 °C por 5 minutos e adicionados a 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). Em seguida, 100 µL do mix de hibridização foram colocados sobre os cortes em cada lâmina e

cobertas com Parafilm<sup>®</sup>. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro, por um período de 16 horas.

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em solução SSC 4X, 2X, 1X e 0,5X (solução SSC 20X = NaCl 3 M, Na<sub>3</sub>-citrato 0,3 M, pH 7,2), cada solução por 30 minutos. Em seguida mantidas por 5 minutos em tampão de detecção 1 (0,1 M de Tris HCl - pH 7,5; 0,15 M de NaCl) e incubadas por 30 minutos em tampão de bloqueamento (BSA 2 %). As lâminas foram novamente lavadas em tampão de detecção 1, por 5 minutos, e incubadas durante 1 hora com anticorpo *Anti-Digoxigenine AP Fab Fragments* (Roche<sup>®</sup>) diluído 1:1.000 em tampão de detecção 1. Procederam-se duas lavagens, de 15 minutos cada, em tampão de detecção 1 e uma lavagem de 5 minutos em tampão de detecção 3 (0,1 M de Tris HCl - pH 7,5; 0,1 M de NaCl; 0,05 M de MgCl<sub>2</sub>, pH 9,0). As secções, então, foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (0,05 g mL<sup>-1</sup>) e 4,5 µL de NBT (nitroblue tetrazólio) (0,05 g mL<sup>-1</sup>) em 1 mL de tampão 3 por 1 hora, no escuro. Para cessar a reação, as secções foram incubadas no tampão de detecção 4 (0,01 M de Tris HCl - pH 8,0; 1 mM EDTA) por 10 minutos, seguidas por duas lavagens em água ultrapura autoclavada por 5 minutos e realizada a captura de imagens.

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.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

#### **2.8.4. Caracterização anatômica**

Foram coletados e fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) por 16 horas embriões com 0, 10, 20 e 30 dias em MI e com 5 e 40 dias em MM.

Posteriormente, foram desidratados em série etílica crescente e incluídos em resina metacrilato (Historesina, Leica®). Os blocos foram seccionados com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 - Leica), e os cortes, de 5µm de espessura, foram aderidos em lâminas histológicas e corados com azul de toluidina (O'Brien and McCully 1981), com pH 4,4. Após a secagem, as lâminas foram montadas em resina sintética Permount. A captura de imagens foi realizada utilizando fotomicroscópio (AX70 TRF, Olympus Optical) equipado com o sistema U-Photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

### **3. RESULTADOS**

#### *3.1. Isolamento e análise da provável sequência codificadora de SERK e BBM em P. cinnata*

Para o gene *SERK* todas as combinações utilizadas dos iniciadores degenerados amplificaram fragmentos de tamanhos previstos. Como esperado as combinações S1-S3 e S1-S5 amplificaram os maiores fragmentos de aproximadamente 1,3 e 0,9 Kb, respectivamente. A combinação S2-S5 gerou um fragmento menor com 557 pb. No total foram sequenciados 50 clones pertencentes a todas as combinações dos iniciadores degenerados. Para a continuidade das análises optou-se por trabalhar com sequências maiores oriundas da combinação S1-S3. Após a análise e alinhamento das sequências de 12 clones foram gerados dois contigs: Pc contig1, com 1224 pb, e o Pc contig2, com 1185 pb.

Quanto ao gene *BBM*, os iniciadores degenerados desenhados a partir de sequências correspondentes a esse gene, disponíveis no NCBI, permitiram a

amplificação de dois fragmentos de tamanhos esperados. A análise das sequências de 5 clones de cada combinação gerou um contig com cerca de 308 pb.

As séries de nucleotídeos dos contigs gerados foram comparadas às sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados não redundante do NCBI, utilizando a ferramenta Blastn. Em relação a SERK, os Pc contigs1 e 2 foram comparados entre si usando o algoritmo Blast2 no NCBI, e apresentaram 77% de identidade. O alinhamento entre os contigs demonstrou a presença de diversas substituições de bases do Pc contig2 em relação ao 1 além da presença de *gaps* (3%), diferenciando as duas sequências. Ambos os contigs, quando analisados pelo Blastn, apresentaram identidade com sequências descritas como membros da família SERK de outras espécies disponíveis no GenBank. O Pc contig1 apresentou alta identidade, entre 77 e 88% (E-value 0,0), com sequências anotadas como *SERK1* e *SERK2* de outras espécies. Já o Pc contig 2 apresentou identidade entre 77 e 84% (E-value 0,0) com *SERK3/BAK1* e outras proteínas hipotéticas não nomeadas de outras espécies (Tabela 2).

No que concerne a *BBM*, o contig analisado também apresentou elevada identidade (83 a 85%, com E-value próximos de 0,0) com sequências descritas como *BBM1* e *BMM2* (Tabela 3) de diferentes espécies vegetais, assim como de outros fatores de transcrição da família AP2 como *Aintegumental* (*ANT1*) e *Plethora 2* (*PLT2*). Dos 100 hits alinhados com o contig na análise do Blastn, 47 foram para *BBM*, 13 para *ANT*, 10 para *PLT* e 26 sequências eram hipotéticas não nomeadas.

Os contigs relacionados à SERK apresentaram ORFs (*Open Reading Frame*) de tamanhos próximos: o Pc contig1, com 382, e o Pc contig 2, com 355 aminoácidos. O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos das ORFs pelo Blast2 revelou 84% de similaridade. A comparação dessas sequências com o banco de proteínas não redundantes do NCBI, pelo Blastp e Blastx, demonstrou similaridade de ambos os

contigs com proteínas preditas pertencentes à família SERK. Para o Pc contig1 foi observada similaridade entre 82 e 98% (E-value 0,0) com SERK1 e SERK2 de outras espécies. O Pc contig2, por sua vez, apresentou maior similaridade (78 a 89%, E-value 0,0) com sequências relacionadas a SERK3/BAK1.

O múltiplo alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas dos contigs com *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum* e *Theobroma cacao* revelou a presença de domínios estruturais característicos dos membros da família SERK. As sequências parciais de aminoácidos dos Pc contig1 e 2 exibem parte do domínio extracelular, tendo início nos motivos ricos em leucina (*Leucine rich region*), LRR1 estendendo-se ao LRR5, ao domínio SPP (região rica em prolina), a região transmembrana e parte do domínio quinase (Figura 3). Além disso, pode-se observar maior similaridade do Pc contig1 com SERK1 e 2, e maior semelhança do Pc contig2 com SERK3/BAK1, evidenciada principalmente pela presença de um *gap* observado na posição 212, localizado na região rica em prolina (SPP).

O contig relacionado à BBM apresentou uma ORF de 84 aminoácidos, e elevada similaridade com o domínio funcional característico dos fatores de transcrição da família AP2. Resultados do Blastp e Bastx com o banco de proteínas não redundantes do NCBI indicaram similaridade acima de 90% (90 a 95%) com sequências descritas como BBM1 e BBM2 de outras espécies, além de AIL e PLT (86-89% de similaridade). Dos 100 *hits* encontrados pelo Blastp, 39 pertenciam a BBM, 25 a AIL e 17 proteínas preditas não nomeadas. Os melhores valores de E-value foram encontrados para BBM.

A série de aminoácidos predita foi alinhada com sequências de outras espécies como *Arabidopsis thaliana*, *Malus domestica*, *Glycine max*, *Populus euphratica* e *Solanum lycopersicum* encontradas no GenBank. Esse alinhamento confirmou a presença do domínio AP2-Like característico dos membros desta família (Figura 4).

### 3.2. Análise Filogenética

Para inferir as relações filogenéticas dos Pc contig1 e 2 relacionados as proteínas SERK, foram consideradas as sequências compreendidas entre a região LRR1 até o domínio quinase de proteínas da família SERK. No caso da proteína BBM, o fragmento obtido foi pequeno e as sequências das proteínas usadas na construção da árvore foram baseadas na região conservada AP2-Like de BBM e de outros membros da família como PLT e AIL.

Foi observada a composição de diferentes grupos bem sustentados, pela análise filogenética, tanto para SERK como para BBM, indicado pelo teste de *Bootstrap* (Figuras 5 e 6). Para análise da proteína SERK observaram-se dois grupos distintos. O Pc contig1 agrupou especialmente com SERK1 e SERK2 de diversas espécies, estando mais próximo de *Ricinus communis*, *Carica papaya*, *Populus euphratica* e *Vitis vinifera* (Figura 5). Por sua vez, o Pc contig2 agrupou-se com um segundo grupo formado por SERK3/BAK1 de outras espécies. Entre as espécies agrupadas mais próximas estão *Vitis vinifera*, *Populus euphratica* e *Citrus sinensis* (Figura 5).

Quanto à proteína BBM constatou-se dois grupos formados, um composto por BBM1 e 2 e o outro pelos demais fatores de transcrição dessa família, como AINTEGUMENTA e PLETHORA1 e 2. O contig isolado em *P. cincinnata* ficou mais próximo de BBM2-Like de *Glycine max* e BBM de *Cicer arietinum* (Figura 6).

### 3.3. Análise estrutural e caracterização do padrão de expressão de BBM e SERK por hibridização in situ

Embriões zigóticos de *P. cincinnata* (Figura 7A), utilizados como explante, apresentaram cotilédones com superfície regular e nenhuma alteração morfológica até cinco dias em meio de indução. Foi ainda observado protoderme bem definida e

procâmbio sem alterações (Figura 7B). A fim de promover a caracterização da expressão dos genes *BBM* e *SERK* em culturas embriogênicas de *P. cinnamata* ao longo do processo de indução, no explante inicial foi observado sinal característico da presença de transcritos dos genes *BBM* (Figura 7C) e *SERK* (Figura 7D) quando tratados com a sonda *antisense*.

Aos 10 dias após a indução, o processo de formação de embriões somáticos iniciou-se preferencialmente na região abaxial dos cotilédones (Figura 7E). Os embriões zigóticos apresentaram intumescimento uniforme e sucessivas divisões na protoderme, no sentido anticlinal, levando à sua expansão e adquirindo formato colunar. Adicionalmente, constatarem-se divisões periclinais, caracterizando assim a formação de protuberâncias (Figura 7F). Verificou-se sinal positivo para os tecidos tratados com sondas *antisense* dos genes *BBM* e *SERK* (Figura 7G e H, respectivamente). Notou-se que a expressão do gene *SERK* estava mais intensificada nesse estágio quando comparado ao *BBM*.

Após 20 dias em meio de indução houve intensa formação de zonas pró-embriogênicas, que recobriram praticamente toda superfície do embrião zigótico, provenientes da desdiferenciação das protuberâncias formadas (Figura 7N). Observou-se ainda que, a desdiferenciação das zonas pró-embriogênicas em embriões somáticos foi gradual e assincrônica (Figura 7I). Nenhuma resposta positiva foi verificada em zonas pró-embriogênicas quando submetidas ao teste com a sonda *sense* de *BBM* após 20 dias em meio de indução (Figura 7J). No entanto, nesse mesmo estágio de desenvolvimento, quando tratados com a sonda *antisense* para *SERK*, houve reação positiva, ainda que, com um sinal menos intenso comparativamente aos estágios anteriores (Figuras 7K e L, respectivamente).

Embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento foram observados após 30 dias em meio de indução (Figura 7M), assim como a presença de clusters embriogênicos evidenciando características meristemáticas (Figura 7N). Não foi observada expressão do gene *BBM* quando utilizado a sonda *sense* aos 30 dias (Figura 7O). Embriões somáticos no estágio globular foram fortemente marcados pelo gene *SERK* aos 30 dias de cultivo em meio de indução (Figura 7P).

As culturas embriogênicas foram transferidas para o meio de maturação e, após 5 dias nessa condição, observou-se a presença de vários embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 8A). Aos 40 dias em meio de maturação constatou-se a presença de embriões somáticos nos estádios cordiforme, torpedo e cotiledonar, esses bastante desenvolvidos (Figura 8B). Constatou-se a presença de compostos fenólicos dispostos em cordão por toda extensão do explante (Figura 8C).

Após 5 dias em meio de maturação, foram observados transcritos do gene *BBM* (Figura 8E) com sinal fraco. Contrariamente, o *SERK* (Figura 8G) apresentou sinal acentuado, especialmente em embriões globulares. Aos 40 dias em meio de maturação constatou-se a expressão do gene *BBM* (Figura 8D e F) e *SERK* (Figura 8H) apenas em embriões cotiledonares, em que o sinal cobriu todo embrião, sendo mais intensificado, assemelhando-se ao padrão de expressão observado em embriões zigóticos (Figura 7C e D).

#### **4. DISCUSSÃO**

Em continuidade aos trabalhos pioneiros em embriogênese somática de *Passiflora* desenvolvidos por nosso grupo (Silva et al. 2009; Paim-Pinto et al. 2010; Rocha et al. 2012; Otoni et al. 2013) buscou-se, no presente trabalho, conhecimento

adicional sobre os padrões de expressão dos genes *SERK* e *BBM* durante a formação de embriões somáticos nessa espécie.

Observou-se a formação de protuberâncias, a partir da desdiferenciação das células da epiderme e parenquimáticas, que culminou no desenvolvimento de embriões somáticos de forma gradual, porém assincronicamente. Estas observações corroboram Rocha et al. (2012) e Rocha et al. (2015) os quais descreveram que em *P. cincinnata* e em *P. edulis*, respectivamente, o padrão multicelular observado durante a formação dos embriões somáticos se deve a desdiferenciação das células periféricas das protuberâncias e a rediferenciação em grupos de células individualizadas (zonas pró-embriogênicas).

Os mecanismos que levam à formação de embriões somáticos são complexos, mas comum em diversas espécies. Durante a fase de transição de somática para embriogênica, as células devem se desdiferenciar, ativar o ciclo de divisão celular e reorganizar os padrões fisiológicos, metabolismo e expressão gênica. O gene *SERK* é necessário para aquisição de totipotência e formação de células embriogênicas (Namasivayam 2007).

Zhang et al. (2011) avaliaram a relação entre a embriogênese somática (ES) e a expressão de vários genes *SERK* em milho. Observou-se que o 2,4-D aumenta a atividade dos transcritos de *ZmSERK* e promove a ES; em contrapartida, a citocinina (BA) inibe a ES e reduz a expressão do *ZmSERK1* e *ZmSERK2*, entretanto, eleva significativamente a expressão do *ZmSERK3*. Os autores inferem que os genes *ZmSERK1* e 2 parecem desempenhar importante papel na manutenção da embriogênese, enquanto o *ZmSERK3* configura um papel duplo na embriogênese por modulação dos seus níveis de expressão (Zhang et al. 2011). Observações contrastantes foram vistas no

presente estudo, uma vez que a associação de 2,4-D e BA levou à formação de embriões somáticos, nos quais foi constatada a presença de transcritos dos genes *SERK* e *BBM*.

É importante salientar que a indução de ES e a expressão do gene *SERK* foram observadas em cenoura (*Daucus carota*) e *Arabidopsis* em meio de cultivo adicionado de auxinas (Schmidt et al. 1997; Hecht et al. 2001), ao passo que em *Theobroma cacao* e *Medicago truncatula* tal indução e a presença de transcritos de *SERK* foram observadas em meio mediante a combinação de auxinas e citocininas (Nolan et al. 2003; Santos et al. 2005). Esses resultados estão em conformidade com o observado em *P. cincinnata*.

#### 4.1. Isolamento de possíveis homólogos de *SERK* e *BBM* durante a ES em *P. cincinnata*

Em *P. cincinnata* duas sequências parciais relacionadas à proteína SERK foram isoladas nesse trabalho a partir do cDNA de calos embriogênicos, utilizando-se primers degenerados. O alinhamento das sequências de 12 clones da combinação S1-S3 gerou o Pc contig1 com 1224 pb e Pc contig2 de 1185 pb. As análises de Blastn e Blastp revelaram alta identidade e similaridade, respectivamente, desses contigs com membros da família SERK. Interessantemente, o Pc contig1 apresentou semelhanças com sequências anotadas como SERK1 e SERK2 de outras espécies disponíveis no banco de dados não-redundante do NCBI. Por outro lado, o Pc contig2 demonstrou maior proximidade com sequências descritas como SERK3/BAK1.

Savona et al. (2012) relataram em *Cyclamen persicum* que os genes *SERK1* e *SERK2* são apontados como marcadores de pluripotência, e a alta expressão desses genes em células meristemáticas mantém as condições de pluripotência levando-as a totipotência e, conseqüentemente, à embriogênese somática. Em *Triticum aestivum*, a

embriogênese somática também foi correlacionada à alta expressão do *SERK1* e *SERK2* e aumentada pela adição de auxina (Singla et al. 2008). Já em arroz (*Oryza sativa*), o *OsSERK1* está envolvido na sinalização de fitohormônios e sua expressão ectópica é mediada pela transdução de sinais de defesa. O *OsSERK2*, por sua vez, foi expresso em todos os órgãos com níveis essencialmente similares (Hu et al. 2005; Ito et al. 2005).

A proteína *SERK3* (também denominada *BAK1-BRASSINOESTEROID INSENSITIVE (BRI1)- ASSOCIATED KINASE1*) é um co-receptor de *BRI1* e tem sido mostrada por estar envolvida na imunidade de plantas de *Arabidopsis*, tomate e arroz, através de interações com *FLS2 (flagellin sensing 2)* e outros (Du et al. 2012; Bojar et al. 2014). A presença de *BRI1* está relacionada a mecanismos de sinalização via brassinoesteroides (BR) que controlam a resistência a patógenos (Karlova et al. 2006). Segundo Russinova et al. (2004) e Albrecht et al. (2008) em *Arabidopsis*, a função imunológica de *SERK3* é dependente de brassinoesteroides exógenos e parcialmente redundante com *SERK1*. Trabalhos com mutantes apontaram que a superexpressão do *SERK1* resultou no aumento da formação de células embriogênicas em resposta a auxinas (Rusinova et al. 2004).

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos para desvendar o papel de *SERK1*, *2*, e *3* e suas implicações durante a embriogênese somática (Singla et al. 2008). Sabendo-se que *SERK1* e *SERK3* funcionam como sinalizador dos brassinoesteroides, estudos com alelos mutantes de *Arabidopsis*, averiguaram se a sinalização de BR influencia no grau de competência embriogênica. Os resultados sugerem que a função de sinalização por BR é requerida para aquisição de competência embriogênica induzida por 2,4-D em explantes de *Arabidopsis*. Visto que, ambos *SERK1* e a sinalização por BRs foram essenciais para aquisição de competência embriogênica em cultura. Além disso, *SERK1* funcionando como co-receptor de *BRI1* mediado por sinalização similar

de brassinoesteroides ao *SERK3/BAK1* tornou-se interessante para determinar como outros mutantes da rota de BR se comportam (Kwaaitaal e deVries 2007).

Trabalhos desenvolvidos com *Zea mays* mostraram que a atividade de transcrição de *ZmSERK3* em células embriogênicas aumentou durante a segunda semana em meio de indução de embriogênese, apontando que os níveis de expressão aumentaram cerca de 10% quando comparado ao controle (Zhang et al. 2011). Esses dados constataam a participação de *SERK3* durante a embriogênese somática, bem como observado em *P. cincinnata*.

O múltiplo alinhamento das sequências nos permitiu observar diferenças pontuais de substituições de aminoácidos e a presença de deleções ou inserções representadas por *gaps*, sendo conservadas entre os diferentes membros da família SERK. Esses resultados foram confirmados também pela análise filogenética, na qual constatou-se dois grupos distintos, um deles formado por membros de SERK1 e SERK2, e o outro por SERK3/BAK1, SERK4 e SERK5.

A presença de *gaps*, predominantemente na região do domínio SPP, observados entre o Pc contig 2 e as sequências de espécies descritas no banco de dados como SERK3/BAK1, SERK4 e SERK5, e ainda, a ausência desse *gap* entre o Pc contig 1 e as sequências descritas como SERK1 e SERK2 nos levam a sugerir que em *P. cincinnata* foram clonados dois genes distintos, com diferenças pontuais. Índícios apontam se tratar do SERK1 ou SERK2 e o SERK3, tendo em vista que a região que compreende o *gap* entre o Pc contig2 e o SERK3 são correspondentes, enquanto que, SERK4 e SERK5 apresentam um tamanho maior de deleções ou inserções na região do *gap*. Nossos dados estão de acordo ao observado em *Vitis vinifera*, a qual apresenta um *gap* na região SPP do *VvSERK3* e este não é averiguado no *VvSERK1* e *VvSERK2* dessa espécie (Schellenbaum et al. 2008). Diferentemente, Sakamoto et al. (2012) observaram

que em tomate o SERK3/BAK1, SERK4 e SERK5 apresentam *gaps* de tamanhos similares.

A topologia da árvore filogenética gerada apresentou grupos bem sustentados para os membros da família SERK. O Pc contig1 agrupou-se com representantes de SERK1 e SERK2, a medida que, o Pc contig2 aproximou-se de ramos com SERK3/BAK1. Esses dados asseguram a presença de dois membros distintos da família SERK expressos durante a embriogênese somática em *P. cincinnata*.

Por se tratar de sequências parciais e em função da alta similaridade entre membros da família SERK não foi possível nomear os contigs. Entretanto, as análises de Blast e estudos filogenéticos indicaram que o Pc contig1 apresentou alta proximidade com SERK1 e 2, ao passo que, o Pc contig2 aproximou-se mais a SERK3/BAK1. Esses resultados sugerem que nossas sequências podem ser possíveis ortólogos de SERK1 ou 2 e de SERK3/BAK1.

Com relação à proteína BBM, os resultados de Blastn e Blastp indicaram alta similaridade com sequências descritas como BBM1 e BBM2 de outras espécies, e menor semelhança com AIL e PLT. Os genes *BBM*, *ANT* e *PLT* estão presentes na subfamília AIL, que está contida na família AP2 (Horstman et al. 2014). Vários genes de AIL são expressos em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento do ciclo de vida das plantas, o *AtBBM* é expresso durante a embriogênese somática (Boutillier et al. 2002), o *ANT* apresenta expressão durante o desenvolvimento floral (Elliott et al. 1996) e ambos *PLT1* e *PLT2* são observados durante o desenvolvimento das raízes (Aida et al. 2004). Esses dados nos levam a inferir que o gene clonado em *P. cincinnata* trata-se do *BBM*, uma vez que o material isolado para extração do RNA partiu de culturas embriogênicas e, além disso, análises de expressão confirmaram a presença desse gene em diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos.

Trabalhos desenvolvidos por El Ouakfaoui et al. (2010) apontaram que a expressão constitutiva de *BBM* de *Glycine max* em *Arabidopsis* induziu a formação espontânea de embriões somáticos em tecidos jovens. Boutillier et al. (2002) clonaram o gene *BBM* a partir de culturas de micrósporos de *Brassica napus* e mostraram a indução de embriões somáticos. A superexpressão desse gene promoveu a proliferação celular e morfogênese durante a embriogênese. Assim tem-se identificado que o gene *BBM* está envolvido nas modificações da parede celular associadas à divisão e crescimento das células, sugerindo que o *BBM* ative uma complexa rede de rotas de desenvolvimento ligadas à proliferação celular (Nole-Wilson et al. 2005; Horstman et al. 2014).

Estudos com tabaco transgênico apontaram que a expressão do *BBM* induziu efeitos pleitrópicos no crescimento e desenvolvimento vegetativo, mas não foi observada a indução da embriogênese (Srinivasan et al. 2007), indicando que as rotas embriogênicas diferem entre as espécies ou que os domínios dentro de *BBM*, que governam a embriogênese, apresentem divergências nas sequências entre as plantas e não foram reconhecidos (El Ouakfaoui et al. 2010).

Os resultados de filogenia apontaram a formação de grupos distintos, o Pc contig1 de *BBM* agrupou-se com membros de *BBM1* e *BBM2* de outras espécies. Por outro lado, constatou-se agrupamentos de representantes de *PLT1* e *PLT2* e de *AIL*. Nole-Wilson et al. (2005) observaram que *BBM*, *ANT*, *AIL* e *PLT*, membros da subfamília *AINTEGUMENTA-Like*, agrupam-se em ramos diferentes, bem como observado em *P. cincinnata*, apesar de, serem trabalhos com proposições diferentes. Os vários genes de *AIL* são expressos na maioria dos tecidos testados, indicando redundância genética entre os membros dessa subfamília (Nole-Wilson et al. 2005).

Tal como para o gene *SERK*, em *BBM*, por se tratar de sequências parciais não foi possível nomear o contig encontrado em *P. cincinnata*. No entanto, as análises de

Blast, estudos filogenéticos e análises de expressão por hibridização *in situ* nos levam a inferir que nossas sequências se tratam de possíveis ortólogos de BBM1 ou BBM2 clonados a partir de culturas embriogênicas de *P. cincinnata*.

#### 4.2. Comparação entre *Pc contig1 e 2 de SERK e Pc contig1 de BBM com os genes SERK e BBM de outras espécies*

Com base em pesquisas a bancos de dados específicos, apresentamos nesse trabalho o primeiro relato da ocorrência de genes da família *SERK* e *BBM* em *Passiflora cincinnata*. Análises das sequências parciais indicaram o isolamento de dois possíveis ortólogos de *SERK* e *BBM* expressos durante o processo de formação de embriões somáticos na espécie.

Muitos trabalhos tem relatado uma série de genes que estão ligados aos processos de regulação da embriogênese somática, no entanto, poucos estão envolvidos desde os estádios embriogênicos iniciais (Ge et al. 2010; Mantovani et al. 2013). Dentre eles, destacam-se o *SERK* (Schmidt et al. 1997; Hecht et al. 2001) e o *BBM* (Boutillier et al. 2002; Srinivasan et al. 2007; Irikova et al. 2012). Nosso trabalho apontou que em *P. cincinnata* os genes indicados como *Pc contig1 e 2 de SERK* podem ser considerados possíveis indicadores de embriogênese somática como observado em *Daucus carota* (Schmidt et al. 1997), *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al. 2001), *Ocotea catharinenses* (Santa-Catarina et al. 2004a), *Theobroma cacao* (Santos et al. 2005), *Oryza sativa* (Song et al. 2008), *Zea mays* (Baudino et al. 2001; Zhang et al. 2011), *Glycine max* (Pereira 2010), *Bixa orellana* (Matos 2013) e *Anthurium andraeanum* 'Eidibel' (Pinheiro 2014). Do mesmo modo, o gene citado como *Pc contig1 de BBM* pode ser considerado, além de outras funções, um indutor da proliferação celular que leva primariamente à embriogênese somática, em conformidade ao relatado em *Brassica napus* (Boutillier et

al. 2002; Passarinho et al. 2008), *Glycine max* (El Ouakfaoui et al. 2010), *Arabidopsis thaliana* (Kulinska-Lukasec et al. 2012), *Capsicum annuum* (Irikova et al. 2012), *Coffea arabica* (Silva et al. 2014) e *Rosa canina* (Yang et al. 2014).

Nossas investigações no banco de dados do NCBI permitiram inferir que, as sequências parciais das proteínas analisadas em *P. cincinnata* apresentaram alta similaridade com os domínios conservados tanto para *SERK* quanto para *BBM*. Em relação à proteína *SERK* as repetições ricas em leucina (LRR) e prolina (SPP), a região transmembrana e o domínio quinase observados, demonstraram organização característica e alta similaridade às demais proteínas *SERK*, comprovando assim sua conservação. Sharma et al. (2008) caracterizaram a expressão do gene *SERK* em *Solanum tuberosum* L. (*StSERK*) mostrando que a estrutura intron/exon e dos domínios conservados verificados confirmaram a presença desse gene na espécie. Assim, observamos também no corrente trabalho a presença dos domínios conservados da proteína e pressupomos a presença de *SERK* em *Passiflora cincinnata*.

O gene *SERK* codifica um receptor transmembrana que contém um domínio intracelular de proteína-quinase e um domínio extracelular rico em repetições de leucina (LRR- *Leucine-Rich Repeated*) (Becraft 1998; Becraft 2002). Este pertence a uma grande e diversificada família de receptores do tipo quinase (*Receptor-Like Kinase - RLKs*), os quais fazem parte de um grupo de proteínas de sinalização nas plantas e são responsáveis pela transdução de sinais durante a embriogênese somática (Schmidt et al. 1997; Somleva et al. 2000; Santos et al. 2005; Nolan et al. 2011). A localização estratégica das RLKs na membrana plasmática permite a percepção de sinais extracelulares e a condução para o interior da célula fomentando uma resposta (Nolan et al. 2011). Estudos adicionais sobre as estruturas das proteínas permitirão inferir sobre sua regulação e funcionalidade.

Em relação às análises do *BBM*, verificamos que em função de ter sido clonado um pequeno fragmento, observou-se que este recobre uma pequena porção que codifica a região da família AP2, e apresenta alta similaridade com o domínio funcional típico de *BBM* em outras espécies. O gene *BBM* está contido em uma superfamília de fatores de transcrição (*AP2/ERF*) específicos de plantas e está concatenado ao processo embriogênico e à proliferação celular em regiões meristemáticas (Boutillier et al. 2002).

A similaridade entre sequências de aminoácidos das proteínas do Pc contig1 e 2 de *SERK* e do Pc contig1 de *BBM* ao *SERK* e *BBM* de outras espécies corroboram a hipótese de que suas funções são conservadas, e que a presença dessas sequências estão intimamente relacionadas à embriogênese zigótica e somática, sendo considerados possíveis marcadores celulares e moleculares desse processo.

#### 4.3. *Expressão dos genes BBM e SERK em embriões somáticos de P. cinnamomum*

Os mecanismos moleculares sobre o estabelecimento e manutenção das rotas embriogênicas em plantas são, via de regra, pouco compreendidos. Dessa maneira, em nosso trabalho, foram realizadas análises moleculares a fim de ampliar o entendimento acerca dos eventos que ocorrem durante a embriogênese somática de *P. cinnamomum* a partir de embriões zigóticos.

Pela técnica de hibridização *in situ* observou-se que no embrião zigótico (tempo zero), a distribuição espacial de mRNAs de *BBM* e *SERK* se deu de maneira distinta ao longo do desenvolvimento dos embriões somáticos. A expressão do *BBM* decresceu gradativamente durante a etapa de indução. Todavia, após 40 dias em meio de maturação, embriões somáticos no estágio cotiledonar apresentaram intensa coloração confirmando a presença de transcritos desse gene. Por outro lado, a expressão do gene *SERK* foi verificada em todos os estádios de desenvolvimento, sendo intensificada em embriões globulares com 30 dias em meio de indução. Após 5 e 40 dias em meio de

maturação houve forte marcação do embrião somático semelhante ao observado no embrião zigótico.

Também por hibridização *in situ*, embriões somáticos derivados de micrósporos em *Brassica napus* e de sementes em *Arabidopsis*, expressaram o gene *BBM* desde os estádios iniciais do desenvolvimento do embrião e da semente (Boutillier et al. 2002), semelhante ao observado em *P. cinnamomata*. Irikova et al. (2012) relataram o papel específico do *BBM* na indução e manutenção da embriogênese *in vitro* a partir de micrósporos, bem como a conversão de embriões somáticos em plantas regeneradas.

O gene *BBM* participa não apenas da embriogênese somática (Stone et al. 2001; Boutillier et al. 2002), mas também de outras rotas morfogênicas (Passarinho et al. 2008; Yang et al. 2014). A superexpressão do gene *BBM* em *Rosa canina* (*RcBBM1* e *RcBBM2*) e *Arabidopsis thaliana* incrementou a capacidade de regeneração de brotos *in vitro* mas não induziu a formação de embriões somáticos (Yang et al. 2014)

Em relação ao gene *SERK*, diversos trabalhos relataram que sua expressão ocorre tanto na embriogênese somática quanto na embriogênese zigótica (Santos et al. 2005; Steiner et al. 2011; Matos 2013). A visualização do sinal de hibridização do gene *SERK* em embriões zigóticos está de acordo aos resultados observados para *P. edulis* (Silva et al. 2015), *Daucus carota* (Schmidt et al. 1997), *Theobroma cacao* (Santos et al. 2005), *Triticum aestivum* (Singla et al. 2008) e *Bixa orellana* (Matos 2013). Resultados contraditórios foram observados em *P. edulis* uma vez que, não houve expressão do *PeSERK* em embriões zigóticos tidos como explantes iniciais (Paim- Pinto 2009).

Neste trabalho, a presença dos transcritos do gene *SERK* foi intensificada ao longo do desenvolvimento dos embriões somáticos, sendo marcadamente observada em embriões globulares. Hecht et al. (2001) verificaram em *Arabidopsis* que há expressão do *AtSERK* até a formação do embrião cordiforme e cessa com o desenvolvimento do

embrião . Em *P. ligularis* Juss. constatou-se a expressão do *SERK* em explantes com 5 e 15 dias, e o sinal foi reduzido aos 35 dias de cultivo em meio de indução (Florido 2013). Esses dados contradizem o que foi verificado por (Paim-Pinto 2009) em *P. edulis* no qual, a expressão de *PeSERK* se deu apenas em células com competência embriogênica, tendo cessado o sinal em embriões globulares.

Matos (2013) relatou que em urucum (*Bixa orellana*) a expressão do *BoSERK* diminui dos embriões mais jovens até os estádios mais avançados. Contrariamente, o *CiSERK1* apresentou um nível moderado de expressão no estágio cordiforme-torpedo e cotiledonar e baixa expressão em embriões globulares de laranja ‘Valência’ (Ge et al. 2010). O fato de ocorrer um aumento na regulação do gene *SERK* nas fases iniciais e o decréscimo no decorrer do desenvolvimento dos embriões somáticos podem estar relacionados com a associação do *SERK* à competência embriogênica das células somáticas. Isso reflete a multifuncionalidade desse gene em diferentes espécies, estando associado não apenas com a embriogênese somática, mas também em outros eventos do desenvolvimento vegetal (Albrecht et al. 2005; Nolan et al. 2009).

O presente trabalho apresenta dados inéditos acerca do isolamento e estudos de expressão de genes intimamente associados à programação da embriogênese somática e mecanismos de sinalização, via brassinoesteroides, que controlam a resistência à patógenos em plantas, os quais poderão servir de base para ampliação de estudos dessa natureza para outras espécies do gênero.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B ( 2004 ) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119:109-120
- Albrecht C, Russinova E, Hecht V, Baaijens E, de Vries SC (2005) The *Arabidopsis thaliana* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1* and 2 control male sporogenesis. *Plant Cell* 17:3337–3349
- Albrecht C, Russinova E, Kemmerling B, Kwaaitaal K, de Vries SC (2008) Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE Proteins Serve Brassinosteroid-Dependent and -Independent Signaling Pathways. *Plant Physiology* 148: 611–619
- 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
- Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, Hecht VFG, Dresselhaus T, Lorz H, Dumas C, Rogowsky PM (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. *Planta* 213:1-10
- Becraft PW (1998) Receptor kinases in plant development. *Trends in plant science* 3: 384 - 388
- Becraft PW (2002) Receptor Kinase Signaling in plant development. *Annual Reviews Cellular Developmental Biology* 18:163-192
- Bojar D, Martinez J, Santiago J, Rybin V, Bayliss R, Hothorn M (2014) Crystal structures of the phosphorylated BRI1 kinase domain and implications for brassinosteroid signal initiation. *The Plant journal : for Cell and Molecular Biology* 78:31- 43
- Boutillier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C, van Lammeren AAM, Miki BLA, Custers JBM, Campagne MML (2002) Ectopic

- expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell* 14:1737-1749
- Dias LLC, Santa-Catarina C, Ribeiro DM, Barros RS, Floh ELS, Otoni WC (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
- Du J, Yin H, Zhang S, Wei Z, Zhao B, Zhang J, Gou X, Lin H, Li J (2012) Somatic embryogenesis receptor kinases control root development mainly via brassinosteroid-independent actions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 54:388-399
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797
- El Ouakfaoui S, Schnell J, Abdeen A, Colville A, Labbe H, Han S, Baum B, Laberge S, Miki B (2010) Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Molecular Biology* 74:313-326
- Elhiti M, Stasolla C, Wang A (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 49:631-642
- Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, Oakes MP, Tucker WQJ, Gerentes D, Perez P, Smytha DR (1996) *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *The Plant Cell* 8:155-168
- Féher A, Pasternack TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:201-228
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Florido LYD (2013) Embriogênese somática, expressão do gene *SERK* em *Passiflora ligularis* Juss. e influência da irradiância no desenvolvimento e metabolismo secundário *in vitro* de *P. mollissima* Bailey H.B.K. Universidade Federal de Viçosa, MG, pp 1-77

- Gaj MD (2001) Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64:39 - 46
- Ge X-X, Fan G-E, Chai L-J, Guo W-W (2010) Cloning, molecular characterization and expression analysis of a SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE gene (*CitSERK1-like*) in *Valencia sweet orange*. Acta Physiologiae Plantarum 32:1197-1207
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schimit DI, Boutilier K, Grossnicklaus U, de Vries SC (2001) The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* gene is expressed in development ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. Plant Physiology and Biochemistry 127:803-816
- Horstman A, Willemsen V, Boutilier K, Heidstra R (2014) AINTEGUMENTA-LIKE proteins: hubs in a plethora of networks. Trends in Plant Science 19:146-157
- Hu H, Xiong L, Yang Y (2005) Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. Planta 222:107-117
- Huang X, Lu X, Zhao J, Chen J, Dai X, Xiao W, Chen Y, Chen Y, Huang X (2009) *MaSERK1* Gene Expression Associated with Somatic Embryogenic Competence and Disease Resistance Response in Banana (*Musa* spp.). Plant Molecular Biology Reporter 28:309-316
- Irikova T, Grozeva S, Denev I (2012) Identification of *BABY BOOM* and *LEAFY COTYLEDON* genes in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genome by their partial gene sequences. Plant Growth Regulation 67:191-198
- Ito Y, Takaya K, Kurata N (2005) Expression of *SERK* family receptor-like protein kinase genes in rice. Biochimica et Biophysica Acta 1730:253-258
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences 8: 275-282

- Karlova R, Boeren S, Russinova E, Aker J, Vervoort J, de Vries SC (2006) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 Protein Complex Includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *The Plant Cell* 18: 626 - 638
- Kedong X, Qinglin L, Huifang Y, Li Z, Lili D, Fengluan L, Ling B, Nan M, Liangjun Z (2011) Isolation and molecular characterization of *RcSERK1*: A *Rosa canina* gene transcriptionally induced during initiation of protocorm-like bodies. *African Journal of Biotechnology* 10:4011- 4017
- Komamine A, Murata N, Nomura K (2005) Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41:6-10
- Kulinska-Lukasec K, Tobojka M, Adamiok A, Kurczynska EU (2012) Expression of the *BBM* gene during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 56:389-394
- Kurczyńska EU, Potocka I, Dobrowolska I, Kulinska-Lukaszek K, Sala K, Wrobel J (2012) Cellular Markers for Somatic Embryogenesis. In: Sato K-i (ed) “Embryogenesis”. InTech, Rijeka, pp 307-332
- Kwaaitaal MA, de Vries SC (2007) The *SERK1* gene is expressed in procambium and immature vascular cells. *Journal Experimental Botany* 58:2887- 2896
- Lombardi SP, Passos IRS, Nogueira MCS, Appezzato-da-Glória B (2007) *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50:239 - 247
- Mantovani NC, Grando GF, Xavier A, Otoni wC (2013) *In vitro* shoot induction and multiplication from nodal segments of adult *Ginkgo biloba* plants. *Horticultura Brasileira* 31:184-189
- Matos EM (2013) Caracterização morfo-anatômica, histoquímica e expressão de genes *SERK* durante a embriogênese somática em *Bixa orellana* L. (Bixaceae). Universidade Federal de Viçosa, pp 1-87

- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90:1-8
- Nolan EK, Kurdyukov S, Ros RJ (2011) Characterisation of the legume *SERK-NIK* gene superfamily including splice variants: Implications for development and defence. *BMC Plant Biology* 11:1-16
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ (2003) Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* rootforming and embryogenic cultures. *Plant Physiology* 133:218–230
- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ (2009) Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 1 (SERK1)* gene is associated with development change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *Jornal of Experimental Botany* 60: 1759–1771
- Nole-Wilson S, Tranby TL, Krizek BA (2005) *AINTEGUMENTA-like (AIL)* genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states. *Plant Molecular Biology* 57: 613-628
- O' Brien TP, McCully ME (1981) *The study of plant structures principles and selected methods*. Thernmarcarphi Pty, Melbourne
- Otoni WC (1995) Hibridização e embriogênese somática e transformação genética em espécies de Passiflora. Universidade Federal de Viçosa (In Portuguese)
- Otoni WC, Casali VWD, Power JB, Davey MR (1996) Particle bombardment-mediated transient expression of GUS in passionfruit (*Passiflora giberti* N.E. Brown). *Revista Ceres* 43 (247): 329- 336
- Otoni WC, Paim-Pinto DL, Rocha DI, Vieira LM, Dias LLC, Silva ML, Silva CV, Lani ERG, Silva LCd, Tanaka FAO (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

- Paim- Pinto DL (2009) Embriogênese somática, expressão do gene *SERK* e otimização da transformação genética via SAAT mediante avaliação transiente do gene *GUS* em *Passiflora* spp. Universidade Federal de Viçosa
- Paim-Pinto DL, Barros BA, Viccini LF, Campos JMS, Silva ML, Otoni WC (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103:71-79
- Paim-Pinto DL, de Almeida AMR, Rêgo MM, da Silva ML, de Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107:521-530
- Parveen S, Shahzad A (2014) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *Cassia angustifolia* from immature cotyledon-derived callus. *Biologia Plantarum* 58:411-418
- Passarinho P, Ketelaar T, Xing M, van Arkel J, Maliepaard C, Hendriks MW, Joosen R, Lammers M, Herdies L, den Boer B, van der Geest L, Boutilier K (2008) *BABY BOOM* target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. *Plant Molecular Biology* 68:225-237
- Pereira DA (2010) Caracterização e expressão do gene *SERK* durante a indução de embriogênese somática em soja. Universidade Federal de Viçosa, pp 1-62
- Perez-Nuñez MT, Souza R, Saenz L, Chan JL, Zuniga-Aguilar JJ, Oropeza C (2009) Detection of a *SERK-like* gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Reports* 28:11-19
- Pinheiro MVM (2014) Potencial fotoautotrófico em *Etilingera elatior* 'Porcelana' e embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* 'Eidibel': caracterização anatômica e da expressão do gene *SERK*. Universidade Federal de Viçosa, pp 1-129

- Raghavan V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *American Journal of Botany* 91:1743-1756
- Reis LB, Silva ML, Lima ABP, Oliveira MLP, Paim-Pinto DL, Lani ERG, Otoni WC (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. *Acta Horticulturae* 738:425-431
- Rocha D, Dornelas MC (2013) Molecular overview on plant somatic embryogenesis. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 8: 1-17
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FA, da Silva LC, Otoni WC (2012) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249:747-758
- Rocha ID, Monte-Bello CC, Dornelas MC (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
- Rosa YBCJ, Bello CCM, Dornelas MC (2015) Species-dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 69- 72
- Russinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Cano-Delgado A, Yin Y, Chory J, de Vries SC (2004) Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and *AtSERK3* (*BAK1*). *Plant Cell* 16:3216-3229
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425
- Sakamoto T, Deguchi M, Brustolini OJB, Santos AA, Silva FF, Fontes EPB (2012) The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biology* 12:1-18

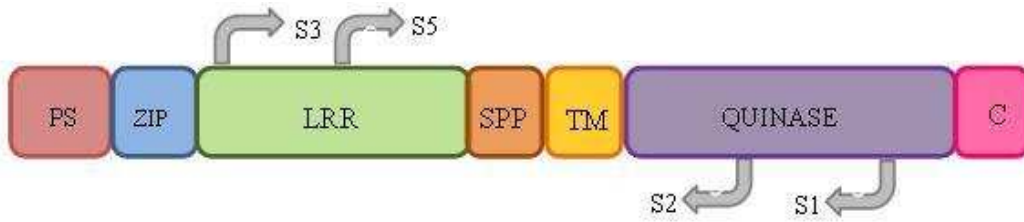
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning - a laboratory manual, 3 edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Santa-Catarina C, Olmedo AdS, Meyer GdA, Macedo J, de Amorim W, Viana AM (2004a) Repetitive somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez.(Lauraceae): effect of somatic embryo developmental stage and dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78:55–62
- Santos MO, Romano E, Yotoko KSC, Tinoco MLP, Dias BBA, Aragão FJL (2005) Characterisation of the cacao *somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Science* 168:723-729
- Savona M, Mattioli R, Nigro S, Falasca G, Della Rovere F, Costantino P, De Vries S, Ruffoni B, Trovato M, Altamura MM (2012) Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. *Journal of Experimental Botany* 63:471-488
- Schellenbaum P, Jacques A, Maillot P, Bertsch C, Mazet F, Farine S, Walter B (2008) Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3* and *VvLIL* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports* 27: 1799–1809
- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124: 2049-2062
- Sharma SK, Millam S, Hein I, Bryan GJ (2008) Cloning and molecular characterisation of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta* 228:319-330
- Shiu SH, Bleecker AB (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:10763–10768
- Silva AT, Barduche D, do Livramento KG, Paiva LV (2014) A putative *BABY BOOM-like* gene (*CaBBM*) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of *Coffea arabica* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* DOI 10.1007/s11627-014-9643-z

- Silva CV, Oliveira LS, Loriato VAP, Silva LCd, Campos JMS, Viccini LF, Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107:407- 416
- Silva GM, Cruz ACF, Otoni WC, Pereira TNS, Rocha DI, Silva ML (2015 ) Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant (In press)*
- Silva ML, Paim-Pinto DL, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009) A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99:47-54
- Singla B, Khurana JP, Khurana P (2008) Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports* 27:833–843
- Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. *Plant Cell Report* 19:718-726
- Song D, Li G, Song F, Zheng Z (2008) Molecular characterization and expression analysis of *OsBISERK1*, a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase, during disease resistance responses in rice. *Molecular Biology Reports* 35:275-283
- Srinivasan C, Liu S, Heidmann I, Supena EDJ, Fukuoka H, Joosen R, Lambalk J, Angenent G, Scorza R, Custers JB, Boutilier K (2007) Heterologous expression of the *BABY BOOM* AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta* 225:341–351
- Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra MP, Cutri L, Dornelas MC, Floh EIS (2011) A gymnosperm homolog of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1* (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109:41-50

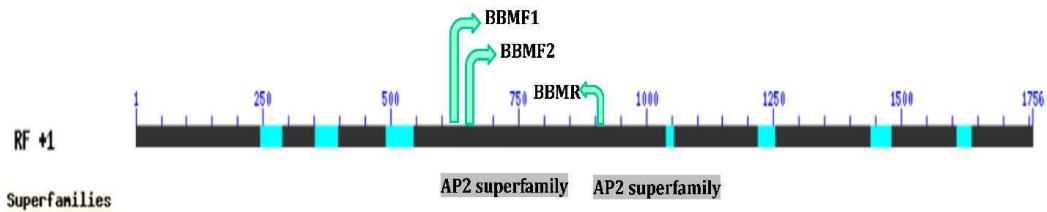
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer EL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. PNAS 98:11806–11811
- Talapatra S, Ghoshal N, Raychaudhuri SS (2013) Molecular characterization, modeling and expression analysis of a somatic embryogenesis receptor kinase (*SERK*) gene in *Momordica charantia* L. during somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 116:271-283
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739
- Vicentini R, Felix JdM, Dornelas MC, Menossi M (2009) Characterization of a sugarcane (*Saccharum* spp.) gene homolog to the brassinosteroid insensitive1-associated receptor kinase 1 that is associated to sugar content. Plant Cell Reports 28:481- 491
- von Arnold S (2008) Somatic Embryogenesis. In: Edwin FG, Hall MA, De Klerk G (eds) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 335-354
- Yang C, Zhao T, Yu D, Gai J (2010) Isolation and functional characterization of a *SERK* gene from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Plant Molecular Biology Reporter 29:334-344
- Yang HF, Kou YP, Gao B, Soliman TMA, Xu KD, Ma N, Cao X, Zhao LJ (2014) Identification and functional analysis of *BABY BOOM* genes from *Rosa canina*. Biologia Plantarum 58:427-435
- Yang X, Zhang X (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. Critical Reviews in Plant Sciences 29:36-57
- Zakizadeh H, Stummann BM, Lütken H, Müller R (2010) Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101:331-338

Zhang S, Liu X, Lin Y, Xie G, Fu F, Liu H, Wang J, Gao S, Lan H, Rong T (2011)  
Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic embryogenesis  
in a maize culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105:29-37

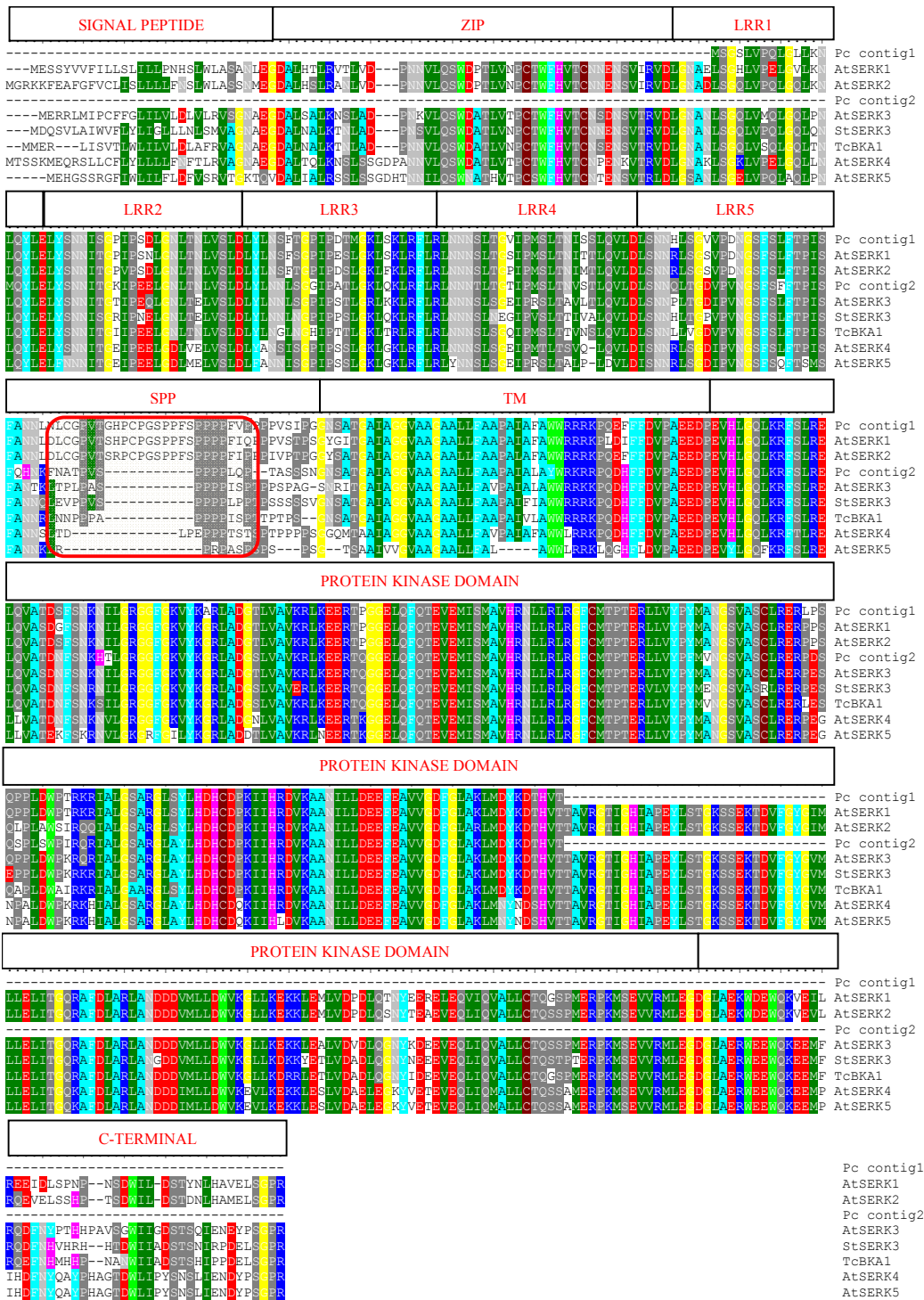
## 6. FIGURAS E LEGENDAS



**Figura 1.** Esquema geral da sequência de domínios estruturais característicos de proteínas SERK e localização dos iniciadores degenerados utilizados na amplificação da sequência codante em *P. cincinnata*. PS = Peptídeo sinal; ZIP = Zíper de leucina; LRR = Repetições ricas em leucina; SPP = Região rica em prolina; TM = domínio transmembrana; Quinase = domínio quinase da proteína; C = Região carboxi-terminal. (Modificado de Baudino et al. 2001).



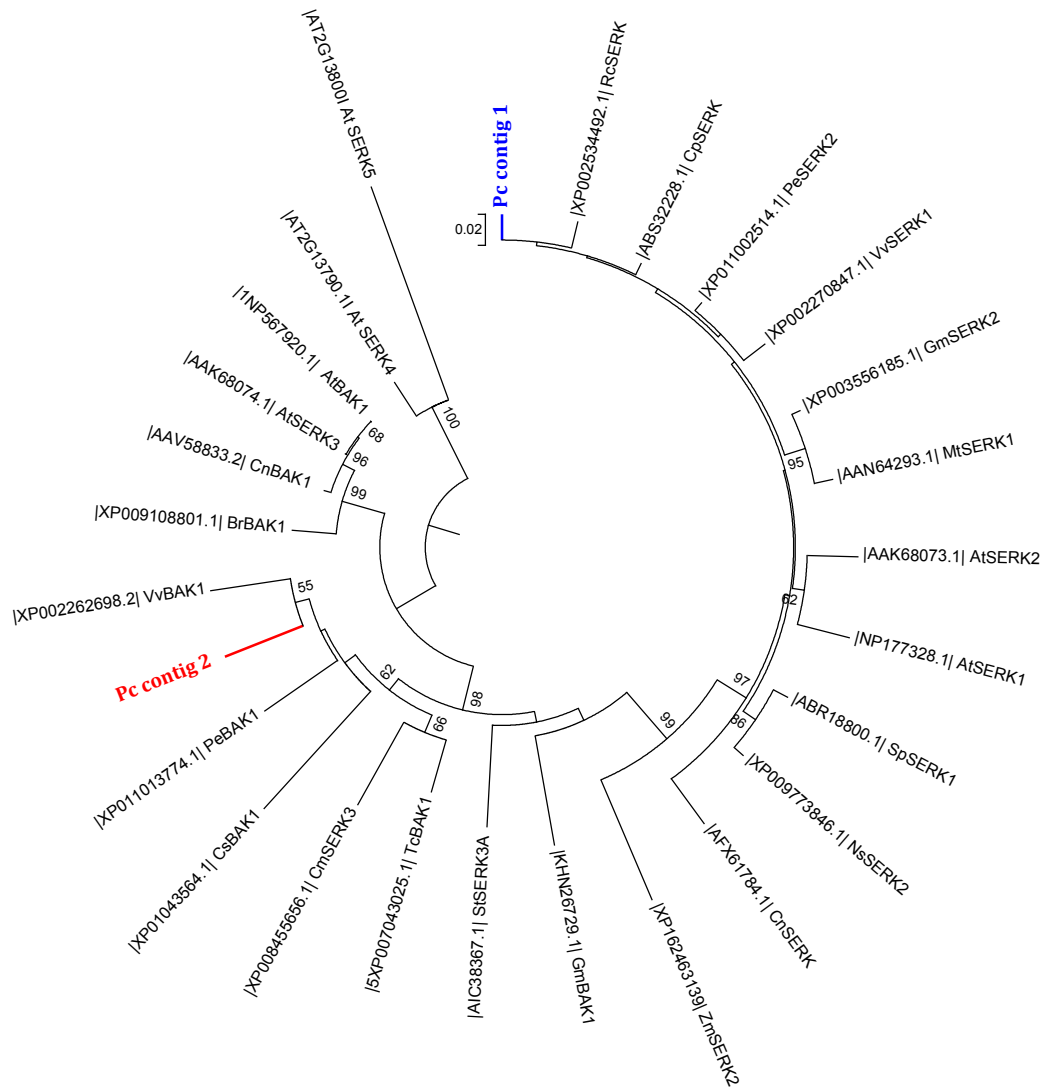
**Figura 2.** Localização da sequência de aminoácidos do gene *BABY BOOM* (*BBM*) em *Arabidopsis thaliana*, mostrando o domínio funcional característico dos fatores de transcrição AP2-like. BBMF1 e BBMF2 (primer forward), BBMR (primer reverse) (Adaptado do NCBI).



**Figura 3.** Comparação da sequência de aminoácidos deduzidos dos Pc contigs1 e 2 de *Passiflora cincinnata* proveniente da combinação S1-S3 com homólogos de SERK disponíveis no banco de dados. Os domínios estruturais estão destacados em vermelho acima de cada sequência. Legenda: *Signal peptide*: peptídeo sinal; *ZIP*: zíper de leucina, *LRR1-5*: motivos repetitivos de leucina (*leucine rich repeats*); *SPP*: região rica em prolina; *TM*: domínio transmembrana; *Protein Kinase Domain*: domínio quinase; *C-*

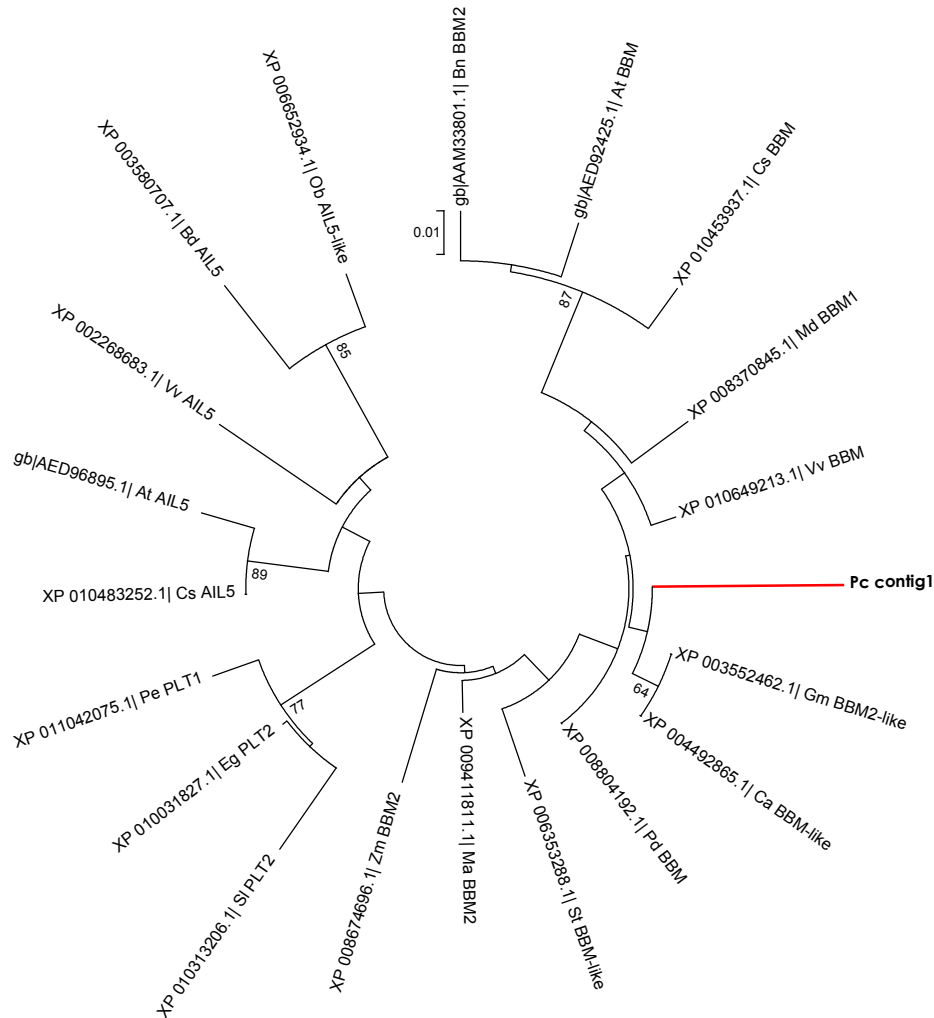
*terminal*: domínio carboxi-terminal. *Gaps* incluídos para otimizar o alinhamento são indicados por ‘-’). Quadro vermelho: destaca os *gaps* entre as sequências na região SPP.



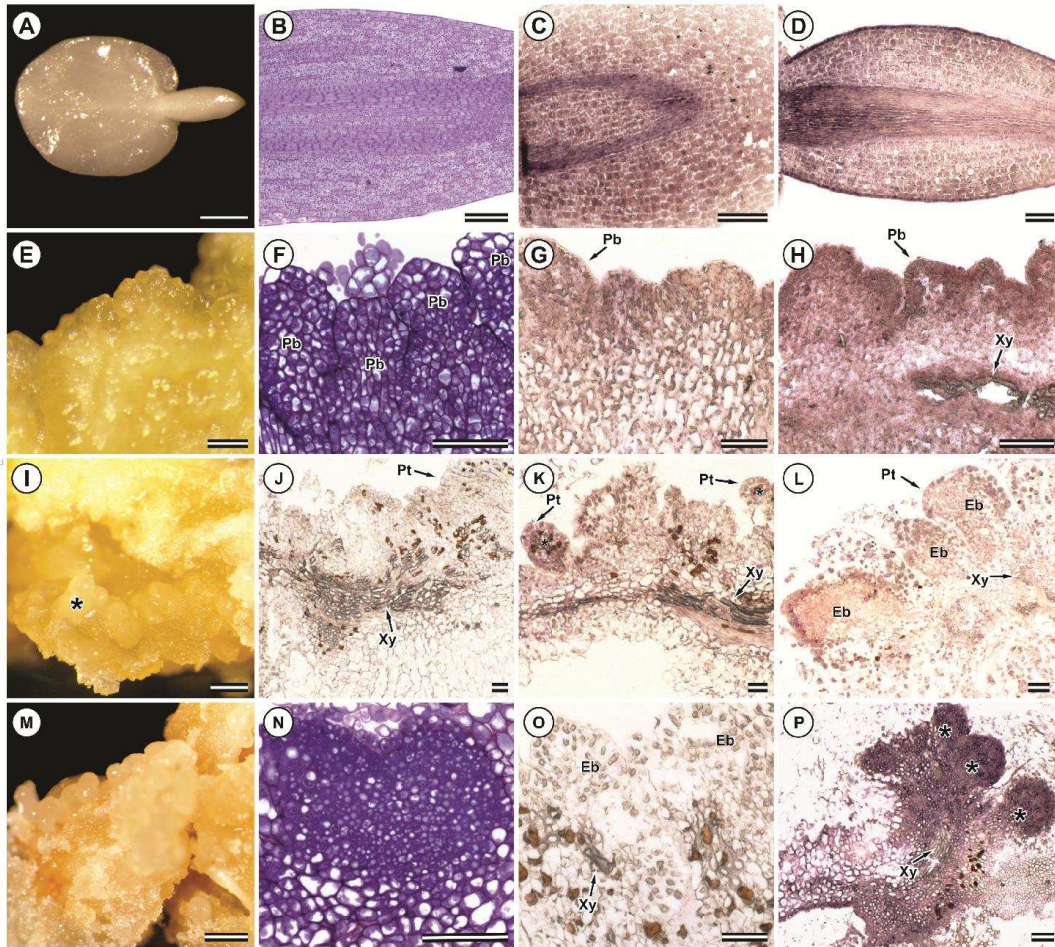


**Figura 5.** Relações filogenéticas demonstradas entre homólogos da proteína SERK com base nas sequências parciais de aminoácidos deduzidas. Os diferentes homólogos foram alinhados e gerada uma matriz de distância para construção do cladograma por *neighbor-joining*. Os números indicam valores de *Bootstrap*, em porcentagem (1000 repetições). São apresentados apenas os valores acima de 50 %. A barra indica 2 % de substituições não-sinônimas. Para *P. cinnata* foram gerados dois contigs, o qual Pc contig1 está destacado de azul e Pc contig2 representado de vermelho. As letras e números apresentados são o código de acesso no banco de dados do NCBI. Legenda: RcSERK (*Ricinus communis*), CpSERK (*Carica papaya*), PeSERK2 e PeBAK1 (*Populus euphratica*), VvSERK1 e VvBAK1 (*Vitis vinifera*), GmSERK2 e GmBAK1 (*Glycine max*), MtSERK1 (*Medicago truncatula*), AtSERK1, AtSERK2, AtSERK3, AtSERK4, AtSERK5 e AtBAK1 (*Arabidopsis thaliana*), SpSERK1 (*Solanum pennellii*), NsSERK2 (*Nicotiana glauca*), CnSERK e CnBAK1 (*Camellia nitidissima*), ZmSERK2 (*Zea mays*), StSERK3A (*Solanum tuberosum*), TcBAK1

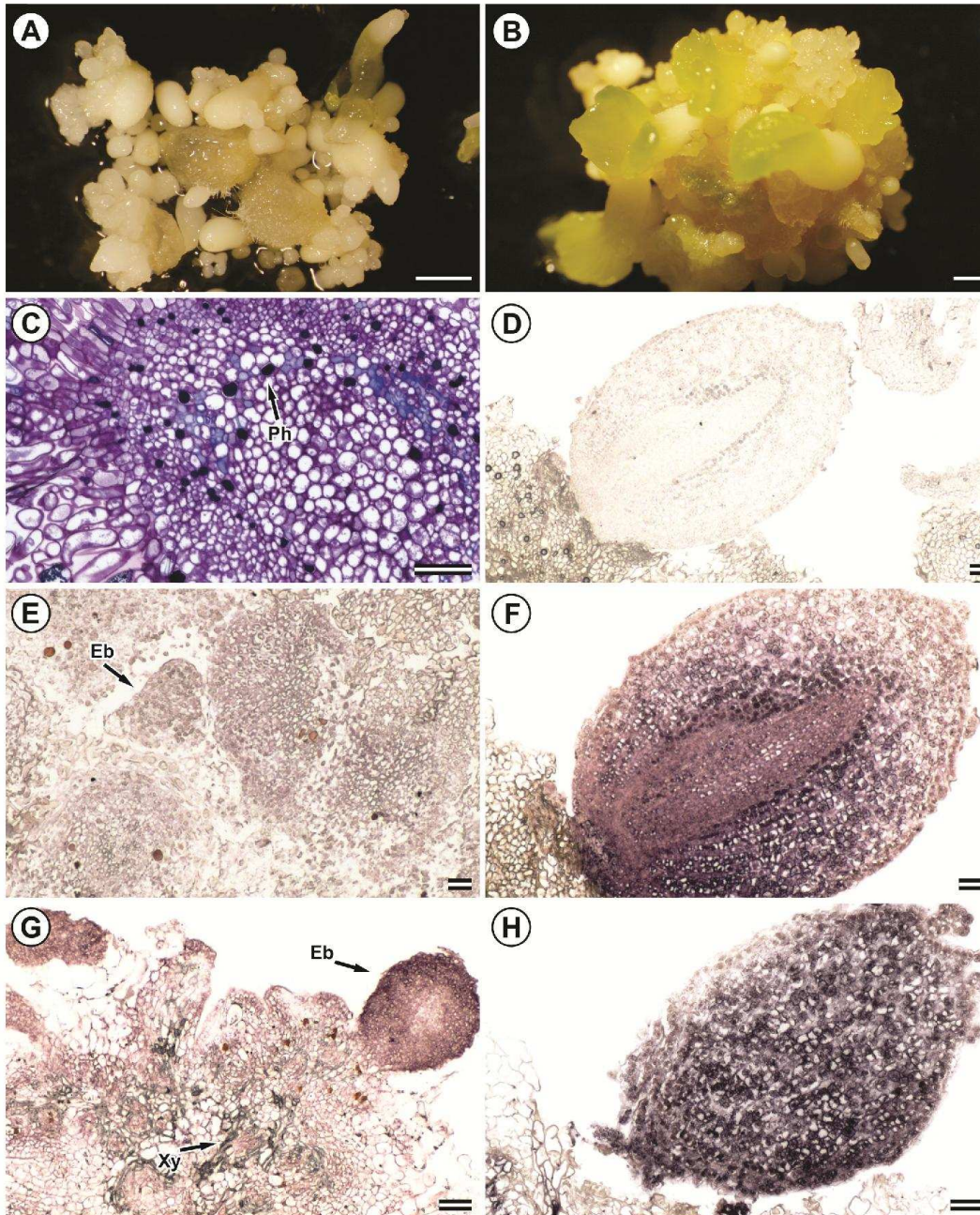
(*Theobroma cacao*), CmSERK3 (*Cucumis melo*), CBAK1 (*Citrus sinensis*), BrBAK1 (*Brassica rapa*).



**Figura 6.** Relações filogenéticas demonstradas entre homólogos da proteína BBM com base nas sequências parciais de aminoácidos deduzidas. Os diferentes homólogos foram alinhados e gerada uma matriz de distância para construção do cladograma por *neighbor-joining*. Os números indicam valores de *Bootstrap*, em porcentagem (1000 repetições). São apresentados apenas os valores acima de 50 %. O clone de *P. cincinnata* destaca-se em negrito com o ramo vermelho. As letras e números apresentados indicam o código de acesso no banco de dados do NCBI. Legenda: BnBBM2 (*Brassica napus*), AtBBM, AtAIL5 (*Arabidopsis thaliana*), CsBBM, CsAIL5 (*Camelia sativa*), MdBBM1 (*Malus domestica*), VvBBM e VvAIL5 (*Vitis vinifera*), GmBBM2-Like (*Glycine max*), CaBBM-Like (*Cicer arietinum*), PdBBM (*Phoenix dactylifera*), StBBM-Like (*Solanum tuberosum*), MaBBM2 (*Musa acuminata*), ZmBBM2 (*Zea mays*), SlPLT2 (*Solanum lycopersicum*), EgPLT2 (*Eucalyptus grandis*), PePLT1 (*Populus euphratica*), CsAIL5 (*Camelia sativa*), BdAIL5 (*Brachypodium distachyon*) e ObAIL5-Like (*Oryza branchyanta*).



**Figura 7.** Expressão dos genes *BBM* e *SERK* em meio de indução (MI) de embriogênese somática em *Passiflora cincinnata* Mast. **(A e B)** Embrião zigótico utilizado como explante inicial e **(C)** expressão dos genes *BBM* e **(D)** *SERK* indicados pela coloração rosácea (0 dia no MI). Aos 10 dias no MI, **(E e F)** alterações morfológicas na superfície dos cotilédones e **(G)** presença de transcritos dos genes *BBM* e **(H)** *SERK* em protuberâncias formadas. **(I)** Embriões somáticos no estágio de torpedão aos 20 dias no MI. **(J)** Ausência da expressão do gene *BBM* em embriões submetidos à sonda *sense* (T7) aos 20 dias no MI. **(K)** Expressão dos genes *BBM* e **(L)** *SERK* em embriões somáticos com 20 dias no MI. **(M)** Embriões somáticos em diversos estádios de desenvolvimento. **(N)** Aos 30 dias no MI o agrupamento celular característico de zonas pró-embriogênicas, **(O)** ausência da expressão dos genes *BBM* e **(P)** expressão do *SERK* indicado pela forte coloração roxa. Legenda: **(Eb, \*)** Embrião, **(Pb)** Protuberâncias, **(Pt)** Protoderme, **(Xy)** Xilema. Fotos de lupa (A, E, I e M). Microscopia de luz (B, F e N). Barras: **500 µm** (A, E, I, M), **100 µm** (B-D, F-H, J-L, N-P).



**Figura 8.** Expressão dos genes *BBM* e *SERK* em meio de maturação (MM) de embriões somáticos em *Passiflora cincinnata* Mast. Embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento, (A) demonstrando assincronismo durante sua formação aos 5 dias e (B) 40 dias em MM. (C) Aparecimento de um cordão de fenólicos sendo este um indicativo da formação de embriões somáticos. (E) Expressão dos genes *BBM* e (G) *SERK* em embriões somáticos aos 5 dias no MM. Aos 40 dias no MM, (D) ausência de expressão do gene *BBM* em embriões submetidos à sonda *sense* (T7) e a (F) expressão dos genes *BBM* e *SERK* (H) indicados pela evidente coloração roxo-escuro presente nos embriões. Legenda: Embrião (Eb \*), Composto fenólico (Ph). Barras: 500 μm (A-B), 100 μm (C-H).

## 7. TABELAS

**Tabela 1.** Iniciadores degenerados utilizados para amplificação de *SERK* e de *BBM* em cDNA de *Passiflora cincinnata* Mast. e a localização na proteína.

Iniciadores	Sequência	Domínio estrutural
<b>SERK</b>		
<b>S1R</b>	5'TGTHACRTGGGTRTCCTTGTARTCCAT3'	Domínio quinase (exon VII)
<b>S2R</b>	5'CGRTGMACWGCCATRCTIATCAT3'	Domínio quinase (exon III)
<b>S3F</b>	5'GTGAAYCCTTGACATGGTTYCATGT3'	LRR
<b>S5F</b>	5'ATGCACTSAACYAATATYACWACYCTTCAAG3'	LRR
<b>BBM</b>		
<b>BBMF1</b>	5'ACAAGGCATMGRTGGACDG3'	AP2
<b>BBMF2</b>	5'TGTHACAAGGCATMGRTGGACDG3'	AP2
<b>BBMR</b>	5'ATGCACDCGWGARAAMCCAC3'	AP2

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.

**Tabela 2.** Comparação das sequências nucleotídicas dos contigs 1 e 2 de *SERK* (1224 pb e 1185 pb, respectivamente), obtidas a partir de cDNA amplificado com a combinação S1/S3, com sequências de outras espécies depositadas no banco de dados (NCBI).

Acesso	Descrição	Cobertura	E-value	Identidade máxima (%)
<b>CONTIG1</b>				
XM 011004212.1	<i>Populus euphratica</i> (SERK2)	99%	0,0	88
HQ621831.1	<i>Gossypium hirsutum</i> (SERK1)	99%	0,0	84
XM0035137.2	<i>Glycine max</i> (SERK2)	99%	0,0	83
XM002270811.2	<i>Vitis vinifera</i> (SERK)	99%	0,0	83
AY162176.1	<i>Medicago truncatula</i> (SERK1)	99%	0,0	82
<b>CONTIG2</b>				
XM 011015472.1	<i>Populus euphratica</i> (BAK1)	98%	0,0	84
XM002520315.1	<i>Ricinus communis</i> (BAK1)	98%	0,0	83
XM002262662.1	<i>Vitis vinifera</i> (BAK1)	98%	0,0	83
XM003547551.2	<i>Glycine max</i> (BAK1)	97%	0,0	82
XM007042963.1	<i>Theobroma cacao</i> (BAK1)	99%	0,0	81

**Tabela 3.** Comparação da sequência nucleotídica do contig de *BBM*, obtida a partir do cDNA amplificado (308 bp), com sequências de outras espécies depositadas no banco de dados (NCBI).

Acesso	Descrição	Cobertura	E-value	Identidade de máxima (%)
XM010650911.1	<i>Vitis vinifera</i> (BBM)	93%	2e-90	86
XM008390600.1	<i>Malus domestica</i> (BBM1)	93%	1e-88	86
XM011008878.1	<i>Populus euphratica</i> (BBM2)	93%	7e-85	85
AF317904.1	<i>Brassica napus</i> (BBM1)	93%	7e-85	85
XM009612688.1	<i>N. tomentosiformes</i> (AIL-Like)	93%	1e-87	85

## CAPÍTULO II

---

### **CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA E EXPRESSÃO DOS GENES *BBM* E *SERK* POR HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* EM *Passiflora setacea* D.C. E *Passiflora cincinnata* MAST.**

**Resumo** - Apesar de muitos trabalhos de cultura de tecidos em Passifloráceas terem sido realizados pouco se tem relatado sobre os mecanismos que regulam as rotas morfogênicas *in vitro* em níveis celulares, moleculares e fisiológicos. Desse modo, objetivou-se comparar a responsividade morfogênica de *Passiflora setacea* e *P. cincinnata* submetidas a condições de indução de embriogênese somática, avaliar a mobilização de substâncias de reserva e o padrão de expressão dos genes *BBM* e *SERK* durante o processo embriogênico. Para tal, embriões zigóticos maduros foram inoculados em meio MIP adicionado ou não de 500mg L<sup>-1</sup> de Extrato de Malte e/ou 13,77 µM de Espermidina. Após 30 dias, as culturas foram transferidas ao meio de maturação composto de meio MS acrescido de 1,0% de carvão ativado, na ausência de reguladores de crescimento. Amostras com 0, 10, 20 e 30 dias foram coletadas para microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, testes histoquímicos e hibridização *in situ*, todas seguindo protocolos específicos. Para detecção da expressão dos genes *SERK* e *BBM* foi gerada uma sonda de RNA marcada com digoxigenina a partir de um clone de *P. cincinnata*. Para *P. setacea* utilizou-se uma sonda heteróloga *sense* e *antisense* de *P. cincinnata*. Após 10 dias em meio de indução, em *P. setacea* observou-se a formação de protuberâncias a partir de células parenquimáticas dos cotilédones, e em *P. cincinnata* houve proliferação das células do meristema fundamental. Aos 20 dias de indução *P. setacea* apresentou proembriões com protoderme definida, já em *P. cincinnata* houve apenas a proliferação desordenada de células da epiderme e meristema fundamental conectado ao sistema vascular. Depois de 30 dias em cultura observou-se embriões globulares com protoderme definida e separação do explante por uma faixa distinta de células em *P. setacea*. Diferentemente, em *P. cincinnata* verificou-se presença de meristemoides, além de calejamento intenso e vascularização, caracterizando regiões organogênicas e, portanto, ausência de embriões somáticos. Quando transferidos ao meio de maturação não houve regeneração de plantas a partir de embriões somáticos em *P. setacea*. Em *P. cincinnata* houve intumescimento das regiões calejadas e, em alguns casos, formação de primórdios foliares. Quanto à

expressão gênica, em *P. setacea* foi constatada expressão de *BBM* e *SERK* em todas as fases analisadas, especialmente em protuberâncias e embriões somáticos formados. *P. cincinnata*, por sua vez, também apresentou transcritos dos genes *BBM* e *SERK* em todas as fases analisadas, sendo intensificado o sinal de hibridização aos 20 e 30 dias de indução na periferia dos explantes e regiões meristemáticas. A mobilização de substâncias de reservas se deu de maneira diferente entre as espécies. *P. setacea* apresentou corpos proteicos com decréscimo gradativo até os 30 dias em meio de indução. Houve presença de carboidratos e amido no explante e seu decréscimo após 10 dias, e verificou-se a síntese *de novo* de amido aos 30 dias de indução, quando há formação de embriões somáticos. Não foi verificada a presença de corpos lipídicos durante o processo embriogênico. Já na espécie *P. cincinnata*, constatou-se corpos proteicos e amido de forma moderada em todas as etapas de desenvolvimento e a presença de carboidratos totais e corpos lipídicos foi averiguada nas fases iniciais de indução. Após 20 dias, houve mobilização dessas substâncias de reserva concomitantemente com a formação e desenvolvimento de meristemoides. Nosso trabalho apresenta dados inéditos da indução de embriões somáticos em *P. setacea* e como as espécies estudadas apresentam respostas morfogênicas divergentes quando submetidas ao mesmo meio de indução. E ainda, relatamos a expressão dos genes *BBM* e *SERK* e a mobilização de compostos de reserva no decorrer dos eventos morfogênicos *in vitro* em *P. setacea* e *P. cincinnata*.

**Palavras-chave:** Passifloráceas, morfogênese *in vitro*, *BBM*, *SERK*, anatomia, histoquímica.

**Abstract** – Despite many works in Passifloraceae tissue culture have been made so far, there are few reports about the mechanisms that regulate *in vitro* morphogenetic routes at cellular, molecular and physiological levels. Thereby, this work aimed to compare the morphogenic response of *Passiflora setacea* and *P. cincinnata* somatic embryogenesis induced, evaluate the expression pattern of the genes *BBM* and *SERK* and the reserve mobilization during embryogenesis. For this, mature zygotic embryos were inoculated in MIP medium (supplemented with MS salts, 31.06  $\mu\text{M}$  of picloram, 2.22  $\mu\text{M}$  of benzyladenine and 2.27  $\mu\text{M}$  of thidiazuron) with or without 500  $\text{mg L}^{-1}$  of malt extract and/or 13.77  $\text{mM}$  of spermidine. After 30 days, the cultures were transferred to the maturation medium, composed of MS medium supplemented with 1 % of activated charcoal without growth regulators. Samples with 0, 10, 20 and 30 days were collected for light microscopy, scanning electron microscopy, histochemical analyzes and *in situ* hybridization, following specific protocols. A digoxigenin-labeled RNA probe from *P. cincinnata* cDNA was generated to figure out the expression of *SERK* and *BBM* genes. The hybridization signal was obtained using a commercial solution of NBT/BCIP as substrate for alkaline phosphatase. To *P. setacea* a heterologous sense and antisense probe of *P. cincinnata* was used. After 10 days in the induction medium, in *P. setacea* it was observed the formation of lumps from cotyledon parenchyma cells and in *P. cincinnata* a proliferation of the ground meristem cells. After 20 days of induction *P. setacea* showed proembryos with defined protodermis, as in *P. cincinnata* it was just a chaotic proliferation of cells of the epidermis and ground meristem connected to the vascular system. After 30 days in culture, globular embryos were observed with defined protodermis and separation of the explant by a distinct cell layer in *P. setacea*. In contrast, in *P. cincinnata* the presence of meristemoids was verified with intense callus formation and vascularization, characterizing organogenic regions and, therefore, the absence of somatic embryos. When transferred to maturation medium there was no plant regeneration from somatic embryos. In *P. cincinnata*, swelling of callus regions and, in some cases, formation of leaf primordia was observed. Regarding the gene expression, in *P. setacea* there was *BBM* and *SERK* expression in all stages, especially in lumps and somatic embryos. Also *P. cincinnata* showed transcripts of *BBM* and *SERK* genes in all stages, with intensification of the hybridization signal at the explants edges and meristematic regions between 20 and 30 days of induction. The mobilization of reserve substances was different between the species. Protein bodies were found in *P. setacea*, decreasing gradually until 30 days in the induction medium. Carbohydrate and starch

levels decreased after 10 days, but there was *de novo* synthesis of starch at 30 days of induction, coupled with the somatic embryos formation. No lipid bodies during the embryogenic process were verified. In *P. cincinnata* protein bodies and starch were moderately present in all development stages whereas carbohydrates and lipid bodies were present only at the early stages of induction. After 20 days, these reserve substances were mobilized, along with the meristemoids formation and development. This work brings a new approach for somatic embryogenesis induction in *P. setacea* and highlights how these two species show different responses when submitted to the induction medium. In addition, the expression of the genes *BBM* and *SERK* as well as the mobilization of reserve compounds during *in vitro* morphogenic events in *P. setacea* and *P. cincinnata* were related.

**Keywords:** Passifloraceae, morphogenesis *in vitro*, *BBM*, *SERK*, anatomy, histochemistry.

## 1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista a relevante plasticidade no desenvolvimento de plantas, tem sido cada vez mais frequente a busca da compreensão dos processos morfogênicos *in vitro*, organogênese e embriogênese somática (ES), e dos eventos que envolvem a aquisição de competência celular em níveis moleculares e fisiológicos. Os fatores que determinam as células a seguir uma rota morfogênica específica ainda são pouco elucidados (Gordon et al. 2007; Huang et al. 2009). Todavia, pesquisas tem relatado que a determinação do destino celular pode ser em função das condições proporcionadas no ambiente *in vitro* (Dodsworth 2009), o balanço hormonal, especialmente a razão auxina: citocinina (Pathi et al. 2013; Rocha et al. 2015), fatores de estresse, metilação do DNA (Nic-Can et al. 2013; Rocha e Dornelas 2013; Smertenko e Bozhkov 2014), fatores de transcrição respondentes a sinais hormonais específicos (Žur et al. 2013; Xu e Huang 2014) ou ainda a relação espécie-dependência ou genótipo-dependência (Dutra et al. 2013; Rosa et al. 2015).

A variabilidade nas respostas morfogênicas *in vitro* tem sido observada entre espécies de um mesmo gênero e até mesmo entre genótipos, exigindo cada vez mais a definição de protocolos diferenciados (von Arnold et al. 2002). Rosa et al. (2015) observaram que espécies de *Passiflora* responderam de maneira divergente quando submetidas a uma mesma condição de cultivo *in vitro*, sugerindo que o genótipo pode limitar a manutenção dos sinais morfogenéticos. Além do genótipo, o tipo, a condição fisiológica do explante e a composição do meio de cultura são fatores determinantes para o sucesso do cultivo e regeneração *in vitro* (Pavlovic et al. 2012; Vieira et al. 2014).

A auxina é um regulador de crescimento que estimula a aquisição de competência pelas células e modula processos de divisão, alongamento e diferenciação celular, atuando na especificação das células durante a embriogênese zigótica e ES (Pasternak et al. 2002; Woodward e Bartel 2005; Féher 2014). A concentração de auxina acrescida ao meio de cultivo é crucial para indução da ES para muitas espécies de plantas (Féher et al. 2003; Otoni et al. 2013). De acordo Rocha et al. (2015) a manipulação do ambiente *in vitro*, particularmente a proporção de auxina e citocinina no meio, podem determinar a rota morfogênica: organogênica ou embriogênica e podem ser induzidas de forma alternativa.

Comumente, os protocolos estabelecidos para indução de ES em espécies em *Passiflora* baseiam-se na adição de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6-benziladenina (BA) ao meio de cultivo (Silva et al. 2009; Paim-Pinto et al. 2011; Rosa et al. 2015). Recentemente, como alternativa, outras auxinas têm sido utilizadas, isoladas ou associadas à citocininas, para indução da organogênese e ES. O meio de indução composto por Picloram, Thidiazuron (TDZ) e BA foi eficaz na indução de fases iniciais da ES em *P. edulis* (Silva et al. 2015). Além disso, o acréscimo de componentes ao meio de cultivo, como as poliaminas (Silveira et al. 2006; Santa-Catarina et al. 2007) e extrato de malte (Chagas 2014) podem auxiliar no desenvolvimento e maturação de embriões somáticos. Meios de cultivo com fontes alternativas de reguladores de crescimento, poliaminas e açúcares, podem ser opções interessantes para promoção da programação embriogênica em espécies onde a ES ainda não foi observada.

A caracterização das mudanças celulares que ocorrem durante a ES é essencial para o entendimento dos fatores que envolvem a transição de células somáticas para células embriogênicas (Rocha et al. 2012). Assim, um fator relevante para elucidar a

compreensão da competência em células e tecidos é o monitoramento histoquímico, o qual permite acompanhar a dinâmica de mobilização de compostos de reserva e a distinção de competência embriogênica ou organogênica (Cangahuala-Inocente et al. 2004; Cangahuala-Inocente et al. 2009; Paim-Pinto et al. 2010; Rocha et al. 2012). Em *P. cincinnata* o processo de mobilização de reservas no decorrer do desenvolvimento embriogênico foi descrito por Rocha et al. (2012). Os autores evidenciaram que nos estádios iniciais da ES, as células da epiderme e mesofilo mostraram grãos de amido, lipídios e corpos proteicos que o explante inicial. Diferentemente, em *P. edulis*, Silva et al. (2015) constataram a presença de corpos lipídicos somente após 20 dias de indução, e grãos de amido e corpos proteicos foram metabolizados durante o decorrer do desenvolvimento dos embriões somáticos.

Mudanças no padrão de divisão e diferenciação celular durante a embriogênese somática incluem profunda reprogramação da expressão gênica. Assim, estudos dos aspectos morfofisiológicos e moleculares envolvendo a diferenciação das células das plantas e o desenvolvimento tornam-se interessantes (Rocha e Dornelas 2013). Redes complexas de genes estão envolvidas nesse processo, dentre eles encontram-se membros das famílias *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* e *BABY BOOM (BBM)*, envolvidos na aquisição de competência embriogênica (Sucharitakul et al. 2014 ) e desenvolvimento de embriões somáticos, sendo também expressos durante a organogênese (Ge et al. 2010; Zakizadeh et al. 2010).

Em *Daucus carota* o gene *DcSERK* tornou-se conhecido por ser um marcador de células embriogênicas em cultura (Schmidt et al. 1997) e a superexpressão de *AtSERK1* em *Arabidopsis* resultou no aumento da formação de células embriogênicas em resposta ao 2,4-D (Hecht et al. 2001). Baudino et al. (2001) verificaram que a expressão dos genes *ZmSERK1* e *ZmSERK2* de milho (*Zea mays*), não se encontra

restrita a calos embriogênicos e foram também expressos em calos não embriogênicos. Aparentemente, a sinalização mediada por *SERK* mantém o potencial embriogênico nas células, mas também participa de eventos organogênicos (Cueva et al. 2012).

O gene *BBM* pertence à superfamília de fatores de transcrição *AP2/ERF* (Shi et al. 2014) e é expresso, preferencialmente, durante o desenvolvimento de embriões e sementes. Segundo Passarinho et al. (2008), *BBM* tem sido identificado com atividades envolvendo modificações na parede celular associada com divisão e crescimento celular, sugerindo que este gene ativa redes complexas de rotas de desenvolvimento aliadas à proliferação celular. Análises da superexpressão de *BBM* em *Arabidopsis* e tabaco mostraram que este gene promoveu a ES na ausência de reguladores de crescimento e induziu brotos organogênicos, respectivamente, sugerindo que a especificação da rota morfogênica depende de características genéticas e celulares (Boutillier et al. 2002; Srinivasan et al. 2007).

O gênero *Passiflora* compreende cerca de 150 espécies nativas do Brasil e o maior pólo de dispersão localiza-se na região centro-norte (Souza e Meletti 1997; Paim-Pinto et al. 2010). *Passiflora cincinnata* Mast., conhecida popularmente como ‘maracujá-do-mato’ (Oliveira e Ruggiero 2005) é uma espécie comestível e apresenta propriedades medicinais (Agra et al. 1996), além de constituir um genótipo interessante para programas de reprodução (Lombardi et al. 2007). Na cultura de tecidos, esta espécie tem-se destacado como planta modelo para estudos morfogênicos, demonstrando elevada frequência de organogênese adventícia e embriogênese somática (Otoni et al. 2013). A espécie silvestre *Passiflora setacea* D.C., conhecida como ‘maracujá-sururuca’, possui frutos saborosos muito utilizados para a fabricação de doces (Oliveira e Ruggiero 2005). Essa espécie constitui excelente fonte de resistência genética a fitopatógenos que acometem a passicultura (Passos e Bernacci 2005). Em

razão da desuniformidade e dificuldade de germinação de *P. setacea*, as técnicas de cultura de tecidos (Santos et al. 2011), bem como sua utilização em programas de melhoramento genético (Faleiro et al. 2008), são alternativas para a sua propagação. Recentemente, a utilização de explantes hipocolotiledonares cultivados na presença de BA e TDZ foram descritos para regeneração dessa espécie *in vitro* via organogênese (Vieira et al. 2014).

Dado o exposto, tendo em vista a importância das duas espécies supracitadas, objetivou-se nesse estudo comparar a responsividade morfogênica de embriões zigóticos de *Passiflora setacea* e *Passiflora cincinnata* submetidos às condições de indução de embriogênese somática. E, ainda, avaliar o perfil de expressão dos genes *BBM* e *SERK* e a dinâmica de mobilização de compostos de reservas durante diferentes etapas de indução da embriogênese somática.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal e indução de embriogênese**

Foram utilizadas sementes de frutos maduros de *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae) provenientes de populações naturais no município de Janaúba, Minas Gerais, Brasil (15° 48' 09" S, 43° 18' 32" 113 W). As sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. foram obtidas a partir de frutos colhidos no pomar de polinização aberta do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Com uma peneira e areia lavada as sementes retiradas dos frutos maduros foram lavadas em água corrente para retirada do arilo. Estas foram colocadas sobre papel absorvente e secas à sombra em temperatura ambiente cerca de três dias. O arilo restante foi retirado manualmente.

Com auxílio de uma mini-morsa foram retirados os tegumentos das sementes, seguido da desinfestação em capela de fluxo laminar, utilizando-se etanol 70% (v/v) por 1 minuto, seguido por imersão em hipoclorito de sódio comercial (2,5% v/v) com Tween-20 a 0,1% (v/v), durante 15 minutos. Logo após, realizou-se tríplex lavagem em água deionizada estéril, nas quais as sementes permaneceram imersas em água por uma noite, facilitando a extração dos embriões zigóticos.

Foi realizado um ensaio visando-se testar três meios de indução (MI) de embriogênese somática nessas espécies. O MI constituiu-se dos sais básicos MS (Murashige e Skoog 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al. 1968), 0,01% (p/v) de mio-inositol, 3% (p/v) de sacarose, e 0,25% (p/v) de Phytigel<sup>®</sup> (Sigma Chemical Company, USA) como agente geleificante e acrescido de: **1)** MIP (31,06  $\mu\text{M}$  de Picloram + 2,22  $\mu\text{M}$  de BA [6-Benziladenina] + 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ [Thidiazuron]); **2)** MIP + 500  $\text{mg L}^{-1}$  Extrato de Malte (EM); **3)** MIP + 500  $\text{mg L}^{-1}$  EM + 13,77  $\mu\text{M}$  Espermidina (Spd). Análises estatísticas apontaram que o meio 3 foi superior para indução de regiões embriogênicas quando comparado aos demais (dados não mostrados). Dessa forma, no experimento visando à caracterização morfo-anatômica e à expressão dos genes *BBM* e *SERK*, utilizou-se esse meio para indução da embriogênese somática em *P. cincinnata* e *P. setacea*.

Inicialmente, na capela de fluxo laminar, embriões zigóticos foram removidos das sementes, com auxílio de pinça e bisturi, e inoculados no meio de indução acrescido de MIP + 500 $\text{mg L}^{-1}$  EM + 13,77  $\mu\text{M}$  Spm. Os meios tiveram o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e foram autoclavados à 121 °C e 1,1 atm de pressão por 20 min. As culturas foram estabelecidas em placas de Petri de poliestireno cristal 60 x 15 mm (J. Prolab, Brasil) contendo alíquotas de 15 mL de meio, vedadas com fita de rayon de viscose não-tecido com adesivo acrílico hipoalergênico (Nexcare MICROPORE<sup>®</sup> 3M do Brasil Ltda,

Brasil), e mantidas na ausência de luz à  $27 \pm 2$  °C, durante a fase de indução. As avaliações foram conduzidas após 30 dias de iniciação das culturas.

Após a fase de indução os calos obtidos no MI foram transferidos para o meio de maturação (MM), contendo sais de MS, vitaminas B5, 0,01% de mio-inositol, 0,25% de Phytigel<sup>®</sup>, 3% (p/v) de sacarose e 1,0% de carvão ativado. As culturas foram mantidas sob luz e avaliadas 40 dias após a transferência de meio. O experimento foi montado em triplicata para confirmação dos dados.

## **2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para a caracterização por MEV, amostras com 10, 20 e 30 dias em meio de indução foram fixadas por 8 horas em Karnovsky (1965), desidratadas em série etílica e secas em ponto crítico de CO<sub>2</sub> líquido no equipamento Balzers (Modelo CPD 020). Após serem fixadas em *stubs*, foram submetidas à deposição metálica com ouro, em equipamento Balzers de pulverização catódica (modelo SCA 010). As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO (modelo 1430VP), no Núcleo de Microscopia e de Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

## **2.3. Caracterização anatômica e histoquímica**

Foram realizadas análises histológicas e histoquímicas para avaliação da responsividade morfogênica de embriões zigóticos de *P. setacea* e *P. cincinnata*. As coletas foram realizadas com 0, 10, 20 e 30 dias após a indução e fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky 1965) por 24 horas. Logo após foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica). Utilizando-se micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica) foram obtidos cortes seriados transversais

com 5 µm de espessura. A coloração foi feita com azul de toluidina com pH 4,4, por 10 minutos e as lâminas montadas em resina sintética Permount.

Análises histoquímicas foram executadas para evidenciar as mudanças celulares, bem como, caracterizar a mobilização de reservas que ocorre durante os processos morfogênicos. Realizou-se testes para presença de corpos proteicos (XP), detecção de carboidratos (PAS), presença de amido (Lugol) e detecção de lipídeos (Sudan Black B), segundo metodologia utilizada por Rocha et al. (2012). As observações e registros fotográficos foram realizados em microscópio estereoscópio Olympus SZH e microscópio Olympus AX70, com sistema U-Photo.

#### **2.4. Hibridização *in situ***

Para análises de hibridização *in situ*, amostras de *P. setacea* e *P. cincinnata* foram coletadas com 0, 10, 20 e 30 dias em MI, sob condições livre de RNAses, e fixadas em paraformaldeído 4% durante 16 horas. Para visualização dos transcritos dos genes *BBM* e *SERK* nos tecidos de *P. setacea* utilizaram-se sondas heteróloga *sense* e *antisense* de *P. cincinnata* e seguiu-se o mesmo protocolo de hibridização *in situ* descrito anteriormente nesse trabalho (vide Capítulo 1).

### **3. RESULTADOS**

Após 30 dias em meio de indução, resultados preliminares, apontaram que para ambas as espécies trabalhadas, o meio 3 (MIP+ EM+ Spd) foi mais eficiente na formação de setores embriogênicos em *P. setacea* e calos em *P. cincinnata*, embora essa espécie não tenha apresentado embriões somáticos. Verificou-se a formação de massas de calos intumescidos por toda superfície do embrião zigótico de *P. cincinnata*

(Figura 1A). Todavia, para *P. setacea* observou-se a presença de embriões somáticos no estágio globular na face abaxial do cotilédone do embrião zigótico que não se encontra em contato com o meio (Figura 1B). Confirmou-se a presença de embriões somáticos por análises de microscopias eletrônica de varredura (Figura 1C) e de luz (Figura 1D), evidenciando protoderme diferenciada, ausência de conexão com o explante e sistema vascular fechado.

### 3.1. Análise estrutural

Embriões zigóticos de *P. setacea* e *P. cincinnata* condicionados ao meio MIP+EM+ Spd foram avaliados no decorrer do processo de indução de embriogênese somática. No explante inicial (0 dia no meio de indução), as análises de microscopia de luz não indicaram quaisquer alterações na lâmina cotiledonar do embrião zigótico de *P. setacea* (Figura 2A) e de *P. cincinnata* (Figura 2B). Após 10 dias em MI verificaram-se intensas modificações na estrutura do cotilédone do embrião zigótico de *P. setacea*. Observaram-se divisões anticlinais e periclinais nas células da epiderme, as quais resultaram na formação de protuberâncias nas camadas periféricas dos cotilédones (Figura 2C). As características meristemáticas observadas nas células da epiderme também foram evidenciadas no parênquima que se dividiu em diversos planos e contribuiu ativamente para formação das protuberâncias (Figura 2C). Já na espécie *P. cincinnata* constataram-se divisões celulares desordenadas, especialmente a partir das células da epiderme e parênquima, caracterizando a formação de calos não embriogênicos por toda superfície do explante (Figura 2D). Em *P. setacea* aos 20 dias em MI, constatou-se que a contínua desdiferenciação das células periféricas das protuberâncias levou à formação de zonas pró-embriogênicas e, posteriormente, embriões somáticos (Figura 2E). Contrariamente, nesse mesmo período observou-se em *P. cincinnata* que em algumas regiões do explante

as zonas de proliferação celular formaram meristemoides, grupos celulares concêntricos isolados dos demais (Figura 2F). Aos 30 dias de cultivo, verificou-se que em *P. setacea* a desdiferenciação das zonas pró-embriogênicas em embriões somáticos se deu de maneira assincrônica. Os embriões somáticos presentes apresentam protoderme diferenciada, meristema fundamental e procâmbio nitidamente separados dos tecidos do explante por uma faixa contínua de células (Figura 2G). Já em *P. cincinnata* as regiões do explante que apresentaram meristemoides expandiram-se seguida de formação de zonas organogênicas (Figura 2H).

As culturas foram transferidas para o meio de maturação acrescido de carvão ativado e isento de reguladores de crescimento. Após 30 dias nessas condições, não houve a continuidade da histodiferenciação e conseguinte regeneração de plantas a partir dos embriões somáticos em *P. setacea*. Em *P. cincinnata* houve intumescimento das regiões calejadas e, em alguns casos, formação de primórdios foliares (dados não mostrados).

### **3.2. Caracterização histoquímica**

Análises histoquímicas foram realizadas no intuito de acompanhar o processo de mobilização de reservas durante o processo morfogênico. Em *P. setacea*, notou-se inicialmente a presença de corpos proteicos e seu decréscimo gradativo até os 30 dias em meio de indução (Tabela 1). A presença de carboidratos e amido foi marcante no início do processo e houve degradação após 10 dias de cultivo (Tabela 1). O amido foi observado em menor quantidade após 30 dias no meio de indução. Não foi observada a presença de corpos lipídicos durante o processo embriogênico (Tabela 1). Em *P. cincinnata*, por sua vez, verificou-se a presença de corpos proteicos e amido de forma moderada em todas as etapas de desenvolvimento pelos testes de Xilidyne Ponceau e

Lugol, respectivamente (Tabela 1). Para os testes de carboidratos totais e corpos lipídicos, por meio do teste com PAS e Sudan Black B, respectivamente, detectou-se a presença desses compostos de reservas nas fases iniciais de indução. Depois de 20 dias de indução observou-se a degradação desses compostos concomitantemente à formação e desenvolvimento dos meristemoides (Tabela 1).

### **3.3. Análise da expressão dos genes *BBM* e *SERK***

As espécies estudadas nesse trabalho demonstraram responsividade de forma diferente, seguindo rotas morfogênicas divergentes, quando expostas ao meio MIP+ EM+ Spd. Assim, averiguou-se a expressão dos genes *BBM* e *SERK* durante diferentes estádios de desenvolvimento no meio de cultivo e o quão é influente o meio utilizado e a espécie analisada.

Em *P. setacea* o embrião zigótico utilizado como explante inicial (Figura 3A), apresentou forte sinal de hibridização para os genes *BBM* (Figura 3B) e *SERK* (Figura 3C), destacando-se a intensificação do sinal na região do procâmbio. Aos 10 dias de cultivo, observou-se o início da formação de protuberâncias na periferia do explante (Figura 3D). A coloração marrom-escura indica forte expressão de *BBM* nas protuberâncias formadas (Figura 3E). Enquanto que a presença de transcritos de *SERK*, notada pelo sinal rosáceo, aparece de forma moderada nas protuberâncias (Figura 3F). Aos 20 dias em meio de indução, como esperado, não foi notada a expressão do gene *BBM* quando utilizado a sonda *sense* (Figura 3G). Nesse mesmo estádio de desenvolvimento, verificou-se intensa coloração roxo-escuro da periferia dos embriões somáticos formados até o interior do explante, indicando expressão do gene *BBM* (Figura 3H). A presença do gene *SERK* também foi verificada nesse estádio, embora de maneira menos expressiva (Figura 3I). Após 30 dias em meio de indução, verificou-se

calejamento e a presença de embriões somáticos dispostos pela superfície do explante (Figura 3J). A presença de transcritos dos genes *BBM* (Figuras 3K) e *SERK* (Figura 3L) foi notada por todo explante, exceto em regiões não meristemáticas.

O embrião zigótico utilizado como explante inicial em *P. cincinnata* (Figura 4A), não apresentou sinal de hibridização quando submetido à sonda *sense* (Figura 4B). Entretanto, quando utilizada a sonda *antisense*, verificou-se a expressão dos genes *BBM* (Figura 4C) e *SERK* (Figura 4D) por todo explante. Aos 10 dias em meio de indução houve intenso calejamento, recobrando a superfície do explante (Figuras 4E-G), e a presença de transcritos dos genes *BBM* (Figura 4H) e *SERK* (Figura 4I) detectada especialmente na face adaxial dos cotilédones. Aos 20 dias em MI constataram-se divisões celulares formando zonas de proliferação e estas dão origem a meristemoides, grupos de células distintas e isoladas das demais (Figura 4J). Ainda nesse estágio de desenvolvimento, não foi perceptível a expressão do gene *BBM* no controle negativo (Figura 4K). Por outro lado, constatou-se a expressão dos genes *BBM* (Figura 4L) e *SERK* (Figura 4M) pela intensa coloração marrom-escura desde a periferia dos meristemoides desenvolvidos até o interior dos explantes. Após 30 dias em meio de indução, os meristemoides diferenciaram-se em regiões organogênicas (Figuras 4N-O) e a expressão dos genes *BBM* (Figura 4P) e *SERK* (Figura 4Q) restringiu-se às células meristemáticas e à região vascular.

#### **4. DISCUSSÃO**

Diversos trabalhos tem demonstrado a capacidade morfogênica de espécies do gênero *Passiflora* em regenerar plantas a partir de vários tipos de explantes, via organogênese *in vitro* (Lombardi et al. 2007; Reis et al. 2007; Alexandre et al. 2008; Garcia et al. 2011; Silva et al. 2011; Vieira et al. 2014), embriogênese somática (ES)

(Silva et al. 2009; Paim-Pinto et al. 2011; Otoni et al. 2013; Rosa et al. 2015), entre outros. Os fatores que conduzem determinada espécie a seguir a rota organogênica ou embriogênica ainda são pouco compreendidos (Gordon et al. 2007; Xu e Huang 2014). Entretanto, alguns estudos tem relatado que este fato pode estar relacionado às condições *in vitro* (Dodsworth 2009), a razão auxina-citocinina (Rocha et al. 2015), aos fatores de transcrição que respondem a sinais hormonais para determinar o destino das células (Žur et al. 2013; Xu e Huang 2014), e ainda ser espécie-dependente ou genótipo-dependente (von Arnold 2008; Rosa et al. 2015).

Nossos estudos apontaram que *Passiflora cincinnata*, espécie modelo para estudos de ES, apresentou embriões somáticos na presença de 2,4-D e BA (Silva et al. 2009). Entretanto, essa espécie gerou brotos organogênicos quando submetida ao meio MIP + EM + Spd (Figura 5). De maneira divergente, *P. setacea* quando submetida ao meio padrão para indução de ES (2,4-D e BA) não gerou embriões somáticos; ao passo que, quando exposta ao meio MIP+ EM+ Spd, houve formação de embriões somáticos, apesar de não ter ocorrida a conversão em plântulas (Figura 5). Em concordância com os presentes dados, Rosa et al. (2015) observaram que as mesmas condições *in vitro* aplicadas a cinco espécies de Passifloráceas promoveram a indução de embriões somáticos em todas, exceto em *P. foetida*, que apresentou organogênese, sugerindo que a conservação dos sinais morfogenéticos podem ser limitados pelo genótipo e diferenças são apontadas pelas relações filogenéticas.

Aqui, o meio MIP+ EM+ Spd foi capaz de induzir embriões somáticos em *Passiflora setacea*, proporcionando resultados inéditos para essa espécie, mas não houve formação de setores embriogênicos em *P. cincinnata*. Rosa et al. (2015) relataram que a resposta morfogenética divergente espécie-específica observada para *P. foetida* indicou que as condições de cultura que induzem a ES em outras espécies de

*Passiflora* não foram suficientes para induzir este processo nesta espécie em particular. Por conseguinte, de acordo von Arnold et al. (2002) as rotas de sinalização hormonal que determinam a reprogramação da expressão gênica necessária para transição da célula para ES, podem ser altamente dependentes da espécie, se não dependente do genótipo como em algumas espécies.

Além do fato de espécies diferentes responderem de maneira distinta à mesma condição *in vitro*, especula-se também o quão influente é o meio de cultivo usado para determinar a formação de estruturas organogênicas ou embriogênicas. Rocha et al. (2015) descreveram que um simples sistema *in vitro* pode modular diferentes rotas morfogenéticas em uma população definida de células somáticas. E ainda, a manipulação das condições *in vitro*, como a razão auxina-citocinina, pode permitir ambas as rotas morfogênicas, organogênese e embriogênese, alternativa ou simultaneamente. Os principais reguladores de crescimento envolvidos na regulação celular é a auxina e a citocinina, e sua razão é crucial para especificação da identidade celular durante os estádios iniciais morfogênicos (Gaj 2001; Gaj 2004; Jimenez 2005).

É comum, em espécies do gênero *Passiflora*, a utilização de 2,4-D (Otoni et al. 1996) ou sua combinação com BA (Silva et al. 2009; Paim-Pinto et al. 2011; Rosa et al. 2015) para indução da ES. Alternativamente, foram testadas concentrações de Picloram associada à TDZ e BA em *P. edulis*, apresentando resultados efetivos na geração de embriões somáticos (Silva et al. 2015). Em *P. setacea* observamos a formação de embriões somáticos em meio contendo Picloram, TDZ e BA, acrescido de EM e Spd.

A indução da embriogênese somática tem sido efetiva na presença de Picloram em espécies como: *Agapanthus praecox* (Suzuki et al. 2002), *Eucalyptus grandis* (Titon et al. 2007), *Musa acuminata* (Divakaran e Nair 2011), *Prunus incisa* (Kaouther et al. 2011), *Fragaria ananassa* (Gerdakaneh e Zohori 2013) e *P. edulis* (Silva et al. 2015). E

a adição de TDZ ao meio de cultivo foi considerada essencial para promoção de divisões celulares e formação de protuberâncias que culminariam em embriões somáticos em *P. edulis* (Silva et al. 2015). Em contrapartida, em *Camellia nitidissima*, Lu et al. (2013) relataram que a atividade de TDZ e BA, isolados ou associados a auxinas, influenciaram fortemente na indução de calos embriogênicos que se diferenciaram em embriões somáticos, estruturas nodulares ou brotos organogênicos. Em nosso trabalho, a ação isolada ou associada desses reguladores de crescimento pode ter influenciado as espécies de maneira divergente, levando a formação de embriões somáticos em *P. setacea* e brotos organogênicos em *P. cincinnata*.

O extrato de malte (EM) é uma mistura complexa, fonte de nitrogênio orgânico composto por um conjunto de aminoácidos responsáveis por estimular o crescimento e desenvolvimento de muitas espécies *in vitro* (Guerra et al. 1998). Em mamoeiro “Golden THB”, Chagas (2014) observou que a presença de EM ao meio de cultivo proporcionou a maior formação de embriões somáticos normais. Vardi e Galun (1988) observaram que a adição de EM ao cultivo de *Citrus* levou à aceleração do desenvolvimento de embriões somáticos globulares com morfologia normal, e aumento no número de divisões. Além disso, os açúcares não apenas influenciam no crescimento e desenvolvimento vegetal, atuando como fonte de carbono e energia, como também exercem funções de reguladores importantes, como: moléculas sinalizadoras de diferentes mecanismos moleculares, controle da transcrição, tradução, estabilidade da proteína e atividade enzimática (Bolouri-Moghaddam et al. 2010). Pode-se inferir que em *P. setacea* e *P. cincinnata* o acréscimo de EM ao meio de cultivo tenha influenciado na divisão e diferenciação celular observada até os 30 dias no meio de indução. No entanto, o tempo de exposição das culturas a esse reagente deve ser melhor investigado para maior compreensão dos seus efeitos nas respostas morfogênicas dessas espécies.

Em relação às Poliaminas (PAs), diversos trabalhos tem mostrado que estas podem ser usadas como biomarcadores ou reguladores vegetais na competência morfogênica de plantas (Shoeb et al. 2001) e em diferentes estádios embriogênicos (Yadav e Rajam 1997; Silveira et al. 2006; Santa-Catarina et al. 2007; Dutra et al. 2013). As PAs se encontram presentes em todos os compartimentos da célula vegetal, indicando sua participação em inúmeros processos fundamentais na célula, que abrangem desde a transcrição e o processamento do RNA à ativação da proteína, além de mudanças na fluidez de membrana (Kuznetsov et al. 2006).

Nosso trabalho sugere que a presença de Spd no meio de cultivo pode ter influenciado de forma efetiva na formação de embriões somáticos na espécie *P. setacea*, não sendo observado o mesmo efeito em *P. cincinnata*. Feirer (1995) sugeriu que altos níveis de Spd nas culturas embriogênicas estão correlacionados com a sua competência embriogênica. A Spd pode ter ação protetora contra o estresse oxidativo diminuindo o escurecimento (Tang e Newton 2005), e quando associada à Putrescina (Put), a sua ação pode ser intensificada, já que não foi observada oxidação nos tratamentos (Debiasi et al. 2007). A adição de PAs exógenas aumentou a capacidade de maturação de massas pró-embriogênicas e promoveu maior formação de embriões somáticos em *Sacharum* sp. (Macedo 2010) e *Picea glehnii* (Nakagawa et al. 2011). Nesse estudo não foi constatada oxidação das células e tecidos em ambas as espécies estudadas, podendo ser um indício da ação antioxidante exercida pela poliamina acrescida ao meio de cultura.

Os compostos de reservas são essenciais para os eventos de morfogênese *in vitro*, especialmente, para a reorganização e diferenciação celular (Zienkiewicz et al. 2011). Nesse contexto, o monitoramento histoquímico tem sido utilizado para determinar fatores que envolvam a dinâmica de mobilização de reservas para a aquisição de competência embriogênica (Rocha et al. 2012) e a distinção do padrão de

desenvolvimento organogênico e embriogênico (Almeida et al. 2012). Basicamente, a natureza dos compostos encontrados são carboidratos, lipídeos e proteínas, e sua proporção é variável para cada espécie. Em monocotiledôneas prevalecem carboidratos e proteínas, enquanto que, em eudicotiledôneas são observadas proteínas e lipídios (Bewley e Black 1994; Moura et al. 2008).

Em *P. setacea*, nós observamos no embrião zigótico, inicialmente, uma grande quantidade de corpos proteicos e em menor abundância carboidratos, os quais foram consumidos gradativamente durante o processo embriogênico. O mesmo foi observado durante a indução de embriões somáticos em *P. cincinnata*, por Rocha et al. (2012), que constataram a diminuição de corpos proteicos desde os estádios iniciais de indução. Além disso, detectaram a presença de endo e exopeptidases atuando concomitantemente para o consumo e mobilização desses compostos. A diminuição gradativa dos corpos proteicos em *P. setacea* pode estar relacionada com o processo de mobilização dessa reserva durante o processo de proliferação celular, como observado em *P. edulis* por (Silva et al. 2015). Em *Acca sellowiana*, a essencialidade desses compostos de reserva foi observada durante a diferenciação e morfogênese *in vitro* da embriogênese somática, uma vez que, os teores de proteínas totais decrescem até os 30 dias de indução, e ocorreu um incremento desses compostos de acordo com a progressão dos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (Cangahuala-Inocente et al. 2009).

Não foi verificada, pelo teste Sudan Black B, a presença de corpos lipídicos em nenhuma das fases analisadas nessa espécie. Nossos resultados estão coerentes aos encontrados em *P. edulis* até os 30 dias em meio de indução, entretanto, nessa espécie, após essa etapa houve aumento de corpos lipídicos durante o processo de formação de embriões somáticos (Silva et al. 2015). Contrariamente, Rocha et al. (2012) observaram em *P. cincinnata* a presença moderada de corpos lipídicos desde os estádios iniciais de

desenvolvimento embriogênico até a sua completa degradação nos estádios tardios, não estando presentes nos embriões somáticos formados. Em *Bixa orellana*, Matos (2013) observou a presença de lipídios após 15 e 20 dias no meio de indução e decréscimo acentuado depois dos 32 e 52 dias, não sendo encontrados corpos lipídicos nos embriões somáticos formados. Durante a embriogênese zigótica, Tozzi e Takaki (2011) observaram no decorrer da germinação de sementes de *P. edulis* que a presença de lipídios decresceu significativamente após 10 dias de cultivo, enquanto que o aumento de grãos de amido ocorreu simultaneamente.

Pelo teste histoquímico com Lugol verificou-se a presença de amido até 10 dias no meio de indução e este voltou a ser encontrado, ainda que em menor proporção, aos 30 dias. Assim como o observado em *P. setacea*, em *P. edulis* notou-se a presença de grãos de amido desde os estádios iniciais da cultura (Silva et al. 2015). De maneira antagônica, Rocha et al. (2012) não detectaram amido no embrião zigótico e durante o processo embriogênico, quando presentes, foram mobilizados para formação dos embriões somáticos. Alguns autores atribuem a presença de amido nas células e tecidos ao acréscimo de sacarose ao meio de cultivo (Paim-Pinto et al. 2010).

De acordo Cangahuala-Inocente et al. (2004) a baixa quantidade de amido e corpos lipídicos evidenciam a alta demanda energética para formação de protuberâncias. Essa afirmação confirma o que foi observado em *P. setacea*, na qual, durante a formação de protuberâncias houve decréscimo acentuado de grãos de amido. O amido é considerado a fonte primária de energia para a proliferação celular e crescimento. O consumo desses grãos de amido, por conseguinte, deve fornecer energia para o desenvolvimento de embriões somáticos, sugerindo uma regulação ativa de acúmulo de amido (Martin et al. 2000).

Constatou-se aqui, que após os 30 dias no meio de indução ocorreram novamente à presença de grãos de amido, sendo um indicativo de síntese *de novo*. Rocha et al. (2012) relataram que em *P. cincinnata*, grãos de amido não constituíram compostos de reserva, indicando a ocorrência de síntese *de novo* e também que esses compostos podem estar associados com a síntese de lipídeos. Em macaúba, Moura et al. (2010) relataram que o embrião zigótico não apresenta grãos de amido como material de armazenamento, e ocorre síntese *de novo*, sendo observado o acúmulo desse composto de reserva em células que não tinham características embriogênicas, localizadas próximas a regiões com alta atividade metabólica. O mais provável é que o amido esteja relacionado com a pouca atividade mitótica das células que geralmente o acumulam, já que as células embriogênicas, normalmente com alta atividade metabólica, possuem menor acúmulo desse composto (Moura et al. 2008; Moura et al. 2010).

Em *P. setacea* foi observado que após 10 dias em meio de indução a proliferação meristemática de células da epiderme e meristema fundamental deu origem a protuberâncias constituídas por células meristemáticas e tecido vascular, não formando embriões somáticos diretamente. O mesmo foi relatado em *P. cincinnata* por (Rocha et al. 2012). As protuberâncias observadas diferenciaram-se em zonas pró-embriogênicas as quais originaram embriões somáticos em *P. setacea*. Segundo San-José et al. (2010) nem todas as células que adquirem características meristemáticas podem ser denominadas competentes embriogênicas. Após a formação de protuberâncias, respostas embriogênicas foram obtidas, sendo possível que o desenvolvimento esteja relacionado à fase de redeterminação de células embriogênicas como visto por Féher (2005) e Rocha et al. (2012).

Averiguou-se, ainda, por meio de testes histoquímicos que *P. cincinnata* apresentou corpos proteicos e amido em todas as etapas analisadas, e a presença de

carboidratos e corpos lipídicos foi encontrada até os 10 dias de indução. Pode-se inferir que a degradação dos compostos de reserva durante o processo organogênico culminou em meristemoides e posterior formação de gemas em *P. cincinnata*. Assim como na embriogênese, os compostos de reservas iniciam um papel importante na organogênese *in vitro*. O consumo destes compostos tem sido relacionado aos processos organogênicos e embriogênicos (Martin et al. 2000). Há muitas décadas atrás já se estudava a participação dos componentes de reserva na rota organogênica. Thorpe e Murashige (1970) observaram em calos organogênicos e não organogênicos de tabaco que não houve mudanças no conteúdo de DNA das células. Além disso, a coloração mais densa para o RNA e proteínas foi observada nas regiões de formação dos brotos. E ainda, observaram o acúmulo de amido em células meristemáticas e esse acúmulo precedia a formação de qualquer órgão e principalmente em locais que deram origem aos primórdios foliares.

A linha de mecanismos moleculares que iniciam e mantêm as rotas embriogênicas nas plantas é amplamente desconhecida. O emprego de técnicas de biologia molecular levaram a identificação de diversos genes relacionados à embriogênese somática como *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*), *BBM* (*Baby Boom*), *AGL15* (*AGAMOUS-like15*), *LEC1*, *FUS3* (*Fusca3*) e *ABI3* (*ABA Insensitive 3*) (Ikeda et al. 2006). Em *Daucus carota* o gene *DcSERK* foi apontado como marcador de células embriogênicas no meio de cultura (Schmidt et al. 1997). Ao gene *BBM* têm sido atribuídas atividades envolvendo modificações na parede celular associada com divisão e crescimento celular, sugerindo que este gene ativa redes complexas de rotas de desenvolvimento vinculadas à proliferação celular (Passarinho et al. 2008).

No presente estudo apresentam-se dados inéditos da expressão dos genes *SERK* e *BBM*, por hibridização *in situ*, em duas espécies de Passifloráceas que respondem diferencialmente a uma mesma condição de cultivo *in vitro*. Em *P. setacea* foi observado a expressão dos genes *SERK* e *BBM* desde o embrião zigótico, utilizado como explante, até a formação de embriões somáticos. Nessa espécie, a expressão do *BBM* foi mais intensa nas protuberâncias e embriões somáticos formados quando comparadas à expressão de *SERK*. *P. cincinnata*, por sua vez, não formou embriões somáticos, apenas brotos organogênicos, entretanto, também apresentou sinal de hibridização dos genes *SERK* e *BBM* em todas as fases analisadas. A presença dos transcritos de ambos os genes estudados foi intensificada aos 20 dias de indução nas células periféricas de calos não embriogênicos.

Como houve expressão do *SERK* em calos embriogênicos de *P. setacea* e em calos não embriogênicos de *P. cincinnata*, nossos dados são condizentes ao observado em *SERK* por Baudino et al. (2001) com *Zea mays*, por Zakizadeh et al. (2010) com *Rosa hybrida* e por Ge et al. (2010) com *Citrus*. Os autores constataram que este gene foi expresso em calos embriogênicos e não embriogênicos. Além da embriogênese, em *M. truncatula* e *Helianthus annuus*, a expressão do gene *SERK* é estimulada por tratamentos que induzem organogênese, sugerindo um papel mais geral do gene durante a morfogênese (Maillot et al. 2009; Cueva et al. 2012). Aparentemente, a sinalização mediada por *SERK* é necessária em células que mantêm ou recuperam o seu potencial embriogênico, mas também é necessária em células que participam da organogênese (Albrecht et al. 2005; Cueva et al. 2012).

Ge et al. (2010) detectaram por hibridização *in situ* em *Citrus* a expressão de *CiSERK* em calos não embriogênicos, sugerindo que nem todas as células que tem expressão do *SERK* tem competência embriogênica para formar embriões. Entretanto, a

alta expressão em calos embriogênicos e o aumento na regulação durante os estádios de indução exibem a correlação entre o aumento da expressão de *CiSERK* e a competência embriogênica dos calos. Consequentemente, a expressão de *CiSERK* em *Citrus* pode ser considerada marcadora de células competentes. A expressão de *CiSERK* foi observada no exterior das células e nas camadas vasculares dos embriões. Dado o exposto, pode-se inferir que o gene *SERK* pode ser considerado um marcador de células competentes em *P. setacea* e *P. cincinnata*, visto que, sua expressão foi similar à observada em *Citrus*. Em *Arabidopsis* o *AtSERK* foi expresso em células vasculares imaturas e procâmbio, sugerindo que a expressão do *AtSERK* é concentrada em populações de células meristemáticas (Kwaaitaal e de Vries 2007).

Savona et al. (2012) observaram o papel dos genes *SERK* na formação e manutenção de células meristemáticas na embriogênese somática e organogênese *in vitro* de Ciclâmen. Os autores constaram que houve alta expressão do *SERK1* e *2* durante a embriogênese, expressão moderada durante a organogênese e nenhum sinal de marcação em calos. A expressão desses genes iniciou em grupos de células meristemáticas, ambos em regiões pró-embriogênicas e em meristemoides que culminaram na formação de órgãos. Os resultados apontam *SERK1* e *SERK2* como marcadores de pluripotência em Ciclâmen. Em razão de termos verificado a expressão de *SERK* em *P. setacea* e *P. cincinnata* de maneira semelhante ao observado por Savona et al. (2012), nós inferimos que esse gene é também um marcador de pluripotência em passifloráceas.

Também foi observada a expressão do gene *BBM* em regiões embriogênicas e organogênicas em *P. setacea* e *P. cincinnata*, respectivamente. O mesmo foi averiguado em *Arabidopsis*, a atividade do gene *BBM* inicialmente estava restrita a células em divisão, em seguida foram marcados embriões somáticos, estruturas organogênicas e

calos. Nas partes dos explantes que não estavam envolvidos à morfogênese não foi observado sinal do *BBM*. Assim, a expressão *in vitro* do *BBM* coincide com a proliferação celular e morfogênese (Kulinska-Lukaszek et al. 2012). Boutillier et al. (2002) ressaltaram a capacidade do *BBM* em promover a embriogênese e organogênese na ausência de reguladores de crescimento, indicando que o *BBM* pode estimular a produção de hormônios vegetais e/ou aumentar a sensibilidade das células a estas substâncias. De maneira contrária, a expressão do *BBM* em nosso trabalho está vinculada a culturas suplementadas com diversos tipos de reguladores de crescimento.

Análises da superexpressão do *BBMI* em *Arabidopsis* e tabaco mostraram que o gene *BBM* promove a ES na ausência de reguladores de crescimento e induz brotos organogênicos, respectivamente, sugerindo que o *BBMI* tem a capacidade de induzir a organogênese bem como a embriogênese dependendo do ambiente celular e genético (Boutillier et al. 2002; Srinivasan et al. 2007). Chen e Luthe (1987) relataram em arroz a presença de embriões somáticos oriundos de calos embriogênicos e brotos ou raízes formados a partir de calos não embriogênicos, e assumem que a expressão gênica nesses dois tipos de calos não é diferente.

Dado o exposto, relatamos nesse trabalho a resposta antagônica de duas espécies de Passifloráceas, seguindo rotas morfogênicas divergentes quando submetidas a um mesmo meio de cultivo. Além disso, apresentamos dados inéditos na indução da embriogênese somática em *P. setacea*, a dinâmica de expressão espacial e temporal dos genes *SERK* e *BBM* por meio de hibridização *in situ* e a mobilização de reservas durante os estádios de indução da embriogênese somática. Nossos resultados iniciam a compreensão acerca dos eventos moleculares que envolvem a embriogênese somática e os aspectos que levam a seguir determinada rota morfogênica em *P. setacea* e *P. cincinnata*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agra MF, Locatelli E, Rocha EA, Baracho GS, Formiga SC (1996) Plantas medicinais nos Cariris Velhos, Paraíba, Parte II: subclasses Magnoliidae, Caryophyllidae, Dilleniidae e Rosidae. *Revista Brasileira de Farmacologia* 3:97-102
- Albrecht C, Russinova E, Hecht V, Baaijens E, de Vries S (2005) The *Arabidopsis thaliana* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1* and 2 control male sporogenesis. *Plant Cell* 17:3337-3349
- Alexandre RS, Couto FAA, Dias JMM, Otoni WC, Mendes RdC, Cecon PR (2008) In vitro organogenesis of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) affected by irradiance, sucrose and explant position. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 4:62-69
- Almeida AM, Parreira JR, Santos R, Duque AS, Francisco R, Tome DF, Ricardo CP, Coelho AV, Fevereiro P (2012) A proteomics study of the induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* using 2DE and MALDI-TOF/TOF. *Physiologia Plantarum* 146:236-249
- Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, Hecht VFG, Dresselhaus T, Lorz H, Dumas C, Rogowsky PM (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. *Planta* 213:1-10
- Bewley JD, Black M (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. In: Springer US, Plenum, London
- Bolouri-Moghaddam MZ, Le Roy K, Xiang L, Rolland F, den Ende MV (2010) Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal* 277:2022-2037
- Boutillier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C, van Lammeren AAM, Miki BLA, Custers JBM, Campagne MML (2002) Ectopic

- expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell* 14:1737-1749
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Maldonado SB, Guerra MP (2009) Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:217-224
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Santos M, Guerra MP (2004) Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224:33–40
- Chagas K (2014) Maturação e germinação de embriões somáticos do mamoeiro ‘GoldenTHB’. Universidade Federal do Espírito Santo, ES, pp-54
- Chen L, Luthe DS (1987) Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Science* 48:181- 188
- Cueva A, Concia L, Cella R (2012) Molecular characterization of a Cyrtochilum loxense *Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 31:1129-1139
- Debiasi C, Fráguas CB, Lima GPP (2007) Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis sp.* *Ciência Rural* 37:1014-1020
- Divakaran SP, Nair AS (2011) Somatic embryogenesis from bract cultures in diploid *Musa acuminata* cultivars from South India. *Scientia Horticulturae* 131: 99–102
- Dodsworth S (2009) A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. *Developmental Biology* 336:1-9
- Dutra NT, Silveira V, de Azevedo IG, Gomes-Neto LR, Facanha AR, Steiner N, Guerra MP, Floh EI, Santa-Catarina C (2013) Polyamines affect the cellular growth and structure of pro-embryogenic masses in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures through the modulation of proton pump activities and endogenous levels of polyamines. *Physiologia Plantarum* 148:121-132

- Faleiro FG, Junqueira NTV, Fávero AP, Lopes MA (2008) Pré-melhoramento de plantas: experiências de sucesso. In: Faleiro FG, Farias Neto AL, Ribeiro Junior WQ (eds) Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: Estratégias e desafios. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 43–62
- Féher A, Pasternack TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:201–228
- Féher A (2005) Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? In: Mujid A, Samaj J, (eds) Somatic Embryogenesis., *Plant Cell Monographs* volume 2, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, p. 85-101
- Féher A (2014) Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- Feirer RP (1995) The biochemistry of conifer embryo development: amino acids, polyamines and storage proteins. In: Mohan Jain S, Gupta PK, Newton R (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Kluwer Academic Publishers, pp 317-336
- Gaj MD (2001) Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:39–46
- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43:27–47
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158
- 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
- Ge X-X, Fan G-E, Chai L-J, Guo W-W (2010) Cloning, molecular characterization and expression analysis of a *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* gene (*CitSERK1-like*) in Valencia sweet orange. *Acta Physiologiae Plantarum* 32:1197-1207
- Gerdakaneh M, Zohori M (2013) The effect of picloram on somatic embryogenesis of different explants of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *British Biotechnology Journal* 2:133-142
- Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, Meyerowitz EM (2007) Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development* 134:3539-3548
- Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB (1998) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (eds) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Embrapa, Brasília-DF, pp 533-568
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schimit DI, Boutillier K, Grossnicklaus U, de Vries SC (2001) The *Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* gene is expressed in development ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology and Biochemistry* 127:803- 816
- Huang X, Lu X-Y, Zhao J-T, Chen J-K, Dai X-M, Xiao W, Chen Y-P, Chen Y-F, Huang X-L (2009) *MaSERK1* Gene Expression Associated with Somatic Embryogenic Competence and Disease Resistance Response in Banana (*Musa* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter* 28:309- 316
- Ikeda M, Umehara M, Kamada H (2006) Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology* 23:153–161

- Jimenez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47:91–110
- Kaouther BM, Nadhra E, Ahlem C, Jemmali A, Druart P (2011) In vitro picloram-induced somatic embryogenesis from leaflets of Cherry (*Prunus incisa* Thunb.). *Journal of Life Sciences* 5:913- 920
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137- 138
- Kulinska-Lukaszek K, Tobojka M, Adamiok A, Kurczynska EU (2012) Expression of the *BBM* gene during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 56: 389- 394
- Kuznetsov VV, Radyukina NL, Shevyakova NI (2006) Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology* 53:583- 604
- Kwaaitaal MA, de Vries SC (2007) The *SERK1* gene is expressed in procambium and immature vascular cells. *Journal of Experimental Botany* 58:2887- 2896
- Lombardi SP, Passos IRS, Nogueira MCS, Appezzato-da-Glória B (2007) *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50:239–247
- Lu J, Chen R, Zhang M, da Silva JA, Ma G (2013) Plant regeneration via somatic embryogenesis and shoot organogenesis from immature cotyledons of *Camellia nitidissima* Chi. *Journal of Plant Physiology* 170:1202- 1211
- Macedo AF (2010) Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar. Universidade de São Paulo, SP, pp - 90
- Maillot P, Lebel S, Schellenbaum P, Jacques A, Walter B (2009) Differential regulation of *SERK*, *LECI-like* and pathogenesis-related genes during indirect secondary

somatic embryogenesis in grapevine. *Plant Physiology and Biochemistry* 47:743-752

Martin AB, Cuadrado Y, Guerra H, Gallego P, Hita O, Martin L, Dorado A, Villalobos N (2000) Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science* 154:143–151

Matos EM (2013) Caracterização morfo-anatômica, hitoquímica e expressão de genes *SERK* durante a embriogênese somática em *Bixa orellana* L. (Bixaceae). Universidade Federal de Viçosa, MG, pp- 87

Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY (2010) Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola* 67:399- 407

Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY, de Sá Júnior AQ, Carvalho M, Manfio CE (2008) Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95:175- 184

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497

Nakagawa R, Kurushima M, Matsui M, Nakamura M, Kubo T, Funada R (2011) Polyamines promote the development of embryonal-suspensor masses and the formation of somatic embryos in *Picea glehnii*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*: 47:480– 487

Nic-Can GI, Lopez-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R, De-la-Peña C (2013) New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PloS One* 8:1-14

- Oliveira JC, Ruggiero C (2005) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds) Espécies de maracujá com potencial agrônômico. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, pp 143-158
- Otoni WC, Casali VWD, Power JB, Davey MR (1996) Particle bombardment-mediated transient expression of *GUS* in passionfruit (*Passiflora giberti* N. E. Brown). Revista Ceres 43:329 -336.
- Otoni WC, Paim-Pinto DL, Rocha DI, Vieira LM, Dias LLC, Silva ML, Silva CV, Lani ERG, Silva LCd, Tanaka FAO (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
- Paim-Pinto DL, Almeida Barros B, Viccini LF, dos Campos JMS, da Silva ML, Otoni WC (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 103:71-79
- Paim-Pinto DL, de Almeida AMR, Rêgo MM, da Silva ML, de Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 107:521-530
- Passarinho P, Ketelaar T, Xing M, van Arkel J, Maliepaard C, Hendriks MW, Joosen R, Lammers M, Herdies L, den Boer B, van der Geest L, Boutillier K (2008) *BABY BOOM* target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. Plant Molecular Biology 68:225-237
- Passos IRS, Bernacci LC (2005) Cultura de tecidos aplicada a conservação *in vitro* de germoplasma e melhoramento de maracujá (*Passiflora* spp.). In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento. Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, pp 361–383

- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology* 129:1807–1900
- Pathi KM, Tula S, Tuteja N (2013) High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tobacco. *Plant Signaling & Behavior* 8:243-254
- Pavlovic S, Vinterhalter B, Zdravkovic-Korac S, Vinterhalter D, Zdravkovic J, Cvikiv D, Mitic N (2012) Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 113: 397- 406
- Reis LB, Silva ML, Lima ABP, Oliveira MLP, Paim-Pinto DL, Lani ERG, Otono WC (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit speceis: *Passiflora cincinnata* e *P. edulis* f. flavicarpa. *Acta Horticulturae* 738: 425 – 431
- Rocha D, Dornelas MC (2013) Molecular overview on plant somatic embryogenesis. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 8: 1-17
- Rocha DI, Monte-Bello CC, Dornelas MC (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
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FA, da Silva LC, Otoni WC (2012) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249:747-758

- Rosa YBCJ, Bello CCM, Dornelas MC (2015) Species-dependent divergent responses to in vitro somatic embryo induction in *Passiflora* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 69-72
- San-José MC, Corredoira E, Martinez MT, Vidal N, Valladares S, Mallón R, Vieitez AM (2010) Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees. *Plant Cell Reports* 29:661–671
- Santa-Catarina C, Silveira V, Scherer GFE, Floh EIS (2007) Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90:93-101
- Santos EA, Souza MM, Abreu PP, da Conceição LDHCS, Araújo IS, Viana AP, de Almeida A-AF, Freitas JCdO (2011) Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. *Euphytica* 184:389-399
- Savona M, Mattioli R, Nigro S, Falasca G, Della Rovere F, Costantino P, De Vries S, Ruffoni B, Trovato M, Altamura MM (2012) Two SERK genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. *Journal of Experimental Botany* 63:471-488
- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) A Leucine-rich Repeat containing Receptor-like Kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124: 2049-2062
- Shi X, Gupta S, Rashotte AM (2014) Characterization of two tomato AP2/ERF genes, *SICRF1* and *SICRF2* in hormone and stress responses. *Plant Cell Reports* 33:35-45
- Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Science* 160:1229-1235

- Silva CV, Oliveira LS, Loriato VAP, Silva LCd, Campos JMS, Viccini LF, Oliveira EJ, Otoni WC (2011) Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107:407- 416.
- Silva GM, Cruz ACF, Otoni WC, Pereira TNS, Rocha DI, Silva ML (2015) Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* (In press)
- Silva ML, Paim-Pinto DL, Guerra MP, Floh EIS, Bruckner CH, Otoni WC (2009) A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99:47- 54
- Silveira V, Santa-Catarina C, Tun NN, Scherer GFE, Handro W, Guerra MP, Floh EIS (2006) Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant Science* 171:91–98
- Smertenko A, Bozhkov PV (2014) Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. *Journal of Experimental Botany* 65:1343–1460
- Souza JSI, Meletti LMM (1997) Maracujá: espécies, variedades e cultivo. In. FEALQ, Piracicaba, pp- 179
- Srinivasan C, Liu S, Heidmann I, Supena EDJ, Fukuoka H, Joosen R, Lambalk J, Angenent G, Scorza R, Custers JB, Boutillier K (2007) Heterologous expression of the *BABY BOOM* AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta* 225:341–351
- Sucharitakul K, Rakmit R, Boonsorn Y, Leelapon O, Teerakathiti T, Bunnag S, Chanvivattana Y (2014) Isolation and expression analysis of a *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* gene in *Curcuma*

*alismatifolia* Gagnep. Journal of Agricultural Science 6:  
DOI:10.5539/jas.v6n10p207

Suzuki S, Oota M, Nakano M (2002) Embryogenic callus induction from leaf explants of the Liliaceous ornamental plant, *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton Histological study and response to selective agents. *Scientia Horticulturae* 95:123–132

Tang W, Newton RJ (2005) Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in *Virginia pine*. *Plant Growth Regulation* 46:31–43

Thorpe TA, Murashige T (1970) Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. *Canadian Journal of Botany* 48:277-285

Titon M, Xavier A, Otoni WC, Motoike SY (2007) Efeito dos reguladores de crescimento Dicamba e Picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore* 31:417-426

Tozzi HH, Takaki M (2011) Histochemical analysis of seed reserve mobilization in *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg. (yellow passion fruit) during germination. *Brazilian Journal of Biology* 71:701-708

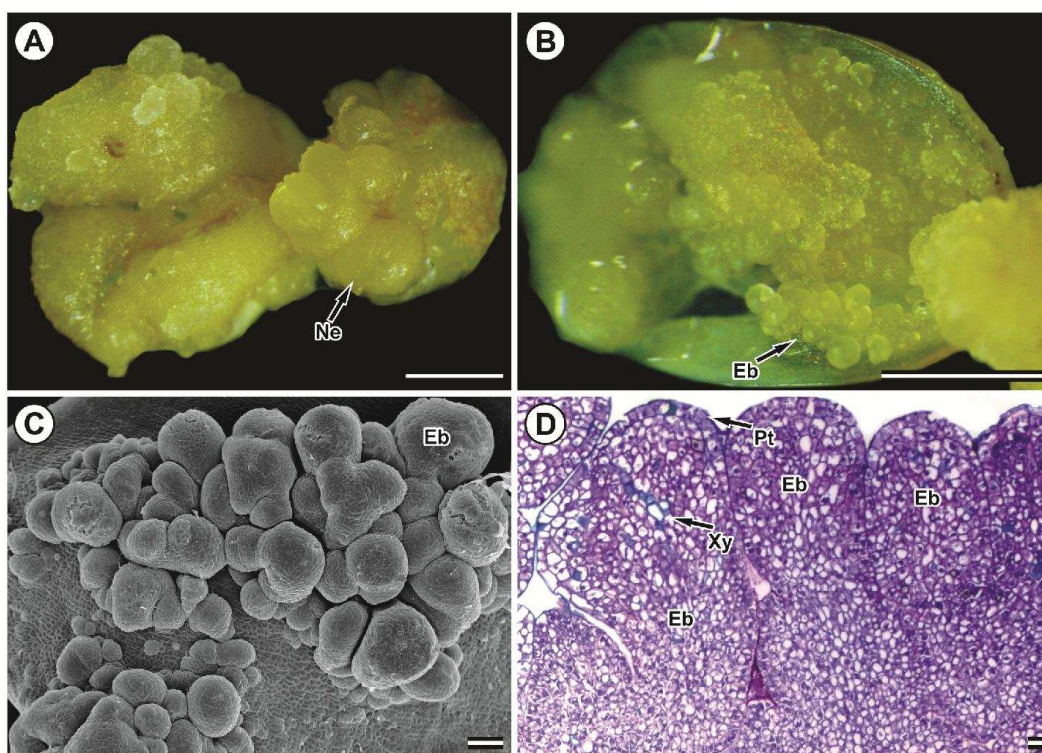
Vardi A, Galun E (1988) Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. *Scientia Horticulturae* 37:217-230

Vieira LM, Rocha DI, Taquetti MF, da Silva LC, de Campos JMS, Viccini LF, Otoni WC (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

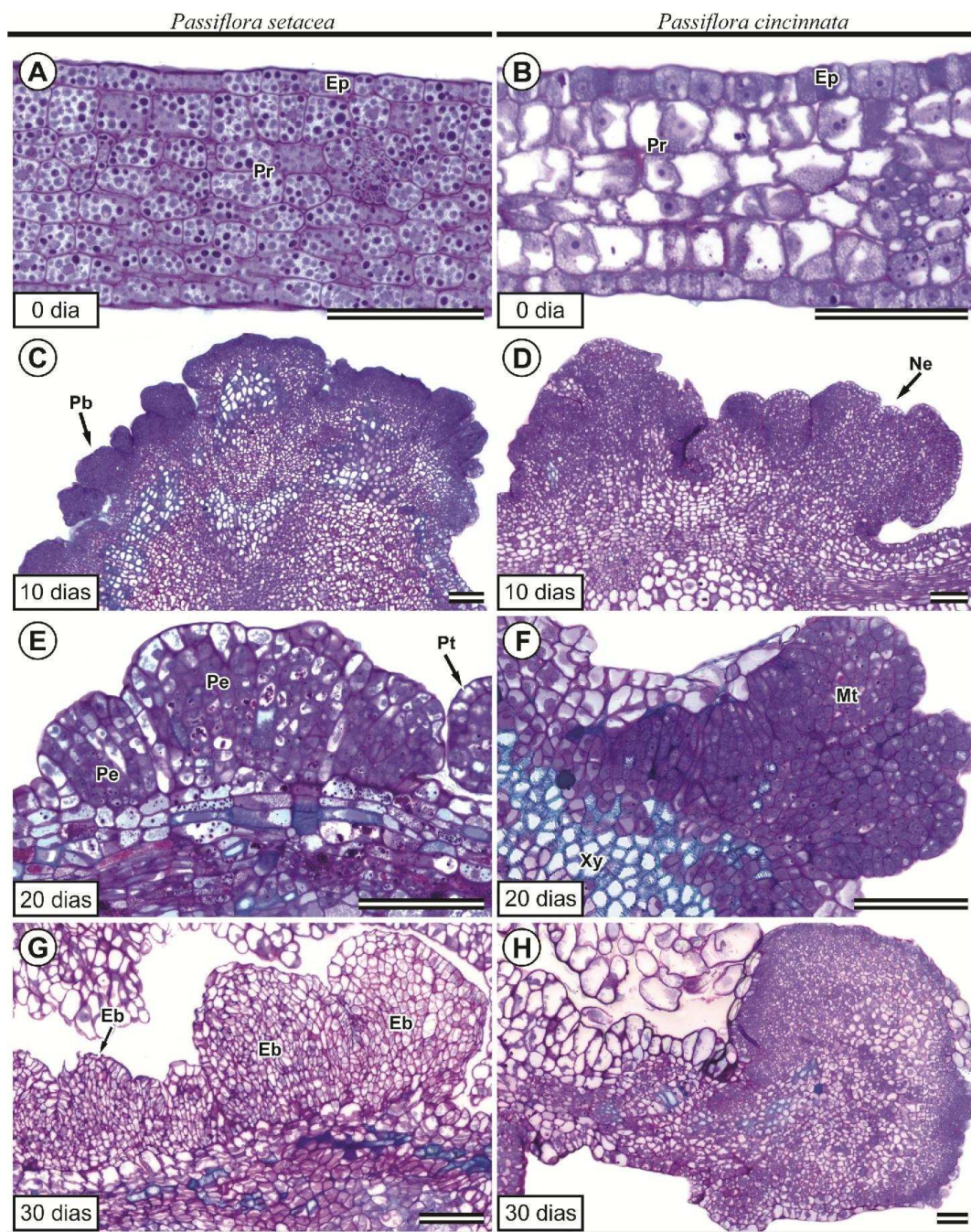
von Arnold S (2008) Somatic Embryogenesis. In: Edwin FG, Hall MA, De Klerk G (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 335-354

- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69:233–249
- Woodward AW, Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95:707–735
- Xu L, Huang H (2014) Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. *Current Topics in Developmental Biology* 108:1– 33
- Yadav JS, Rajam MV (1997) Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. *Journal of Experimental Botany* 48:1537-1545
- Zakizadeh H, Stummann BM, Lütken H, Müller R (2010) Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 101:331-338
- Zienkiewicz A, Jimenez-Lopez JC, Zienkiewicz K, de Dios Alche J, Rodriguez-Garcia MI (2011) Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) in vitro seed germination and seedling growth. *Protoplasma* 248:751-765
- Žur I, Dubas E, Krzewska M, Sánchez-Díaz RA, Castillo AM, Vallés MP (2013) Changes in gene expression patterns associated with microspore embryogenesis in hexaploid triticale ( $\times$ Triticosecale Wittm.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 116:261-267

## 6. FIGURAS E LEGENDAS

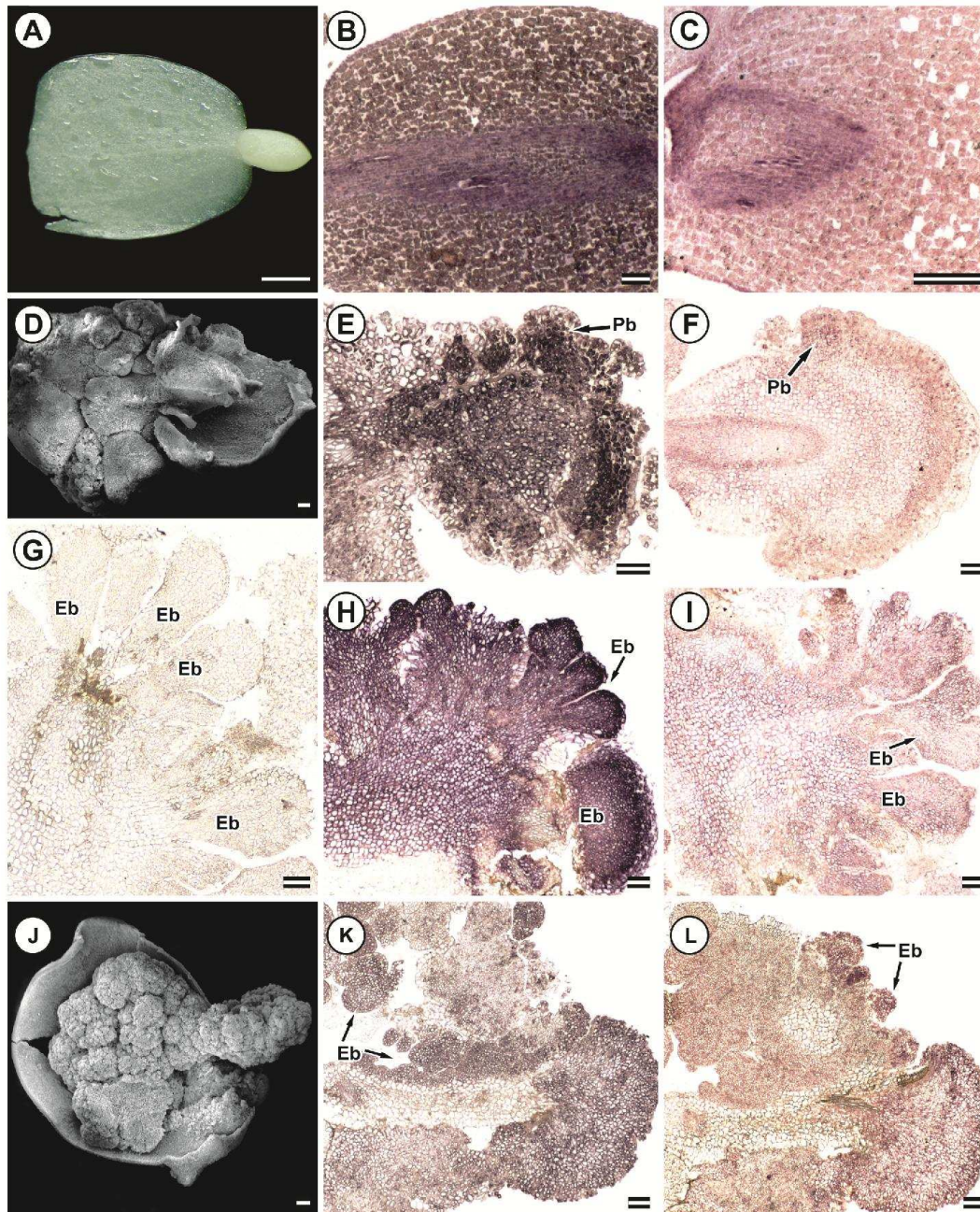


**Figura 1.** Resultados preliminares da indução de embriogênese somática em *P. setacea* e *P. cincinnata* submetidas ao meio MIP + EM + Spd. **(A)** Embrião zigótico de *P. cincinnata* apresentando calejamento por toda superfície cotiledonar após 30 dias em MI, mas ausência de embriões somáticos. Em *Passiflora setacea* **(B)** presença de embriões somáticos após 30 dias em meio de indução, **(C)** microscopia eletrônica de varredura e **(D)** microscopia de luz, evidenciando embriões somáticos individualizados. Legenda: **Eb:** embrião somático, **Ne:** calo não-embriogênico; **Pt:** protoderme; **Xy:** xilema. Barras: **500 µm** (A, B), **100 µm** (C, D).



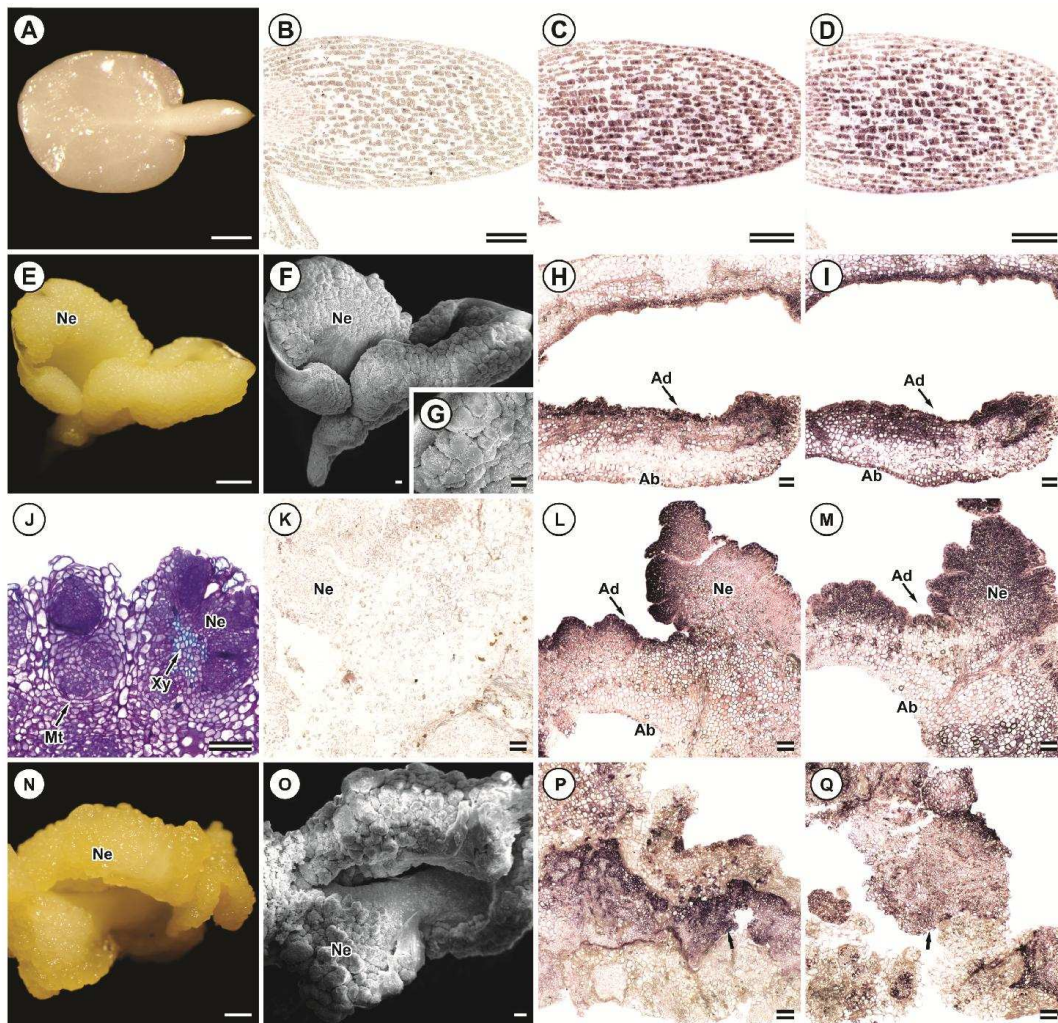
**Figura 2:** Indução de embriogênese somática em *P. setacea* e *P. cincinnata* submetidas ao meio 3 (MIP+ EM+ Spd). **(A)** Lâmina cotiledonar do embrião zigótico de *P. setacea* e **(B)** *P. cincinnata* utilizado como explante (0 dia no meio de indução). **(C)** Depois de 10 dias em meio de indução houve formação de protuberâncias a partir das células parenquimáticas do eixo embrionário em *P. setacea* e em **(D)** houve proliferação das células parenquimáticas em *P. cincinnata*. **(E)** Após 20 dias de indução notou-se a formação de proembriões com protoderme definida em *P. setacea* e **(F)** proliferação

desordenada de células e formação de meristemoides em *P. cincinnata*. **(G)** Em *P. setacea*, após 30 dias em meio de indução, observou-se embriões globulares com protoderme bem definida e ausência de conexão vascular com o explante. **(H)** Em *P. cincinnata* aos 30 dias, observou-se o desenvolvimento dos meristemoides, e, portanto, ausência de embriões somáticos individualizados, apenas calejamento intenso e vascularização, caracterizando regiões organogênicas. Legenda: **Eb**: embrião somático; **Mt**: meristemoides; **Ne**: calo não-embriogênicos; **Pb**: protuberância; **Pe**: proembrião; **Pr**: parênquima; **Pt**: protoderme; **Xy**: xilema. Barras: **100 µm**.



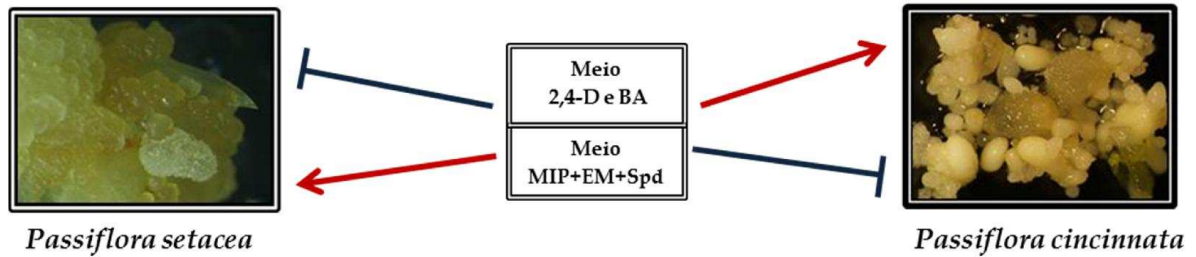
**Figura 3:** Indução de embriogênese somática *in vitro* a partir de embriões zigóticos de *P. setacea* em meio MIP+ EM+ Spd. **(A)** Embrião zigótico de *P. setacea* utilizado como explante inicial (0 dia no meio de indução). **(B)** Expressão dos genes *BBM* e **(C)** *SERK* no explante inicial, evidenciando a forte coloração na região vascular. **(D)** Microscopia eletrônica de varredura e **(E)** de transcritos dos genes *BBM* e **(F)** *SERK* em explantes com formação de protuberâncias após 10 dias no meio de indução. **(G)** Ausência de sinal no controle negativo com sonda *sense*, após 20 dias em meio de indução. **(H)** Expressão dos

genes *BBM* e **(I)** sinal fraco de *SERK* em embriões somáticos após 20 dias no meio de indução. **(J)** Microscopia eletrônica de varredura e **(K)** expressão dos genes *BBM* e **(L)** *SERK* em regiões de formação de embriões somáticos após 30 dias no meio de indução. Legenda: **Eb**: embrião; **Pb**: protuberâncias; Barras: **100 μm** (B, C, E-I, K, L), **500 μm** (A, D, J).



**Figura 4:** Indução de embriogênese somática *in vitro* a partir de embriões zigóticos de *P. cincinnata* em meio MIP+ EM+ Spd. (A) Embrião zigótico de *P. cincinnata* utilizado como explante inicial (0 dia no meio de indução), (B) ausência de sinal do gene *BBM* quando submetido a sonda *sense* e (C) expressão dos genes *BBM* e (D) *SERK* nesse mesmo estágio. (E) Após 10 dias em meio de indução, notou-se o início da formação de calos no explante evidenciado por estereomicroscópio, (F - G) microscopia eletrônica de varredura e (H) expressão dos genes *BBM* e (I) *SERK*, especialmente na face adaxial do explante. (J) Observou-se a formação de meristemoides por toda extensão do explante, indicando não se tratar de embriões somáticos. (K) Depois de 20 dias em meio de indução ausência de sinal do gene *BBM* no tratamento controle, enquanto que, (L) a coloração indicativa de expressão do gene *BBM* e (M) *SERK* foi fortemente expressa em células meristemáticas na periferia dos explantes nesse estágio. (N - O) Após 30 dias em meio de indução o explante inicial encontrou-se recoberto por calos não embriogênicos.

Nesse estágio, **(P)** observou-se forte expressão dos transcritos de *BBM* e **(Q)** *SERK*, especialmente nas células da região vascular. Legenda: **Ab**: face abaxial; **Ad**: face adaxial; **Mt**: meristemoides; **Ne**: calo não-embriogênico; **Xy**: xilema; **setas**: regiões organogênicas. Barras: **500 μm** (A, E-G, N-O), **100 μm** (B-D, H-M, P-Q).



**Figura 5:** Representação esquemática das relações entre meios de indução de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *Passiflora setacea* e *P. cincinnata*. As setas em vermelho e as barras azuis indicam indução e não indução de respostas embriogênicas, respectivamente.

## 7. TABELA

**Tabela 1.** Dados qualitativos de análises histoquímicas da indução de embriogênese somática de *Passiflora setacea* e *P. cincinnata* em diferentes estádios de desenvolvimento no meio MIP+ EM+ Spd. A presença do sinal (+) indica reação positiva e o sinal (-) sinaliza reação negativa aos testes. A ocorrência do sinal mais de uma vez indica a intensidade observada para corpos proteicos com o teste de Xilidyne Ponceau (XP), para carboidratos com PAS, para amido com Lugol e corpos lipídicos com Sudan Black B.

<i>P. setacea</i>	XP	PAS	Lugol	Sudan Black B
0 dia	+++	++	+	-
10 dias	++	+	+	-
20 dias	+	-	-	-
30 dias	+	-	+	-
<i>P. cincinnata</i>				
<i>P. cincinnata</i>	XP	PAS	Lugol	Sudan Black B
0 dia	+	+	+	++
10 dias	+	+	+	+
20 dias	+	-	+	-
30 dias	+	-	+	-

## 8. CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A amplificação do cDNA a partir de calos embriogênicos com diferentes primers degenerados permitiu isolar e identificar sequências parciais de três transcritos intimamente relacionados com a embriogênese somática e sinalização via brassinoesteroides em *Passiflora cincinnata*.
- ✓ As análises filogenéticas das sequências indicam se tratar de dois possíveis representantes da família *SERK* e um possível ortólogo do gene *BBM*, membro da família AP2-Like, expressos durante a embriogênese somática em *P. cincinnata*.
- ✓ Além dos dados de sequência gerados, foi observado o padrão de expressão de transcritos de *SERK* e *BBM* nos explantes ao longo da embriogênese somática semelhante ao descrito em outras espécies. Sugerindo que as funções desses genes são conservadas em *P. cincinnata* e *P. setacea* contribuindo como um marcador de competência embriogênica e pluripotência nos tecidos induzidos nessas espécies.
- ✓ As espécies *P. setacea* e *P. cincinnata* apresentam respostas morfogênicas divergentes quando submetidos a um mesmo meio de indução de embriogênese, o meio de cultivo utilizado para induzir embriões somáticos em *P. setacea* levou à formação de brotos organogênicos em *P. cincinnata*;
- ✓ Análises de substâncias de reserva em *P. setacea* e em *P. cincinnata* permitem monitorar o desenvolvimento das plantas e servem como marcadores para os processos morfogênicos.