

JÉSSICA RIBEIRO SOARES

**EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DO microRNA156 SOBRE A
MORFOFISIOLOGIA DE *Passiflora edulis* SIMS. DURANTE A TRANSIÇÃO DE
FASE JUVENIL/ADULTA**

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

Orientador: Wagner Campos Otoni

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S676e
2020
Soares, Jéssica Ribeiro, 1992-
Efeitos da superexpressão do microRNA156 sobre a
morfofisiologia de *Passiflora edulis* Sims. durante a transição de fase
juvenil/adulta / Jéssica Ribeiro Soares. - Viçosa, MG, 2020.
56 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.30-37.

1. Morfologia vegetal. 2. RNA. 3. Passifloraceae. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 571.3

JÉSSICA RIBEIRO SOARES

**EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DO microRNA156 SOBRE A
MORFOFISIOLOGIA DE *Passiflora edulis* SIMS. DURANTE A TRANSIÇÃO DE
FASE JUVENIL/ADULTA**

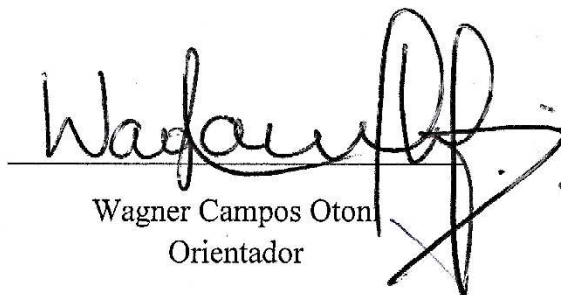
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal para obtenção do título em *Magister Scientiae*.

APROVADA: 02 de março de 2020.

Assentimento:



Jéssica Ribeiro Soares
Autora



Wagner Campos Otonari
Orientador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Pedrelina e Terezino, aos meus irmãos e sobrinhos pelo apoio incondicional em todos os momentos, por acreditarem em mim quando eu mesma duvidava. Dedico também aos meus amigos pelo incentivo e por tornarem o caminho mais prazeroso!

*“Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente de
qualquer jeito.”*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Gratidão ao Deus da criação, o qual chama a existência as coisas que não existem, que permitiu-me chegar até aqui e sondar a sua glória sob as coisas macro e microscópicas da terra.

Aos meus pais, Pedrelina e Terezino, que muitas vezes renunciaram seus sonhos para que os meus viessem a se tornar realidade, vocês são minha melhor definição de amor. Aos meus irmãos amados Lu, Léo, Warlem, Regi e Janine pelo incentivo, respeito, confiança e alegrias compartilhadas.

Aos meus amigos de longas datas e àqueles que se tornaram em Viçosa pelas conversas, risos, filosofias; sem vocês os meus dias seriam insípidos. Especialmente à Amanda pela recepção em Viçosa; à Maria, Daniel, Diele e Larissa pelo suporte em diversas atividades acadêmicas ao longo dessa experiência.

Ao meu querido orientador Wagner Otoni, a quem reservo grande admiração, pela paciência, confiança, amizade e conhecimentos compartilhados. Minha referência de excelência, profissionalismo e de ser humano.

Ao Prof. Fábio Nogueira pelas sugestões e contribuição para com o trabalho.

À Daniele Vidal, Lorena Melo e ao Diego Batista por aceitarem o convite como membros avaliadores desse trabalho.

À grande família do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCTII) que me acolheu, especialmente a Lorena, Jessenia, Evandro, Daniele pelos ensinamentos, sugestões e ajuda nas análises. À Ludmila pela gentileza e suporte nas análises moleculares. À Tati, Ana Cláudia, pelo suporte nas análises anatômicas. À Márcia Adriana, Quézia, Sabrina, José Victor, Débora, Mayra, Gabriela, Paloma, Tia Tê e Lili, pela maravilhosa convivência e momentos compartilhados.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade e por proporcionar crescimento profissional e pessoal.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal, pelas disciplinas oferecidas, que contribuíram de forma valiosa para o meu aprendizado.

Aos colegas do Programa de Fisiologia Vegetal, especialmente à Karol, pela amizade.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBiomol) e ao Dr. Camilo Vital, pelas análises e quantificação de hormônios vegetais.

Aos Laboratórios de Anatomia Vegetal (DBV/UFV), Genética Molecular de Bactérias (DMB/BIOAGRO), Virologia Vegetal Molecular (DFP/BIOAGRO), pela concessão no uso e compartilhamento de equipamentos.

Ao Laboratório de Genética e Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pelas análises de estabilidade genética.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Belo Horizonte, MG), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todas as pessoas que contribuíram ao longo desse caminho.

Gratidão!

RESUMO

SOARES, Jéssica Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2020. **Efeitos da superexpressão do microRNA156 sobre a morfofisiologia de *Passiflora edulis* Sims. durante a transição de fase juvenil/adulta.** Orientador: Wagner Campos Otoni.

Nas plantas, alterações morfofisiológicas marcam a transição de fase vegetativa para a reprodutiva. Sinais endógenos e exógenos controlam essa transição, entre os fatores endógenos, os microRNAs (miRNAs) têm se destacado por regular diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas. miRNAs são pequenos RNAs não codificantes que regulam seus alvos ao se ligarem em sequências de RNA mensageiros degradando-os ou bloqueando sua tradução. A transição de fases vegetativa juvenil-adulta e reprodutiva é mediada, principalmente, pelo miR156 e miR172. O miR156 possui como alvo genes da família de fatores de transcrição SPLs e é expresso em altos níveis durante a fase vegetativa juvenil, decrescendo à medida que a fase adulta se estabelece, momento em que os níveis de expressão do miR172, que tem como alvo genes da família AP2-like, aumentam. A superexpressão de *miR156* favorece, em diversas espécies, a manutenção de traços juvenis nas folhas, aumenta a ramificação e retarda o florescimento. Em *Passiflora edulis*, a mudança da fase vegetativa juvenil para a fase adulta é marcada por alterações drásticas na morfologia foliar, caracterizando um evento denominado heteroblastia. Diante disso, *P. edulis* demonstra ser uma espécie pertinente para o estudo das redes regulatórias envolvidas na transição de fases. O presente estudo teve como objetivo caracterizar os efeitos da superexpressão do *miR156* sobre os aspectos morfofisiológicos de *P. edulis* durante a transição de fases vegetativa juvenil para adulta. Para isso, foram gerados eventos transgênicos superexpressando *miR156* (*AtmiR156a*) via indução por promotor constitutivo pUbi10. Esses eventos de transgenia foram confirmados, clonados e, juntamente com eventos não transgênicos, transferidos para casa de vegetação. Os resultados demonstraram que a superexpressão de *miR156* provocou alterações na arquitetura das plantas, reduziu a altura e aumentou o número de fitômeros e o índice de ramificação. A morfologia foliar foi afetada drasticamente com formação de lobos sutis, além da densidade estomática reduzida. Além disso, a superexpressão teve efeito sobre os níveis hormonais e comprometeu o crescimento de gavinhas e nectários da lâmina foliar, sugerindo que a via miR156 em *P. edulis* além de estar envolvida na transição de fases e no controle da heteroblastia foliar regula o desenvolvimento de gavinhas e nectários extraflorais.

Palavras-chave: Morfologia vegetal. RNA. Passifloraceae.

ABSTRACT

SOARES, Jéssica Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2020. **Effects of microRNA156 overexpression on the morphophysiology of *Passiflora edulis* Sims. during juvenile/adult phase transition.** Adviser: Wagner Campos Otoni.

Morphophysiological changes mark the transition from the vegetative to the reproductive phase. Endogenous and exogenous signals control the phase transition in plants. Among the endogenous factors microRNAs (miRNAs) stand out for regulating various aspects of plant growth and development. MiRNAs are small, non-coding RNAs that regulate their targets through degradation or translation blocking of messenger RNA sequences. The transition from juvenile to adult and reproductive vegetative phases are mediated mainly by miR156 and miR172. MiR156 targets genes of the family of transcription factors SPLs, and is expressed at high levels during juvenile vegetative phase, decreasing progressively with the advance of the adult phase. At the later, the expression levels of miR172, which targets AP2-like family, increase. Overexpression *miR156* favored, in several species, maintenance of juvenile traits in the leaves, increased branching and delayed flowering. In *Passiflora edulis*, the change from the juvenile vegetative phase to adult phase is marked by drastic changes in leaf morphology, characterizing heteroblasty. Therefore, *P. edulis* represents a reliable species to investigate the phase transition-related regulatory networks. The present study aimed at characterizing the effects of *miR156* overexpression on morphophysiological aspects of *P. edulis* during transition from juvenile vegetative to adult phase. For this, transgenic events were obtained overexpressing *miR156* (AtmiR156a) via induction by constitutive promoter pUbi10. These transgenic events were confirmed, cloned and associated with non-transgenic events transferred to the greenhouse. The results showed that the overexpression of *miR156* leads to changes in the architecture of the plants, reduces the height and increases the number of phytomers and the branching index. The leaf morphology was dramatically affected with the formation of discrete lobes and altered stomatal density. In addition, overexpression of *miR156* had effect on hormone levels and compromises the growth of tendrils and laminar nectaries, suggesting that via miR156 in *P. edulis*, besides this involved in the phase transition and controls heteroblastic process, regulates the development of tendrils and extrafloral nectaries.

Keywords: Plant morphology. RNA. Passifloraceae.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	13
<i>Material vegetal e transformação genética mediada por Agrobacterium</i>	13
<i>Clonagem e aclimatização das plantas</i>	14
<i>Extração de DNA e análise de PCR</i>	15
<i>Avaliação da estabilidade genética de linhagens transgênicas superexpressando miR156 via citometria de fluxo</i>	15
<i>Caracterização fenotípica de linhagens transgênicas superexpressando miR156.....</i>	16
<i>Determinação do crescimento foliar e da gavinha em linhagens transgênicas superexpressando miR156</i>	16
<i>Caracterização anatômica de linhagens transgênicas superexpressando miR156.....</i>	16
<i>Diafanização.....</i>	17
<i>Determinação do perfil hormonal</i>	17
<i>Extração de RNA e síntese de cDNA via 'pulsed-stem loop' RT-qPCR</i>	18
<i>Análise de RT-qPCR.....</i>	18
<i>Análises estatísticas.....</i>	18
RESULTADOS	19
<i>Confirmação de linhagens transgênicas superexpressando miR156</i>	19
<i>Estabilidade genética de linhagens transgênicas superexpressando miR156 via citometria de fluxo</i>	19
<i>Caracterização fenotípica de linhagens transgênicas superexpressando miR156.....</i>	19
<i>Dinâmica do crescimento foliar e da gavinha em linhagens transgênicas superexpressando miR156</i>	20
<i>Caracterização anatômica de folhas e gavinhas de linhagens transgênicas superexpressando miR156</i>	21
<i>Efeito da superexpressão de miR156 na densidade estomática.....</i>	21
<i>Perfil hormonal de linhagens transgênicas superexpressando miR156.....</i>	22

<i>Dinâmica da expressão de miR156, SPL9 e miR172 em folhas de linhagens transgênicas superexpressando miR156</i>	22
<i>Dinâmica da expressão de miR156, SPL9 e miR172 em gavinhas de linhagens transgênicas superexpressando miR156</i>	23
DISCUSSÃO	24
CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS	30
TABELAS	38
FIGURAS	39

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento pós-embrionário das plantas é marcado por mudanças de fases sucessivas: juvenil à adulta e adulta à reprodutiva (Bäurle & Dean, 2006). Ao longo da transição de fases novos órgãos laterais se desenvolvem e podem apresentar mudanças morfoanatômicas conspícuas ou sutis (Huijser & Schmid, 2011; Yu et al., 2015). Variações na morfologia das folhas durante a transição da fase vegetativa juvenil para a fase adulta são referidas como heteroblastia (Wang et al., 2011; Cutri et al., 2013; Tsukaya, 2013; Yu et al., 2015; Silva et al., 2019). Heteroblastia é a mudança gradual de aspectos morfológicos ao longo do desenvolvimento da planta, tais como tamanho e forma da folha, filotaxia, plastocrono e comprimento de internós (Huijser and Schmid, 2011). Tal processo, é capaz de afetar características dos órgãos laterais, e assim, contribuir para a diversificação do modelo foliar em uma mesma planta ou entre espécies (Poethig, 2013; Ostria-Gallardo et al., 2016).

As mudanças de fases vegetativa para reprodutiva em plantas, envolvem respostas a sinais endógenos e exógenos (Zhang et al., 2011; Yu et al., 2013; Teotia & Tang, 2015; Silva et al., 2019). Dentre os fatores endógenos, têm-se considerado os microRNAs (miRNAs) e seus genes alvos importantes componentes regulatórios de diversos aspectos do desenvolvimento das plantas, como atividade do meristema apical caulinar, desenvolvimento de primórdios foliares, estabelecimento da dorsiventralidade foliar e transição da fase vegetativo-reprodutivo (Nogueira et al., 2007; Yu et al., 2013; Teotia & Tang, 2015; Wang et al., 2015; Yu et al., 2015; Zhang et al., 2015; Fouracre & Poethig, 2016; Fouracre & Poethig, 2019). MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão de seus genes alvos ao se ligarem em sequências específicas de RNAs mensageiros, degradando-os ou bloqueando a tradução (Xie et al., 2003; Brodersen et al., 2008; Khraiweh et al., 2010). A transição de fases vegetativa juvenil-adulta e posteriormente reprodutiva são mediadas, principalmente, pelos miR156 e miR172 (Poethig, 2009; Wu et al., 2009).

O *miR156* é um regulador gênico da mudança de fases vegetativa altamente conservado entre as espécies herbáceas e lenhosas (Morea et al., 2016), e tem como alvo membros da família de fatores de transcrição (FTs) SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE (SPL), genes funcionais na promoção de características adultas das plantas (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Yu et al., 2010). Ao longo da evolução das angiospermas, os genes *SPLs*, originaram-se a partir de eventos de duplicação segmentar, fato que pode ter contribuído para a multifuncionalidade destes, além disso, alterações nos sítios de ligação de *miR156* e *miR529*, que possuem como alvo genes *SPLs*, também pode ter favorecido a heterogeneidade funcional

desses genes (Zhang & Ling, 2018). Em *Arabidopsis thaliana*, foram identificados 16 membros da família de FTs SPL, dos quais, dez genes *SPLs* (*SPL2*, *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL6*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13* e *SPL15*) são alvos de *miR156* (Guo et al., 2008). O *miR156* é expresso em altos níveis no início do desenvolvimento (fase vegetativa juvenil), e decresce à medida que a fase adulta se estabelece, momento em que os níveis de expressão de *miR172* aumentam significativamente (Wu et al., 2009; Levy et al., 2014; Silva et al., 2019). A redução nos níveis de *miR156* também é acompanhada pelo aumento de transcritos de genes da família SPL, que irão direcionar a mudança de fase vegetativa para reprodutiva através da ativação de diversos genes relacionados (Wang et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009; Teotia & Tang, 2015; Xu et al., 2016). Além disso, SPLs promovem diretamente a transcrição de *miR172*, contribuindo para o aumento dos níveis desse microRNA (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Xu et al., 2016).

O *miR172* está relacionado com a fase adulto-reprodutiva da planta, tem como alvo 6 membros da família de FTs APETALA 2-LIKE (*AP2-like*) (*AP2*, *TOE1*, *TOE2*, *TOE3*, *SMZ* e *SNZ*) (Schwab et al., 2005; Wu et al., 2009). Os níveis de *miR172* aumentam gradativamente à medida que as plantas se aproximam da fase reprodutiva e esse padrão de abundância, além de estar relacionado com o decréscimo dos níveis de *miR156* e aumento dos transcritos dos SPLs, é também proporcional à redução dos níveis de transcritos de *TOE1* e *TOE2* (Jung et al., 2007). Os genes *TOE1/2*, são responsáveis por promover a ‘identidade juvenil’ da epiderme e por reprimir o florescimento (Wu et al., 2009; Teotia & Tang, 2015).

A superexpressão de *miR156* proporcionou a manutenção de traços juvenis em espécies como *Arabidopsis thaliana* (Wei et al., 2012), *Nicotiana tabacum* (Feng et al., 2016), *Oryza sativa* (Xie et al., 2012) e *Solanum lycopersicum* (Silva et al., 2014). Além disso, alterou diversos aspectos do desenvolvimento, como o número de folhas e de ramificações da parte aérea, o comprimento dos internós e o tempo de floração. Em *Nicotiana tabacum*, a superexpressão de *miR156* proporcionou alterações em diversas características das folhas, tais como padrão de venação, distribuição de tricomas e densidade estomática (Feng et al., 2016). Modificações morfoanatômicas em estruturas reprodutivas e formação anormal de frutos também foram registrados em *Solanum lycopersicum* L. superexpressando *miR156* (Silva et al., 2014). Silva et al. (2019) demonstraram que há correlação entre o balanço dos níveis de expressão de *miR156* e *miR172* em folhas com características juvenis e adultas em *Passiflora edulis*. Diante disso, pressupõe-se que o papel do *miR156* não se limita apenas à regulação da transição de fases, mas também de outras características durante o desenvolvimento das plantas podem ser reguladas temporariamente, tanto pelo *miR156* quanto por genes *SPLs*.

Diversas espécies do gênero *Passiflora* exibem morfologia foliar distinta entre a fase juvenil e adulta, sendo utilizadas como marcadores de identificação entre as espécies (Chitwood & Otoni, 2017). *Passiflora edulis* apresenta padrão foliar heteroblástico pronunciado, cujas folhas durante a fase juvenil são monolobadas, lanceoladas e com margens lisas que vão, progressivamente, serrilhando à medida que o desenvolvimento vegetativo avança. Uma fase intermediária de transição é constatada pela presença de folhas bilobadas e, por fim, na fase vegetativa adulta suas folhas são trilobadas e completamente serrilhadas (Cutri et al. 2013; Silva et al., 2019). Meristemas capaz de gerar tanto gavinhas quanto flores são formados nas axilas das folhas que possuem traços adultos; dessa forma, a gavinha é considerada um marcador do início da fase vegetativa adulta (Nave et al., 2010; Cutri et al., 2013). Presume-se que o desenvolvimento de gavinhas na família Passifloraceae parte da modificação de inflorescências, o que estabelece uma ligação entre a aparição de gavinhas e o estágio reprodutivo da planta (Scorza et al., 2017; Sousa-Baena et al., 2018a; Sousa-Baena et al., 2018b). No entanto, informações sobre os mecanismos moleculares que coordenam o desenvolvimento dessa estrutura ainda são incipientes. Ademais, estudos com o gênero *Passiflora* os quais abordam temas como, morfogênese (Otoni et al., 2013), expressão gênica (Rocha et al., 2016; Silva et al., 2019) e heteroblastia foliar (Chitwood & Otoni, 2017; Silva et al., 2019), têm demonstrado que a espécie apresenta potencial para modelo de investigação de diferentes processos do desenvolvimento vegetal, dentre os quais, as redes regulatórias envolvidas na transição de fase vegetativa juvenil para adulta, bem como, aquisição de características adultas.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar os efeitos da superexpressão de *miR156* sobre os aspectos morfofisiológicos de *P. edulis* durante a transição de fase vegetativa juvenil para adulta. Apresenta-se aqui de forma inédita para a espécie-alvo as implicações da superexpressão do *miR156* sobre a morfofisiologia no que tange à arquitetura das plantas, perfil hormonal endógeno e formação de folhas e gavinhas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e transformação genética mediada por Agrobacterium

Sementes de *Passiflora edulis* Sims. FB-300 foram cedidas pelo Viveiros Flora Brasil Ltda. (Araguari, MG, Brasil). As sementes tiveram os tegumentos removidos com auxílio de uma mini-morsa (Otoni et al., 2007; Reis et al., 2007), em seguida, sob condições assépticas foram esterilizadas (Vieira et al., 2018). Dez sementes foram inoculadas em cada frasco (250 mL de capacidade), contendo 60 mL de meio MS semi-sólido (Murashige & Skoog, 1962), macro e micronutrientes (1/2 MS), complexo vitamínico MS, 1,5% (p/v) de sacarose, 0,01% (p/v) de mio-inositol, e 0,25% (p/v) de agente gelificante Phytigel[®] (Sigma Chemical Company, EUA). O pH do meio de cultivo foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e autoclavado a 120 °C, 1,1 Pa por 20 minutos. Os frascos foram vedados com tampa rígida de prolipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas porosas de 0,45 µm (Milliseal[®], AVS-045 Air Vent, Japão). As culturas foram mantidas em sala de crescimento no escuro à temperatura de 25 ± 2 °C, por 15 dias iniciais, seguido da transferência para ambiente iluminado, com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 15 dias.

A transformação genética foi realizada segundo a metodologia descrita por Otoni et al. (2007), com modificações. A cepa AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens* com a construção para superexpressão do *miR156* (*OE::156*) e portadora de genes de resistência à Higromicina (hpt) e ao herbicida Norflurazon, foi crescida em meio LB contendo 50 mg L⁻¹ de Canamicina e Rifampicina e 100 mg L⁻¹ de Carbenicilina, sob agitação orbital (240 rpm). Atingida a densidade óptica (OD_{600nm}) de 0,45-0,5, procedeu-se à centrifugação a 3500 rpm, por 5 minutos, e ressuspendeu-se o precipitado com meio MS líquido, conforme descrito anteriormente, acrescido de 100 µM de Acetoseríngona (Sigma Aldrich, EUA).

Foram usados segmentos hipocotiledonares como explantes para obter as linhagens visando à superexpressão de *miR156*. Para tal, hipocótilos (7-8 cm comprimento) de plantas com 30 d foram excisados e dispostos em placas de Petri (90 X 15 mm) de poliestireno cristal, contendo 30-40 mL da suspensão de *A. tumefaciens*. Os hipocótilos foram então seccionados transversalmente em segmentos de 7–8 mm de comprimento, em presença de suspensão bacteriana e pré-cultivados durante 20 minutos. Após, iniciou-se a etapa de co-cultivo mediante a transferência dos explantes para condições de escuro a 25 °C, por 2 dias, em meio MS semi-sólido em força total, acrescido de 3% (p/v) de sacarose, 1,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (6-BA), complexo vitamínico MS, 0,01% (p/v) de mio-inositol e acrescido com 0,6% (p/v) de ágar

(Phytotechnology Lab, EUA). Logo após, os explantes foram submetidos a tríplice lavagem com meio MS líquido.

Os explantes foram transferidos para o meio de regeneração seletivo contendo sais MS, 3% de sacarose, 1,0 mg L⁻¹ de 6-BA, suplementado com 6 mg L⁻¹ Higromicina (Phytotechnology Lab, EUA), 3,8 mg L⁻¹ de Norflurazon (Sigma Aldrich, EUA), 300 mg L⁻¹ de Timentin (Phytotechnology Lab., EUA), e 250 mg L⁻¹ de Cefotaxima (Phytotechnology Lab., EUA). As culturas foram mantidas a 25 ± 1 °C sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de 35 µmol m⁻² s⁻¹, com recultivos regulares para meio seletivo a cada 15 dias, durante 45-60 dias. Brotos regenerados (± 6 mm) foram individualizados e transferidos para a fase de alongamento em frascos contendo meio MS sem reguladores de crescimento, suplementado com Higromicina (6 mg L⁻¹) e Norflurazon (3,8 mg L⁻¹), para a seleção *in vitro* das linhagens transgênicas e 300 mg L⁻¹ de Timentin para suprimir o crescimento da *Agrobacterium*.

Clonagem e aclimatização das plantas

Três linhagens transgênicas de *P. edulis* superexpressando *miR156*, denominadas P3, P5 e P7 e uma não-transgênica (NT) foram clonadas *in vitro*, utilizando-se como explantes ápices caulinares e segmentos nodais. Os explantes foram cultivados em meio MS, suplementado de 3% (p/v) de sacarose, 0,25 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (AIB), complexo vitamínico MS, 0,01% (p/v) de mio-inositol e 0,6% (p/v) de ágar (Phytotechnology Lab, EUA), sob fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro) e irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹ durante 30 d. Quatro repetições de cada linhagem de plantas com 8 ± 2 cm foram aclimatizadas e transferidas para casa de vegetação em vasos plásticos (5L) contendo substrato comercial Tropostrato[®] (Vida Verde Indústria e Comércio de Insumos Orgânicos Eireli, Mogi-Mirim, SP). O processo de aclimatização e transferência para casa de vegetação foi realizado três vezes, com diferença de 12 dias entre as transferências e quatro plantas de cada linhagem por vez, totalizando 12 repetições de cada linhagem. As plantas foram irrigadas diariamente e mantidas sob fotoperíodo de 12/12h (dia/noite) e temperatura de 25/16°C (dia/noite).

Para caracterizar os efeitos da superexpressão de *miR156* em *Passiflora edulis*, durante o seu desenvolvimento vegetativo foram realizadas análises morfoanatômicas, hormonais e de expressão gênica em folhas monlobadas, bilobadas e trilobadas em expansão (3º fitômero ápice-base) e gavinhas de plantas não-transgênicas e transgênicas superexpressando *miR156*.

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas de biossegurança estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) do Instituto de Biotecnologia

Aplicada à Pesquisa Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. As avaliações experimentais foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTII) o qual possui Certificado de Qualidade de Biossegurança (CQB) vigente, sob número 0024/97, concedido pela CTNBio.

Extração de DNA e análise de PCR

Para caracterização genotípica das plantas transgênicas em casa de vegetação, 100 mg de folhas maceradas em nitrogênio líquido foram submetidas a extração de DNA, conforme Doyle e Doyle (1987), com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 2% em tampão CTAB. A integridade e qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose (Ludwig Biotecnologia, Alvorada, RS, Brasil) a 1,5% (p/v). Posteriormente, foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific). Para reação de PCR foram utilizados 2,0 µL de DNA, 2,5 µL de tampão, 0,75 µL de Mg, 0,5 µL dNTPs, 0,25 µL de cada *primer* (HPTII vogel R e HPTII vogel F), 0,2 µL de Taq DNA polimerase Platinum High Fidelity® (Invitrogen) e 18,65 µL de água MiliQ®. A reação foi realizada em termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad): desnaturação a 95 °C, seguido de 35 ciclos a 95°C (1 min), 65 °C (0:30 min), 72 °C (2 min) e extensão final a 72 °C (5 min). As sequências de primers utilizados estão listados na Tabela 1.

Avaliação da estabilidade genética de linhagens transgênicas superexpressando miR156 via citometria de fluxo

A avaliação da estabilidade genética das plantas foi realizada no Laboratório de Genética e Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). O conteúdo relativo de DNA foi obtido com auxílio de um citômetro de fluxo a partir de tecido foliar de linhagens transgênicas e não-transgênicas. Suspensões de núcleos de folhas jovens foram preparadas por meio da picagem de cerca de 25-30 mg de folhas jovens com uma lâmina de aço descartável, conforme Galbraith et al. (1983), em tampão de isolamento WPB (Loureiro et al., 2007). A suspensão gerada foi filtrada em membrana de náilon com malha de 30 µm, para a remoção de fragmentos de células e restos de tecidos, e colocada em tubos de poliestireno. Posteriormente foram adicionados 25 µL (1 mg mL⁻¹) de iodeto de propídio (Sigma Chemical Company, EUA) e 5 µL (1 mg mL⁻¹) de RNase (Amresco, EUA) para corar o DNA. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, EUA). Foram realizadas três repetições e, pelo menos, 10.000 núcleos

foram analisados para a quantificação da emissão da fluorescência. Como padrão interno, utilizou-se *Pisum sativum* ($2C = 9,09$ pg de DNA nuclear) (Doležel et al., 1998). Os histogramas foram gerados e analisados pelo programa CytExpert 2.0.1 e o conteúdo de DNA (pg) foi calculado de acordo com Doležel & Bartoš (2005) e Doležel et al. (2007).

Caracterização fenotípica de linhagens transgênicas superexpressando miR156

Foram avaliados os seguintes aspectos morfológicos previamente descritos para outras espécies superexpressando *miR156*: altura das plantas, número de fitômeros, índice de ramificação (razão entre o comprimento total da ramificação lateral e do eixo principal da planta, conforme Morris et al. (2001)). Outras características morfológicas particulares de *P. edulis*, como padrão heteroblástico foliar, ocorrência de nectários extraflorais e gavinhas também foram avaliados.

Determinação do crescimento foliar e da gavinha em linhagens transgênicas superexpressando miR156

O crescimento em comprimento e largura de folhas monolobadas, bilobadas e trilobadas foram avaliados a cada três dias, durante um período de 30 dias após a emergência do primórdio foliar. O crescimento em comprimento de gavinhas foi mensurado a cada dois dias durante 30 dias após a emergência - padronizou-se o tamanho inicial da gavinha em $2 \pm 0,5$ cm. Foi determinado também o crescimento médio de todas as gavinhas aos 70 dias em casa de vegetação. Os parâmetros de crescimento foram descritos através de função sigmoidal.

Caracterização anatômica de linhagens transgênicas superexpressando miR156

Fragmentos de folhas monolobadas, bilobadas e trilobadas completamente expandidas e de gavinhas (porção apical e basal) na fase de alongamento (2 cm) e plenamente alongadas (15 cm para as linhagens transgênicas e 30 cm para não-transgênica), foram fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4%, tampão cacodilato a pH 7,2), acrescido de cloreto de cálcio a 5 mM (Karnovsky, 1965, modificado). As amostras foram desidratadas em série etílica crescente (10%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e duas vezes em 100%), por uma hora em cada etapa, seguida da inclusão em metacrilato (Historesin[®], Leica, Nussloch, Germany). A inclusão do material foi realizada em solução de resina pura com solução endurecedora por 72 h a 40°C.

Com o auxílio de um micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA), foram obtidos secções seriadas transversais (folhas) e longitudinais (gavinhas) com 5 µm de espessura. Os cortes foram dispostos em lâminas e corados com azul de Toluidina (O'Brien & McCully, 1981) pH 4,0 por 10 min. Posteriormente, montadas em resina sintética Permount (Fisher Scientific, EUA). As observações e captura das imagens foram realizadas no microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Japão) com câmera digital acoplada (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA).

Diafanização

Para a determinação da densidade estomática, fragmentos da região apical, mediana e basal de folhas monolobadas, bilobadas e trilobadas completamente expandidas foram desidratadas em etanol 50% e diafanizadas, utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 5% (pernoite), seguido de clarificação com hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, até completa descoloração do material vegetal. Posteriormente as folhas foram lavadas três vezes em água destilada e coradas com fucsina alcoólica 50%. As lâminas foram montadas em Permount, observadas e fotografadas com auxílio um fotomicroscópio AX70TRF (Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com sistema U-Photo. A contagem das células estomáticas foi realizada com o auxílio do programa ImageJ (Schneider et al., 2012), posteriormente foi calculado a densidade estomática (nº de estômatos por área).

Determinação do perfil hormonal

Para a quantificação dos níveis hormonais endógenos de AIA (ácido indol-3-acético), Zeatina, ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano, reflete os níveis endógenos de etileno), ABA (ácido abscísico), JA (ácido jasmônico) e SA (ácido salicílico), cerca de 110 mg de folhas em expansão (3º fitômero ápice-base) de plantas aos 20 dias de cultivo em casa de vegetação foram macerados em nitrogênio líquido e adicionado 300 µL de solução extratora (metanol:isopropanol:ácido acético 20:79:1) em microtubo de 1,5 mL. Logo após, as amostras foram agitadas em vórtex (4 vezes por 20 segundos), sonicadas por 5 min e mantidas no gelo por 30 min. Após a centrifugação (13000 g, 10 min a 4°C), 350 µL do sobrenadante foram coletados para um novo microtubo. O processo de extração foi repetido sob o *pellet* resultante, e o sobrenadante coletado. Foi utilizado LC-MS/MS (Agilent 1200 Infinity Series) acoplado ao espectrômetro de massa tipo triplo quadrupolo- QqQ (6430 Agilent Technologies) para a identificação e quantificação hormonal, de acordo a Napoleão et al. (2017).

Extração de RNA e síntese de cDNA via ‘pulsed-stem loop’ RT-qPCR

O RNA total de folhas em expansão e secções de gavinhas com 2 cm, 6 cm, 12 cm (± 1), foram isolados com solução TRI-Reagent[®] (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e tratado com DNase I (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A quantificação do RNA foi realizada com auxílio do NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies[™]) e a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (*RNAse free*). Para análise dos níveis de expressão de *miR156*, *miR172* e *SPL9* o cDNA foi sintetizado de acordo a metodologia *Pulsed stem-loop* RT-qPCR (Varkonyi-Gasic et al., 2007).

Análise de RT-qPCR

Os perfis de expressão de *miR156*, *miR172* e *SPL9* foram analisados via *RT-qPCR*, a partir de 20 ng de cDNA, 400 nM de cada primer (Síntese Biotecnologia Ltda, Belo Horizonte, MG), e qPCR SYBR- Green Supermix (Bio- Rad) e água bidestilada (ddH₂O) para um volume final de reação 10 μ L. O perfil de expressão foi analisado em sistema de PCR em tempo real CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD). Os níveis de expressão foram calculados em relação ao gene normalizador *actina* (*PeACT*), utilizando o método $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Os primers utilizados estão listados na Tabela 1.

Análises estatísticas

Para as variáveis altura das plantas, número de fitômeros, índice de ramificação, dinâmica de crescimento das gavinhas e crescimento médio final foram utilizadas seis repetições para cada linhagem. Para as análises de crescimento foliar, densidade estomática e níveis hormonais utilizaram-se quatro repetições. A adequação de curvas sigmoidais e construção de gráficos foram realizadas com o auxílio do programa Sigmaplot[®] versão 12.5. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e suas médias comparadas pelo teste de Tukey ou teste Scott-Knott, ambos a 5% de significância. Para avaliação da estabilidade genética e expressão gênica três repetições foram utilizadas, e o teste de Dunnett a 1% de significância foi aplicado.

RESULTADOS

Confirmação de linhagens transgênicas superexpressando miR156

A transgenia das linhagens utilizadas nesse estudo (P3, P5 e P7), as quais superexpressam *miR156* via indução por promotor constitutivo pUbi10 (*Ubi10::AtmiR156a*), foram confirmadas, a partir da detecção de bandas que indicam a presença do gene *HPTII* que confere resistência a higromicina (Figura 1).

Estabilidade genética de linhagens transgênicas superexpressando miR156 via citometria de fluxo

O evento não transgênico apresentou conteúdo de DNA de 3,38 pg, ao passo que as linhagens transgênicas apresentaram valores médios de 3,49 pg (P3), 3,59 pg (P5) e 3,61 pg (P7), com média de 3,56 pg de DNA. Os coeficientes de variação das leituras foram todos inferiores a 3,0%. Em adição, os histogramas obtidos das linhagens transgênicas *OE::miR156* mostraram o mesmo padrão do conteúdo de DNA de plantas não-transgênicas (Tabela 2, Figura 2). Diante disso, não houve alteração no nível de ploidia das linhagens transgênicas P3, P5 e P7 durante o processo de regeneração desta, que envolveu organogênese *de novo* em meio MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de 6-BA.

Caracterização fenotípica de linhagens transgênicas superexpressando miR156

A superexpressão do *miR156* em *P. edulis* modificou drasticamente a arquitetura vegetativa de todas as linhagens transgênicas *OE::miR156* (P3, P5 e P7) demonstrando crescimento similar a um arbusto (Figura 3 a), menor altura e maior número de fitômeros quando comparado a linhagem não-transgênica (NT) (Figura 3 b-c). O tempo de emergência das gavinhas também foi afetado nas linhagens transgênicas. Em plantas NT a gavinha surgiu entre o sétimo e décimo fitômeros, enquanto que nas linhagens transgênicas a emergência da gavinha foi atrasada, sendo visualizada, de modo geral, a partir do décimo nono fitômero (Figura 3 d). Além disso, houve marcante perda da inibição correlativa nas linhagens transgênicas, o que levou aumento de brotações a partir de gemas axilares, acarretando aumento no índice de ramificação em todas as linhagens transgênicas (Figura 3 d-e). Vale ressaltar que, a linhagem NT apresentou botões florais após 80 dias em casa de vegetação, caracterizando a fase adulta-reprodutiva. Entretanto, não foi observado em nenhuma linhagem transgênica *OE::miR156* a presença de estruturas reprodutivas.

Em linhagens transgênicas *OE::miR156* a lâmina foliar apresentou-se com formato ovalado e os lobos de folhas bilobadas e trilobadas ocorreram de forma sutil (Figura 4). O serrilhamento nas margens das folhas de linhagens transgênicas foi observado na região basal, próximo ao pecíolo, e na extensão da margem foliar este se apresentou com a estrutura comprometida (Figura 5 a-b). Além disso, durante o desenvolvimento de *P. edulis*, folhas monolobadas, bilobadas e trilobadas são subsequentes na fenologia das plantas, à medida que os fitômeros se desenvolvem. No entanto, esse padrão sucessivo de folhas ao longo dos fitômeros não foi observado em linhagens transgênicas *OE::miR156*, por exemplo, após uma folha trilobada havia uma folha monolobada ou bilobada.

Nectários extraflorais localizados na base da folha, junto à parte distal do pecíolo (nectários peciolares) estavam presentes em folhas de todas linhagens transgênicas *OE::miR156* e NT (Figura 5 c,d). Em contrapartida, nectários localizados nas lâminas das folhas (nectários foliares) bi/trilobadas foram comprometidos nas linhagens transgênicas (Figura 5 e-f).

Dinâmica do crescimento foliar e da gavinha em linhagens transgênicas superexpressando miR156

A superexpressão de *miR156* afetou a dinâmica de crescimento foliar em *P. edulis*. O crescimento em comprimento das folhas monolobadas, bilobadas e trilobadas de todas as linhagens transgênicas apresentaram-se menores que NT (Figura 6 a, c, e). Em relação ao crescimento em largura, apenas as folhas bilobadas e trilobadas das linhagens transgênicas apresentaram menor crescimento quando comparadas a NT, sendo que, essa diferença foi mais proeminente em folhas trilobadas (Figura 6 b, d, f). Destaque-se que P3, P5 e P7 não apresentaram diferenças no crescimento foliar entre si. O crescimento das folhas (comprimento e largura) se manteve estável após 15 dias depois da emergência do primórdio foliar para todas as linhagens aqui estudadas.

A estrutura das gavinhas de linhagens transgênicas superexpressando miR156 apresentou-se, independente do estágio de desenvolvimento, mais delgadas e menores quando comparadas com gavinhas NT (Figura 7 a-d). O crescimento em comprimento das gavinhas, de todas as linhagens transgênicas *OE::miR156*, apresentou-se inferior a linhagem NT (Figura 7 e), sendo que o comprimento médio de gavinhas plenamente alongadas NT foi aproximadamente duas vezes maior que em todas as linhagens transgênicas (Figura 7 f). O

crescimento das gavinhas manteve-se sem grandes modificações, após 8 dias, independente da linhagem.

Caracterização anatômica de folhas e gavinhas de linhagens transgênicas superexpressando miR156

A nervura central apresenta-se biconvexa, a qual apresenta camadas de células colenquimáticas em ambas as faces, sendo que na face abaxial observa-se 3 camadas (Figura 8 a,e, i). Em contraste, nas linhagens transgênicas *OE::miR156* foi observado apenas 2 camadas de células colenquimáticas (Figura 8 b, f, j). O parênquima paliçádico da lâmina foliar é formado por uma camada de células, ocupando em torno de um terço do mesofilo, enquanto que o parênquima lacunoso é formado por 4 a 5 camadas de células na região abaxial (Figura 8 c-d, g-h, k-l). A superexpressão de *miR156* parece não afetar drasticamente a organização dos tecidos em folhas de *P. edulis*, pois todas elas, independente da morfologia, seguem o mesmo padrão anatômico.

O crescimento das gavinhas e sua estrutura foi afetado pela superexpressão de *miR156* em *P. edulis*. Observou-se que gavinhas em expansão tanto de linhagens NT quanto transgênicas apresentaram células menores, mais compactadas e com núcleos proeminentes, tanto na região apical quanto basal (Figura 9 a-d). Além disso, divisões celulares em vários pontos dessas regiões também foram observadas. Em gavinhas plenamente alongadas NT foram observadas na região apical 6 a 7 camadas de células compondo o parênquima cortical, e na região basal 9 a 10 camadas (Figura 9 e, g). Porém, o número de camadas de células do córtex foi menor em gavinhas plenamente alongadas de todas as linhagens transgênicas superexpressando *miR156*. Na região apical foi observado de 3 a 4 camadas de células (Figura 9 j-l) e na região basal de 6 a 7 camadas (Figura 9 f-h). Essa diferença entre as camadas de células do parênquima cortical das linhagens NT e transgênicas pode ser observada tanto em gavinhas em processo de alongamento quanto em gavinhas plenamente alongadas.

Efeito da superexpressão de miR156 na densidade estomática

A densidade estomática de folhas monlobadas de todas as linhagens transgênicas *OE::miR156* foi menor que na linhagem NT (Figura 10 a). Em folhas bilobadas apenas a linhagem P7 diferiu significativamente, quando comparadas à NT e P3 (Figura 10 b). Em folhas trilobadas, a densidade estomática diferiu em todas as linhagens transgênicas em relação a NT, sendo que, a P7 apresentou menor densidade entre as linhagens transgênicas (Figura 10 c).

Perfil hormonal de linhagens transgênicas superexpressando miR156

Os níveis de AIA foram altos em todas as linhagens transgênicas *OE::miR156*, quando comparado a NT (Fig. 11 a). Os níveis de zeatina foram menores na linhagem P5 e não apresentou diferenças significativas entre as demais linhagens. (Figura 11 b). Os níveis de ACC diferiu significativamente apenas na linhagem P5 (Figura 11 c). Os níveis de JA e SA foram significativamente mais baixos em todas as linhagens transgênicas (Figura 11 d, e). Por fim, os níveis de ABA diferiram significativamente entre as linhagens NT e transgênicas, sendo que P3 apresentou maiores níveis em relação às linhagens P5 e P7 (Figura 11 f).

Dinâmica da expressão de miR156, SPL9 e miR172 em folhas de linhagens transgênicas superexpressando miR156

Em folhas monolobadas, os níveis de expressão de *miR156* nas linhagens P3 e P5 foram inferiores a NT e P7 não apresentou diferenças significativas (Figura 12 a). Em contrapartida, folhas bilobadas das linhagens P5 e P7 apresentaram altos níveis de expressão de *miR156* quando comparado a NT (Figura 12 c). Os níveis de expressão de *miR156* em folhas trilobadas foi significativamente maior em todas as linhagens transgênicas *OE::miR156* quando comparado a NT, sendo aproximadamente seis vezes mais expresso (Figura 12 e). Os níveis de expressão do gene *SPL9*, alvo de *miR156*, foi menor em folhas monolobadas de linhagens P3 e P5 em relação a NT (Figura 12 b). Em folhas bilobadas, não houve diferenças quanto a expressão desse gene entre as linhagens NT e transgênicas (Figura 12 d). Em folhas trilobadas, apenas P3 demonstrou maior expressão de *SPL9* (Figura 12 f). O *miR172*, por sua vez, apresentou menores níveis de expressão em folhas monolobadas das linhagens P5 e P7 em relação a NT (Figura 13 a). Em folhas bilobadas, a linhagem P7 manteve baixo níveis de expressão de *miR172* e não houve diferenças significativas nas demais linhagens *OE::miR156* quando comparado a NT (Figura 13 b). Em folhas trilobadas, as linhagens P3 e P5 apresentaram menores níveis de expressão de *miR172* em relação a NT (Figura 13 c). Embora *SPL9* e *miR172* não demonstrarem um padrão de expressão consistente entre as linhagens transgênicas, notou-se que, em geral, os níveis de expressão destes nas linhagens P3, P5 e P7 apresentaram-se menores ou sem diferenças significativas quando comparado à linhagem NT. Os níveis de expressão de *miR172* apresentaram padrão oposto ao do *miR156* em todos as linhagens aqui estudadas.

Dinâmica da expressão de miR156, SPL9 e miR172 em gavinhas de linhagens transgênicas superexpressando miR156

Os níveis de expressão do *miR156* em ápices de gavinhas com 2 cm de comprimento foi maior apenas na linhagem P7 quando comparado a NT. Em contrapartida, na região basal os níveis de expressão do *miR156* foram maiores em todas as linhagens transgênicas *OE::miR156*, comparativamente a NT (Figura 14 a). Em gavinhas com 6 cm de comprimento, ambas regiões de todas as linhagens transgênicas apresentaram maiores níveis de expressão de *miR156* quando comparado a NT (Figura 14 c). Esse mesmo comportamento foi observado em gavinhas com 12 cm de comprimento (Figura 14 e). Os níveis de expressão de *SPL9* foram baixos em todas as linhagens transgênicas, independente da região ou tamanho da gavinha. A expressão do *miR172* na região apical de gavinhas com 2 cm diferiu apenas na linhagem P5 em comparação com NT (Figura 15 a). Em relação a região basal, os níveis de expressão desse miRNAs foi menor em todas as linhagens transgênicas. Em gavinhas com 6 cm, não houve diferenças significativas entre os níveis de expressão do *miR172* nos ápices, porém, na região basal a linhagem P7 apresentou menor nível de expressão (Figura 15 b). Gavinhas com 12 cm não apresentaram diferenças significativas nos níveis de expressão do *miR172* em nenhuma das regiões avaliadas (Figura 15 c).

Em plantas NT a expressão do *miR156* na região apical foi maior em gavinhas com 6 cm e apresentou-se menor aos 12 cm de comprimento, em relação a gavinhas com 2 cm (Figura 16 a). Já na região basal, foi observado menor nível de expressão em gavinhas com 12 cm. Esses resultados indicam que os níveis de expressão do *miR156* reduzem com a idade da gavinha. Na linhagem P3 os níveis de expressão foram significativamente maiores em ambas regiões de gavinhas com 6 e 12 cm, em comparação com gavinhas de 2 cm (Figura 16 b). Em P5, gavinhas com 6 cm apresentaram altos níveis de expressão do *miR156*, sendo 8 vezes maiores que os demais comprimentos (Figura 16 c). Já em P7 os níveis de expressão em gavinhas com 6 e 12 cm foram maiores em ambas regiões, quando comparados com gavinhas de 2 cm (Figura 16 d).

DISCUSSÃO

As plantas progredem da fase juvenil vegetativa para adulta durante o desenvolvimento e, posteriormente, alcançam a fase reprodutiva. A caracterização e o período dessas fases diferem consideravelmente entre as espécies vegetais. O *miR156* demonstrou ser o principal regulador da transição de fases vegetativa-reprodutiva nas plantas (Wu et al., 2009; Fouracre & Poethig, 2016). Os efeitos da superexpressão do *miR156* foram descritos em diversas espécies, sendo comumente observado, alterações na arquitetura das plantas, manutenção de características jovens, aumento de brotações laterais, retardo no tempo de floração (Wei et al., 2010; Wang et al., 2011; Silva et al., 2014). Em *Passiflora edulis* foram confirmadas três linhagens transgênicas *OE::miR156*, as quais apresentaram mudanças drásticas na arquitetura das plantas como, menor altura, maior número de fitômeros, evidenciando menor comprimento dos internós e maior índice de ramificações, sugerindo perda da dominância apical (Figura 3).

A superexpressão do *miR156* afetou características particulares dentro as espécie como a redução no comprimento de raízes e repressão da nodulação em *Lotus japonicus* (Wang et al., 2015), aumento dos níveis de carotenoides em sementes de *Brassica napus* (Wei et al., 2010), melhoria no rendimento de açúcares e digestibilidade em *Panicum virgatum* (Fu et al., 2012). Durante a transição de fases vegetativa juvenil para adulta, *P. edulis* demonstra heteroblastia foliar marcante, cujas folhas à medida que avançam em fase ganham lobos bem definidos, tornando-se trilobada com margens apresentando serrilhas por toda extensão (Cutri et al., 2013; Silva et al., 2019). Linhagens transgênicas *OE::miR156* em *P. edulis* desenvolveram os três padrões foliares. Porém, foi observado formação de lobos sutis em folhas bilobadas e trilobadas (Figura 4), serrilhamento incompleto nas margens e nectários diminutos nas lâminas foliares (Figura 5). Nectários extraflorais são comumente encontrados em *Passiflora* (Rocha et al., 2020) os quais desempenham função ecológica de defesa indireta, cujo néctar alimenta insetos, principalmente formigas, que em troca protegem as plantas contra herbívoros (Heil, 2011).

A heteroblastia foliar é observada em diversas espécies do gênero *Passiflora* (Chitwood & Otoni, 2017) e pode evidenciar macroscopicamente a transição de fases vegetativa juvenil para adulta. Além disso, a heteroblastia em *P. edulis* foi correlacionada com a dinâmica do padrão de expressão de *miR156* e *miR172* durante a transição de fases vegetativa (Silva et al., 2019). Além das mudanças em algumas características das folhas de *P. edulis*, notou-se que a superexpressão de *miR156* acarretou redução do crescimento destas (Figura 6) e alterações na densidade estomática (Figura 10). Além disso, houve redução no número de camadas colenquimáticas na nervura central das folhas de todas as linhagens transgênicas (Figura 8). A

modulação dos níveis de *miR156* em *Nicotina tabacum* ocasionou mudanças peculiares nas folhas, como mudança no ângulo da base, no padrão de venação, na densidade de tricomas e estômatos. Essas mudanças na densidade de tricomas e no padrão estomático foram conectadas com alteração na expressão de alguns genes responsáveis por tais características, sugerindo a modulação desses genes pelo *miR156* (Feng et al., 2016). Em contrapartida, plantas em que a expressão do *miR156* foi suprimida, apresentaram altos níveis de expressão de *SPLs*, alvos do *miR156*, e fenótipos semelhantes àqueles de plantas não-transgênicas (Wu et al., 2009).

A transição de fase vegetativa juvenil para adulta é acompanhada pelo decréscimo na expressão do *miR156*, seguido pelo acúmulo de *SPLs*, o que conduz à fase vegetativa adulta ao proporcionar o aumento dos níveis de expressão do *miR172* (Wu et al., 2009; Yu et al., 2015; Silva et al., 2019). Apesar dos níveis do *miR156* em folhas monolobadas não se demonstrarem altos, em folhas trilobadas de todas linhagens transgênicas *OE::miR156* os níveis de expressão de *miR156* foram 6 vezes maiores comparativamente à NT (Figura 12). Por sua vez, os níveis de expressão do *miR172* nesse tipo foliar de linhagens transgênicas foram baixos ou iguais à NT (Figura 13), demonstrando padrão oposto de expressão entre esses miRNAs. Os níveis de expressão de *SPL9* não sofreu grandes alterações e se mantiveram, de forma geral, semelhantes entre as linhagens (Figura 12). Em *Arabidopsis*, *SPL9* desempenha papel majoritário em diversos processos como distribuição de tricomas, morfologia foliar e indução do florescimento (Wu et al., 2009; Yu et al., 2010; Jung et al., 2011; Yu et al., 2015). Além disso, *SPL9* promove a desestabilização do complexo CUC2-TCP (*CUP-SHAPED COTYLEDON* e *TEOSINTE BRANCHED 1 / CYCLOIDEA / PCF*, respectivamente), proporcionando o serrilhamento das folhas e o aumento do número de folíolos à medida que o processo heteroblástico progride (Chitwood & Sinha, 2014; Rubio-Somoza et al., 2014).

Silva et al. (2019) não observaram alterações nos níveis de transcritos de *SPL9* em decorrência da redução da expressão do *miR156* durante o processo heteroblástico em *P. edulis*. Em *O. sativum* foi relatado que a superexpressão do *miR156* provocou a redução de seis genes *SPLs*, mas outros três genes alvos não apresentaram alterações na expressão (Xie et al., 2006). Sabe-se que a família de genes *SPLs* possuem alto grau de redundância funcional em diversos processos durante o desenvolvimento vegetal (Wu et al., 2009). Baseado no fenótipo das folhas de linhagens transgênicas *OE::miR156*, é sugestivo que *SPL9* não seja o fator dominante que regula as características adultas em *P. edulis*, pelo menos no que diz respeito a caracteres foliares. As modificações fenotípicas observadas na arquitetura das plantas e nas folhas de linhagens *OE::miR156* em *P. edulis* retrataram o padrão de expressão de *miR156* e *miR172*,

bem como a complexa regulação da via miR156/SPLs, pois apesar da tentativa de formar lobos nas folhas, sendo este considerado um traço adulto, essa ação em algum momento do curso foi interrompida. No entanto, como relatado para *P. virgatum* as diversas alterações fenotípicas dependem do quanto *miR156* está sendo (sobre)expresso (Fu et al., 2012).

Diversos estudos têm demonstrado que há uma interação complexa entre miRNAs e fitormônios. A exemplo, a floração em *Arabidopsis* pode ser promovida por GA através de uma via dependente de miR156 (Yu et al., 2012). Os níveis de expressão do *miR156* e *miR172* também podem responder a tratamentos com fitormônios. Em *Arabidopsis*, o tratamento com auxina reduziu os níveis de expressão do *miR156* em raízes (Marin et al., 2010). Já em *O. sativa*, apesar dos níveis do *miR156b* não demonstrarem alterações em tratamentos com diferentes fitormônios, *miR172a* teve seus níveis reduzidos quando submetidos a 6-benzilaminopurina - 6-BA, um tipo de citocinina sintética (Liu et al., 2009). Por outro lado, há evidências de que os miRNAs podem regular a via de sinalização que medeia a resposta a fitormônios através da regulação de FTs, receptores hormonais ou genes diretamente envolvidos na biossíntese destes (Liu et al., 2009; Curaba et al., 2014) e que SPLs, alvo do *miR156*, podem interagir com reguladores da via de sinalização de fitormônios (Yu et al., 2012; Zhang et al., 2015). Detectou-se diferenças significativas nos níveis de AIA (Figura 11). Para a zeatina não foram detectadas diferenças significativas entre as linhagens transgênicas e NT, à exceção da linhagem P5, que apresentou níveis significativamente menores. Zhang et al. (2015) também não observaram diferenças nos níveis de citocinina em *Arabidopsis* não-transgênicas e superexpressando *miR156*, e sugeriram que *miR156* não modula os níveis de citocinina, mas a resposta, através de fatores de transcrição ARRs- tipo B. Diversas espécies superexpressando *miR156*, senão todas, apresentaram modificações na sua arquitetura vegetativa e aumento no número de brotações laterais, indicando perda da inibição correlativa; sabe-se que auxinas e citocininas agem antagonicamente nesse mecanismo. Estudos anteriores sobre o controle de crescimento do arroz (*Oryza sativa*) demonstrou que *SPL14*, alvo do *miR156*, e estrigolactonas atuam em vias paralelas na regulação do perfilhamento nessa espécie (Luo et al., 2012). Além disso, Chen et al. (2015) relataram que o aumento dos níveis de expressão do *miR156* interferiu na regulação da via de estrigolactonas em *O. sativa* desencadeando alteração na arquitetura e no perfilhamento das plantas. Esse estudo sugere que *miR156* controla o número de brotações e a dominância apical através da regulação da via de estrigolactonas.

Os níveis de JA, SA e ABA foram baixos em linhagens *OE::miR156* (Figura 11), sugerindo que a superexpressão de *miR156* afeta negativamente os níveis endógenos desses

fitormônios em *P. edulis*. A sinalização de JA, SA e ABA têm sido associados à defesa e resposta a estresse. Além disso, estes fitormônios também estão envolvidos na promoção da senescência foliar, cujos níveis apresentaram-se elevados durante o processo (Khan et al., 2013). O *miR172* foi associado ao controle do processo de senescência foliar no milho (*Zea Mays*), o qual pode regular o processo através da via dos fitormônios (Wu et al., 2016). Qiu et al. (2009) demonstraram que a aplicação de metil jasmonato (MeJa) em células de *Taxus chinensis* alterou a abundância de quatro membros da família do miR156 (*miR156a/b/c e d*), cujos níveis de expressão foram reduzidos. Em adição, um estudo sobre a dinâmica de resistência a patógenos mediada pela idade da planta demonstrou que o aumento dos níveis de *SPL9*, alvo de *miR156*, reduz a resposta a JA através da interação com proteínas do domínio JA ZIM (JAZ) (Mao et al., 2017). Em *Arabidopsis* superexpressando *miR156*, os níveis de transcritos de genes associados a via de sinalização de SA apresentaram-se baixos, em contrapartida, os níveis desses transcritos foram altos em plantas superexpressando *SPL9*, sugerindo que *miR156/SPL9* pode modular a via de sinalização de SA (Yin et al., 2019).

A superexpressão do *miR156* em *P. edulis* também impactou o desenvolvimento de gavinhas. As gavinhas são consideradas marcadores de transição para a fase adulta em *P. edulis*, visto que, o meristema localizado nas axilas das folhas com traços adultos são capazes de gerar tanto gavinha quanto flor (Cutri et al., 2013). No entanto, hipóteses sobre a origem dessa estrutura são controversas, sendo que, às vezes são interpretadas como um ramo caulinar e outras como uma modificação da inflorescência (Cutri et al., 2013; Scorza et al., 2017; Sousa-Baena et al., 2018a). Além disso, informações sobre a regulação gênica no desenvolvimento desta ainda são incipientes. A superexpressão de *miR156* retardou a aparição das gavinhas comprometeu o crescimento e modificou sua estrutura, as quais apresentavam-se mais delgadas (Figura 7). Essa mudança na estrutura do corpo vegetativo da gavinha pode ser decorrente da redução de camadas de células do parênquima cortical (Figura 9). As gavinhas possuem papel ecológico importante, permitindo a evasão à sombra e aumentando o potencial de competição por luz, fornecendo a espécie vantagem adaptativa (Cutri et al., 2013). Já que o desenvolvimento de flores em *P. edulis* não ocorre em ambientes sombreados (Nave et al., 2010) a gavinha se torna fundamental ao favorecer o desenvolvimento floral em ambientes de vegetação densa.

Investigou-se os níveis de expressão do *miR156*, *SPL9* e *miR172* da região basal e apical de gavinhas em diferentes fases de alongamento. A expressão do *miR156* em gavinhas de plantas transgênicas foi significativamente alta tanto no ápice quanto na base, e sua abundância

foi elevada com o aumento do comprimento das gavinhas (Figura 14). Os altos níveis de expressão de *miR156* refletiu sobre *SPL9* que demonstrou padrão oposto de expressão, sugerindo que o desenvolvimento de gavinhas pode ser modulado pela via *miR156/SPL*. Estudos sobre a regulação de características adultas em órgão vegetais, têm considerado a família de genes *SPLs* reguladores chaves na aquisição de características adultas (Shikata et al., 2009), entre os quais se destaca o *SPL 9*, sendo este um forte candidato na promoção da maioria dos traços associados à fase adulta (Wu et al., 2009). Por outro lado, os níveis de expressão do *miR172* diferiu apenas entre linhagens de gavinhas mais jovens, porém, não demonstrou grandes modificações (Figura 15). No entanto, o incremento na expressão do *miR172* está correlacionada com *SPL9*, que atua como um regulador transcricional de *miR172b* (Wu et al., 2009; Jung et al., 2011). Além disso, o padrão de expressão do *miR156* entre os comprimentos das gavinhas revelou que a abundância desse miRNAs dependente da idade desta (Figura 16).

Estudos moleculares visando confirmar a origem ontogenética de gavinhas na família *Passifloraceae*, detectaram a expressão de genes envolvidos na transição de fases vegetativa/reprodutiva e na identidade de meristema floral, tais como *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (API)*, *FRUITFULL (FUL)* e *SEPALLATA 3 (SEP3)*. A expressão de *LFY* e *SEP3* foi demonstrado em primórdios de gavinhas (Cutri, 2009; Sousa-Baena et al., 2018a), enquanto que os níveis de *API* mantém sua expressão durante todo desenvolvimento da gavinha, além disso, seu nível de expressão é maior nestas que em qualquer outro tecido, como botões florais e brácteas (Scorza et al., 2017). *FUL* também foi expresso em gavinhas, mas não apresentou expressão diferencial como *API* (Scorza et al., 2017). Ainda não está claro a função desses genes durante o desenvolvimento da gavinha. Entretanto, há evidências de que o *SPL3* juntamente com outros genes da família de fatores de transcrição *SPLs* atuem na regulação de *LFY*, *API*, *FUL* (Yamaguchi et al., 2009).

CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que a superexpressão de *miR156* desencadeou uma rede de regulação gênica global em *P. edulis*, ocasionando mudanças nas características morfoanatômicas, metabólicas e gênicas. Como relatado para outras espécies, a arquitetura das plantas foi afetada pela superexpressão de *miR156* em todas as linhagens transgênicas aqui estudadas. No entanto, observamos efeitos não visualizados para outras espécies como a formação tênue de lobos em folhas que demonstraram um misto de características juvenis e adultas e o comprometimento de nectários na lâmina foliar. Considerando a diversidade funcional dos genes da família de FTs SPLs, é possível que estes desempenhem um papel regulatório na formação de nectários extraflorais. Os níveis endógenos de JA, SA e ABA nas linhagens transgênicas *OE::miR156* apresentaram-se baixos, sugerindo que a via miR156/SPL modula os níveis destes fitormônios. O crescimento e a morfologia de gavinhas também foram afetados pela superexpressão de *miR156*, sugerindo a atuação dos *miR156/172* e SPLs no desenvolvimento desses órgãos, visto que, o crescimento das gavinhas foi correlacionado com a dinâmica de expressão destes. Este trabalho contribui para expandir a compreensão dos efeitos da superexpressão de *miR156* em *P. edulis* e fornece informações sobre a atuação de *miR156* sobre os aspectos morfo-fisiológicos durante a transição de fases vegetativa juvenil para adulta.

REFERÊNCIAS

- Bäurle I, Dean C** (2006) The timing of developmental transitions in plants. *Cell* **125**: 655–664
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O** (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* (80) **320**: 1185–1190
- Chen Z, Gao X, Zhang J** (2015) Alteration of *osa-miR156e* expression affects rice plant architecture and strigolactones (SLs) pathway. *Plant Cell Rep* **34**: 767–781
- Chitwood DH, Otoni WC** (2017) Divergent leaf shapes among *Passiflora* species arise from a shared juvenile morphology. *Plant Direct* **1**: e00028
- Chitwood DH, Sinha NR** (2014) Plant development: Small RNAs and the metamorphosis of leaves. *Curr Biol* **24**: R1087–R1089
- Curaba J, Singh MB, Bhalla PL** (2014) miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *J Exp Bot* **65**: 1425–1438
- Cutri L, Nave N, Ami M Ben, Chayut N, Samach A, Dornelas MC** (2013) Evolutionary, genetic, environmental and hormonal-induced plasticity in the fate of organs arising from axillary meristems in *Passiflora* spp. *Mech Dev* **130**: 61–69
- Cutri L** (2009) Estudos da função do gene *LEAFY (LFY)* em duas espécies de *Passiflora*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J** (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc* **2**: 2233–2244
- Doležel J, Bartoš J** (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.* 99–110
- Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysák MA, Nardi L, Obermayer R** (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Ann Bot* **82**: 17–26
- Doyle JJ, Doyle JL** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* **19**:11-15

- Feng S, Xu Y, Guo C, Zheng J, Zhou B, Zhang Y, Ding Y, Zhang L, Zhu Z, Wang H, Wu G** (2016) Modulation of miR156 to identify traits associated with vegetative phase change in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *J Exp Bot* **67**: 1493–1504
- Fouracre JP, Poethig RS** (2019) Role for the shoot apical meristem in the specification of juvenile leaf identity in Arabidopsis. *PNAS* **116**:10168-10177
- Fouracre JP, Poethig RS** (2016) The role of small RNAs in vegetative shoot development. *Curr Opin Plant Biol* **29**: 64–72
- Fu C, Sunkar R, Zhou C, Shen H, Zhang J-Y, Matts J, Wolf J, Mann DGJ, Stewart CN, Tang Y, Wang ZY** (2012) Overexpression of miR156 in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) results in various morphological alterations and leads to improved biomass production. *Plant Biotechnol J* **10**: 443–452
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E** (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220**: 1049–1051
- Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J** (2008) Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* **418**: 1–8
- Heil M** (2011) Nectar: Generation, regulation and ecological functions. *Trends Plant Sci* **16**: 191–200
- Huijser P, Schmid M** (2011) The control of developmental phase transitions in plants. *Development* **138**: 4117–4129
- Jung JH, Seo PJ, Kang SK, Park CM** (2011) miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the *SPL3/4/5* genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Mol Biol* **76**: 35–45
- Jung JH, Seo YH, Pil JS, Reyes JL, Yun J, Chua NH, Park CM** (2007) The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2736–2748
- Khan M, Rozhon W, Poppenberger B** (2013) The role of hormones in the aging of plants - A mini-review. *Gerontology* **60**: 49–55

- Karnovsky, MJ** (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* **27**: 137–138
- Khraiwesh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R, Frank W** (2010) Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* **140**: 111–122
- Levy A, Szwerdszarf D, Abu-Abied M, Mordehaev I, Yaniv Y, Riov J, Arazi T, Sadot E** (2014) Profiling microRNAs in *Eucalyptus grandis* reveals no mutual relationship between alterations in miR156 and miR172 expression and adventitious root induction during development. *BMC Genomics* **15**: 524
- Liu Q, Zhang Y-C, Wang C-Y, Luo Y-C, Huang Q-J, Chen S-Y, Zhou H, Qu L-H, Chen Y-Q** (2009) Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Lett* **583**: 723–728
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**: 402–408
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C** (2007) Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Ann Bot* **100**: 875–888
- Luo L, Li W, Miura K, Ashikari M, Kyojuka J** (2012) Control of tiller growth of rice by *OsSPL14* and strigolactones, which work in two independent pathways. *Plant Cell Physiol* **53**: 1793–1801
- Mao YB, Liu YQ, Chen DY, Chen FY, Fang X, Hong GJ, Wang LJ, Wang JW, Chen XY** (2017) Jasmonate response decay and defense metabolite accumulation contributes to age-regulated dynamics of plant insect resistance. *Nat Commun* **8**: 1–13
- Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A** (2010) mir390, *Arabidopsis TAS3* tasiRNAs, and their *AUXIN RESPONSE FACTOR* targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell* **22**: 1104–1117
- Morea EGO, Silva EM, Silva GFF, Valente GT, Barrera Rojas CH, Vincentz M, Nogueira FTS** (2016) Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants. *BMC Plant Biology* doi: 10.1186/s12870-016-0716-5
- Morris SE, Turnbull CGN, Murfet IC, Beveridge CA** (2001) Mutational analysis of

branching in Pea. Evidence that *Rms1* and *Rms5* regulate the same novel signal. *Plant Physiol* **126**: 1205–1213

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

Napoleão TA, Soares G, Vital CE, Bastos C, Castro R, Loureiro ME, Giordano A (2017) Methyl jasmonate and salicylic acid are able to modify cell wall but only salicylic acid alters biomass digestibility in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Sci* **263**: 46–54

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

Nogueira FTS, Madi S, Chitwood DH, Juarez MT, Timmermans MCP (2007) Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes Dev* **21**: 750–755

O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: Termarcaphi Pty. 357p.

Ostria-Gallardo E, Ranjan A, Chitwood DH, Kumar R, Townsley BT, Ichihashi Y, Corcuera LJ, Sinha NR (2016) Transcriptomic analysis suggests a key role for *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE*, *NAC* and *YUCCA* genes in the heteroblastic development of the temperate rainforest tree *Gevuina avellana* (Proteaceae). *New Phytol* **210**: 694–708

Otoni WC, Paim Pinto DL, Rocha DI, Vieira LM, Dias LLC, Silva ML, Silva CV, Lani ERG, Silva LC, Tanaka FAO (2013) Organogenesis and somatic embryogenesis in passionfruit (*Passiflora* sp.). Somatic embryogenesis and gene expression. Narosa Publishing House, New Delhi, 1-17.

Otoni WC, Silva ML, Lima ABP, Paim Pinto DL, Lani ERG, Reis LB (2007) Transformação genética de maracujazeiros (2007) In: Torres AC, Dusi AN, Santos MDM (eds) Transformação Genética de Plantas via *Agrobacterium*: Teoria e Prática. Embrapa, Brasília, DF. pp 125–141.

Poethig RS (2013) Vegetative phase change and shoot maturation in plants. *Curr Top Dev Biol* Academic Press Inc., pp 125–152

- Poethig RS** (2009) Small RNAs and developmental timing in plants. *Curr Opin Genet Dev* **19**: 374–378
- Qiu D, Pan X, Wilson IW, Li F, Liu M, Teng W, Zhang B** (2009) High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*). *Gene* **436**: 37–44
- Reis LB, Silva ML, Lima ABP, Oliveira MLP, Pinto DLP, Lani ERG, Otoni WC** (2007) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. *Acta Horti* **738**: 425–431
- Rocha DI, Batista DS, Faleiro FG, Rogalski M, Ribeiro LM, Mercadante-Simões MO, Yockteng R, Silva ML, Soares WS, Pinheiro MVM, Pacheco TG, Lopes AS, Viccini LF, Otoni, WC** (2020) Passion Fruit: *Passiflora* spp. In: Litz, R.A.; Pliego-Alfaro, F.; Hormaza, J.I. (eds) *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*, 2nd Edition, CABI, Wallingford, UK. Pp 381-402.
- Rocha DI, Pinto DLP, Vieira LM, Tanaka FAO, Dornelas MC, Otoni WC** (2016) Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of *SERK* gene expression. *Protoplasma*, **253**:595-609
- Rubio-Somoza I, Zhou CM, Confraria A, Martinho C, Von Born P, Baena-Gonzalez E, Wang JW, Weigel D** (2014) Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes. *Curr Biol* **24**: 2714–2719
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW** (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D** (2005) Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* **8**: 517–527
- Scorza LCT, Hernandez-Lopes J, Melo-de-Pinna GFA, Dornelas MC** (2017) Expression patterns of *Passiflora edulis* *APETALA1/FRUITFULL* homologues shed light onto tendril and corona identities. *Evodevo* **8**: 1–15
- Shikata M, Koyama T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M** (2009) Arabidopsis SBP-Box genes *SPL10*, *SPL11* and *SPL2* control morphological change in association with shoot maturation in

the reproductive phase. *Plant Cell Physiol* **50**: 2133–2145

Silva GFF e, Silva EM, da Silva Azevedo M, Guivin MAC, Ramiro DA, Figueiredo CR, Carrer H, Peres LEP, Nogueira FTS (2014) microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. *Plant J* **78**: 604–618

Silva PO, Batista DS, Cavalcanti JHF, Koehler AD, Vieira LM, Fernandes AM, Barrera-Rojas CH, Ribeiro DM, Nogueira FTS, Otoni WC (2019) Leaf heteroblasty in *Passiflora edulis* as revealed by metabolic profiling and expression analyses of the microRNAs miR156 and miR172. *Ann Bot* **123**: 1191–1203

Sousa-Baena MS, Lohmann LG, Hernandez-Lopes J, Sinha NR (2018a) The molecular control of tendril development in angiosperms. *New Phytol* **218**: 944–958

Sousa-Baena MS, Sinha NR, Hernandez-Lopes J, Lohmann LG (2018b) Convergent evolution and the diverse ontogenetic origins of tendrils in angiosperms. *Front Plant Sci* **9**: 403

Teotia S, Tang G (2015) To bloom or not to bloom: Role of micromnas in plant flowering. *Mol Plant* **8**: 359–377

Tsukaya H (2013) Leaf Development. *Arabidopsis Book* **11**: e 0163

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

Vieira LM, Silva PO, Fernandes AM, Rocha DI, Otoni WC (2018) Protocol for somatic embryogenesis in *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae). In: Jain MS, Gupta P (eds) *Stepwise Protocols for Somatic Embryogenesis of Woody Plants*, 2nd ed. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, pp. 253–65

Wang JW, Park MY, Wang LJ, Koo Y, Chen XY, Weigel D, Poethig RS (2011) MiRNA control of vegetative phase change in trees. *PLoS Genet* **7**:e1002012

Wang JW, Czech B, Weigel D (2009) miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **138**: 738–749

Wang Y, Wang Z, Amyot L, Tian L, Xu Z, Gruber MY, Hannoufa A (2015) Ectopic expression of miR156 represses nodulation and causes morphological and developmental changes in *Lotus japonicus*. *Mol Genet Genomics* **290**: 471–484

- Wei S, Gruber MY, Yu B, Gao MJ, Khachatourians GG, Hegedus DD, Parkin IAP, Hannoufa A** (2012) *Arabidopsis* mutant *sk156* reveals complex regulation of *SPL15* in a miR156-controlled gene network. *BMC Plant Biol* **12**: 169
- Wei S, Yu B, Gruber MY, Khachatourians GG, Hegedus DD, Hannoufa A** (2010) Enhanced Seed Carotenoid Levels and Branching in Transgenic *Brassica napus* Expressing the *Arabidopsis miR156b* Gene. *J Agric Food Chem* **58**: 9572–9578
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS** (2009) The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in *Arabidopsis*. *Cell* **138**: 750–759
- Wu X, Ding D, Shi C, Xue Y, Zhang Z, Tang G, Tang J** (2016) microRNA-dependent gene regulatory networks in maize leaf senescence. *BMC Plant Biol* **16**: 73
- Xie K, Shen J, Hou X, Yao J, Li X, Xiao J, Xiong L** (2012) Gradual increase of miR156 regulates temporal expression changes of numerous genes during leaf development in rice. *Plant Physiol* **158**: 1382–1394
- Xie K, Wu C, Xiong L** (2006) Genomic organization, differential expression, and interaction of *SQUAMOSA* promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiol* **142**: 280–293
- Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC** (2003) Negative feedback regulation of *Dicer-Like1* in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol* **13**: 784–789
- Xu M, Hu T, Zhao J, Park M-Y, Earley KW, Wu G, Yang L, Poethig RS** (2016) Developmental Functions of miR156-Regulated *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genet* **12**: e1006263
- Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, Wu G, Poethig RS, Wagner D** (2009) The microRNA-regulated SBP-box transcription factor *SPL3* is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Dev Cell* **17**: 268–278
- Yin H, Hong G, Li L, Zhang X, Kong Y, Sun Z, Li J, Chen J, He Y** (2019) miR156/*SPL9* regulates reactive oxygen species accumulation and immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* **109**: 632–642
- Yu N, Cai WJ, Wang S, Shan CM, Wang LJ, Chena XY** (2010) Temporal control of

trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**: 2322–2335

Yu S, Lian H, Wang JW (2015) Plant developmental transitions: The role of microRNAs and sugars. *Curr Opin Plant Biol* **27**: 1–7

Yu S, Li C, Zhou CM, Zhang TQ, Lian H, Sun Y, Wu J, Huang J, Wang G, Wang JW (2013) Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *Elife*. doi: 10.7554/eLife.00269

Zhang SD, Ling LZ (2018) Diversification of *SQUAMOSA* promoter binding protein-like (SPL) genes by changes of miR156/529 binding sites in land plants. *Plant Gene* **14**: 55–63

Zhang TQ, Lian H, Tang H, Dolezal K, Zhou CM, Yu S, Chen JH, Chen Q, Liu H, Ljung K, et al (2015) An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants. *Plant Cell* **27**: 349–360

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

TABELAS

Tabela 1. Sequências de primers utilizados nas análises de expressão gênica por RT-PCR ou RT-qPCR.

Primer	Sequências 5'-3'
<i>HPTII</i> vogel F	GAATTCAGCGAGAGCCTGAC
<i>HPTII</i> vogel R	ATTTCGGCTCCAACAATGT
<i>PeACT</i> F	CCAGGCATTGCTGATAGGAT
<i>PeACT</i> R	ATTCTGCCTTTGCAATCCAC
<i>PeSPL9_JF_F</i>	GGTCTAACCCAAATCCCGCA
<i>PeSPL9_JF_R</i>	AGAGACCAGTGTGTGTGATGAG
miR156_ALeicht_F	GCGGCGTTGACAGAAGAGAGT
miR156/7_ALeicht_RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACGTGCTC
miR172_ptc_ALeicht_F	GCGGCGCRGAATCYTGATGAT
miR172_ptc_ALeicht_RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACCT
Reverso universal__JF	GTGCAGGGTCCGAGGT

Tabela 2. Médias de conteúdo de DNA, determinado por citometria de fluxo, em plantas de *Passiflora edulis* não-transgênicas (NT) e transgênicas (P3, P5 e P7) superexpressando *miR156*.

Linhagem	Conteúdo de DNA (pg)	CV (%)
NT	3,38	2,74
P3	3,59	2,80
P5	3,49	2,93
P7	3,61	2,97

CV: Coeficiente de Variação

FIGURAS

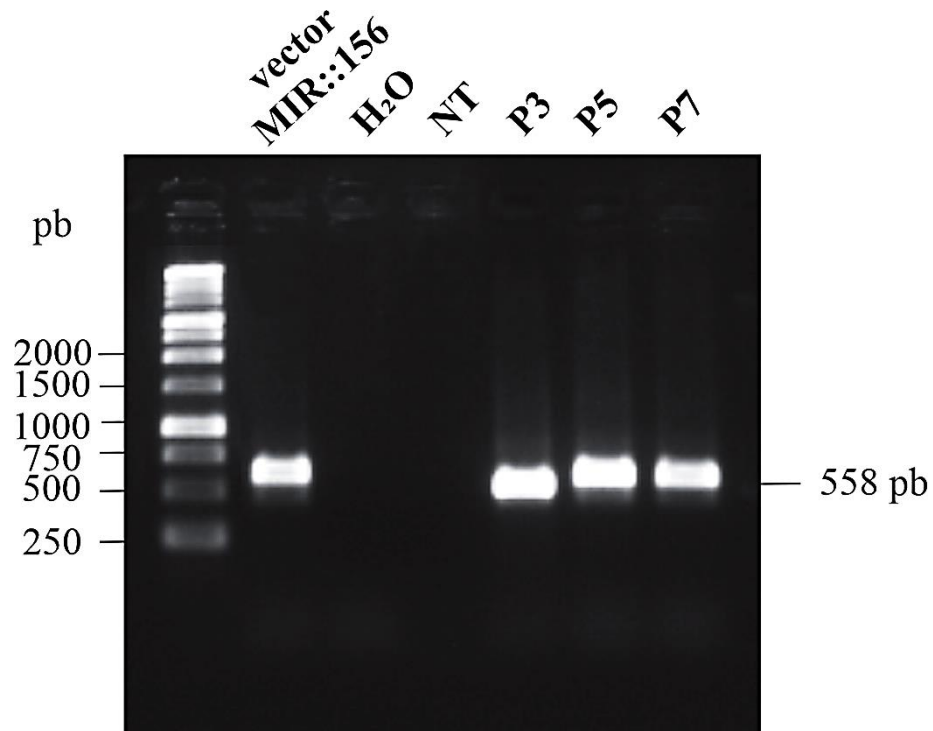


Figura 1. Confirmação das linhagens transgênicas superexpressando *miR156* (*Ubi10::AtmiR156a*) em *P. edulis* via PCR. O marcador molecular de 1 kb (Promega) foi utilizado. Vector MIR::156: *Agrobacterium tumefaciens* contendo o inserto de superexpressão de *miR156* utilizado como controle positivo. H₂O: controle negativo. NT: linhagem não-transformada. P3, P5 e P7: linhagens transformadas (~558 bp).

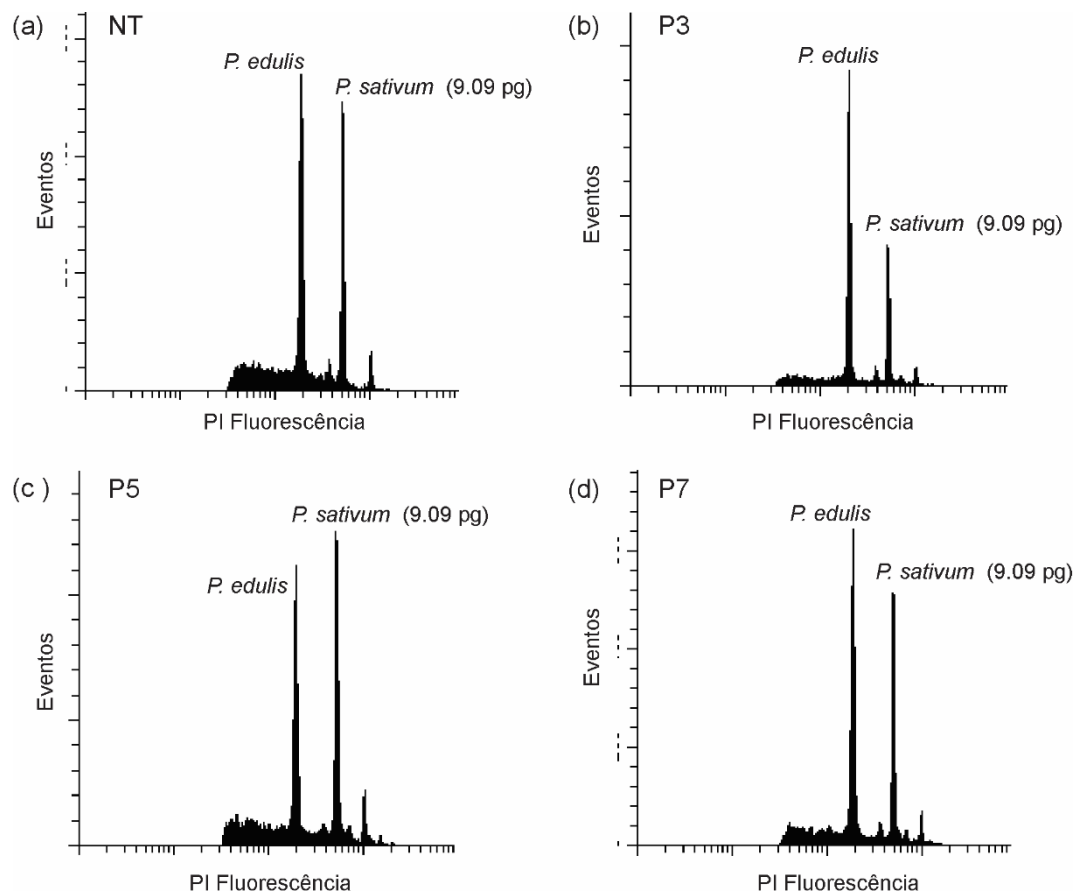


Figura 2. Estimativa do conteúdo de DNA nuclear em plantas de *Passiflora edulis* via citometria de fluxo. **(a)** Linhagem não-transgênica (NT). **(b, c, d)** Linhagens transgênicas superexpressando *miR156* (P3, P5, P7). O primeiro e o segundo pico em cada histograma correspondem às linhagens de *P. edulis* e ao padrão interno *Pisum sativum* ($2C = 9,09$ pg de DNA nuclear), respectivamente.

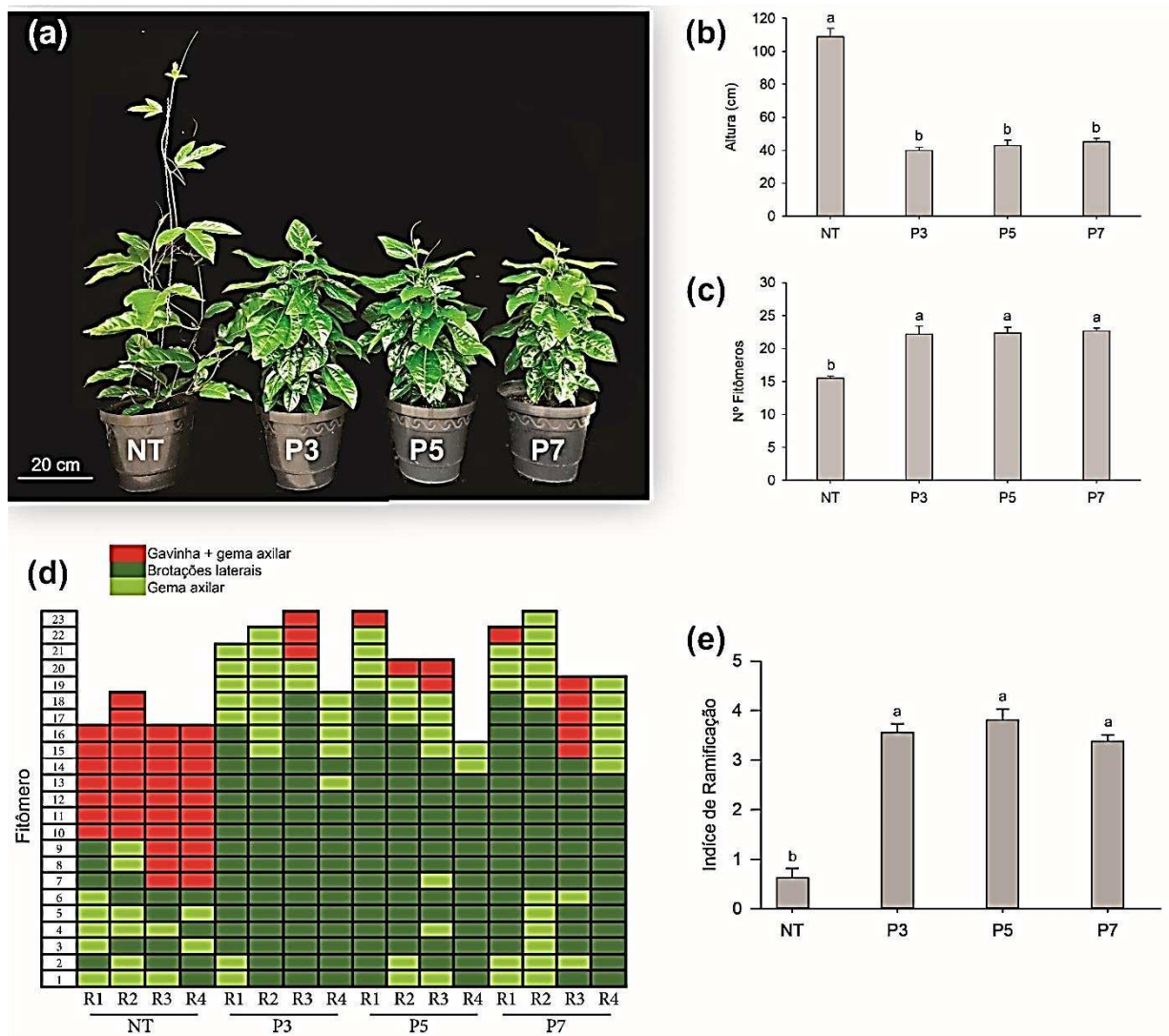


Figura 3. Características morfológicas de plantas de *Passiflora edulis* afetadas pela superexpressão do *miR156*. **(a)** Arquitetura das plantas. **(b)** Altura. **(c)** Número de fitômeros. **(d)** Diagrama mostrando brotações laterais e aparição de gavinha em relação ao fitômero. **(e)** Índice de ramificação. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as linhagens, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão de seis amostras biológicas. Dados compreendem a plantas cultivadas por 30 dias em casa de vegetação. NT: não transgênica. P3, P5 e P7: linhagens transgênicas superexpressando *miR156*.

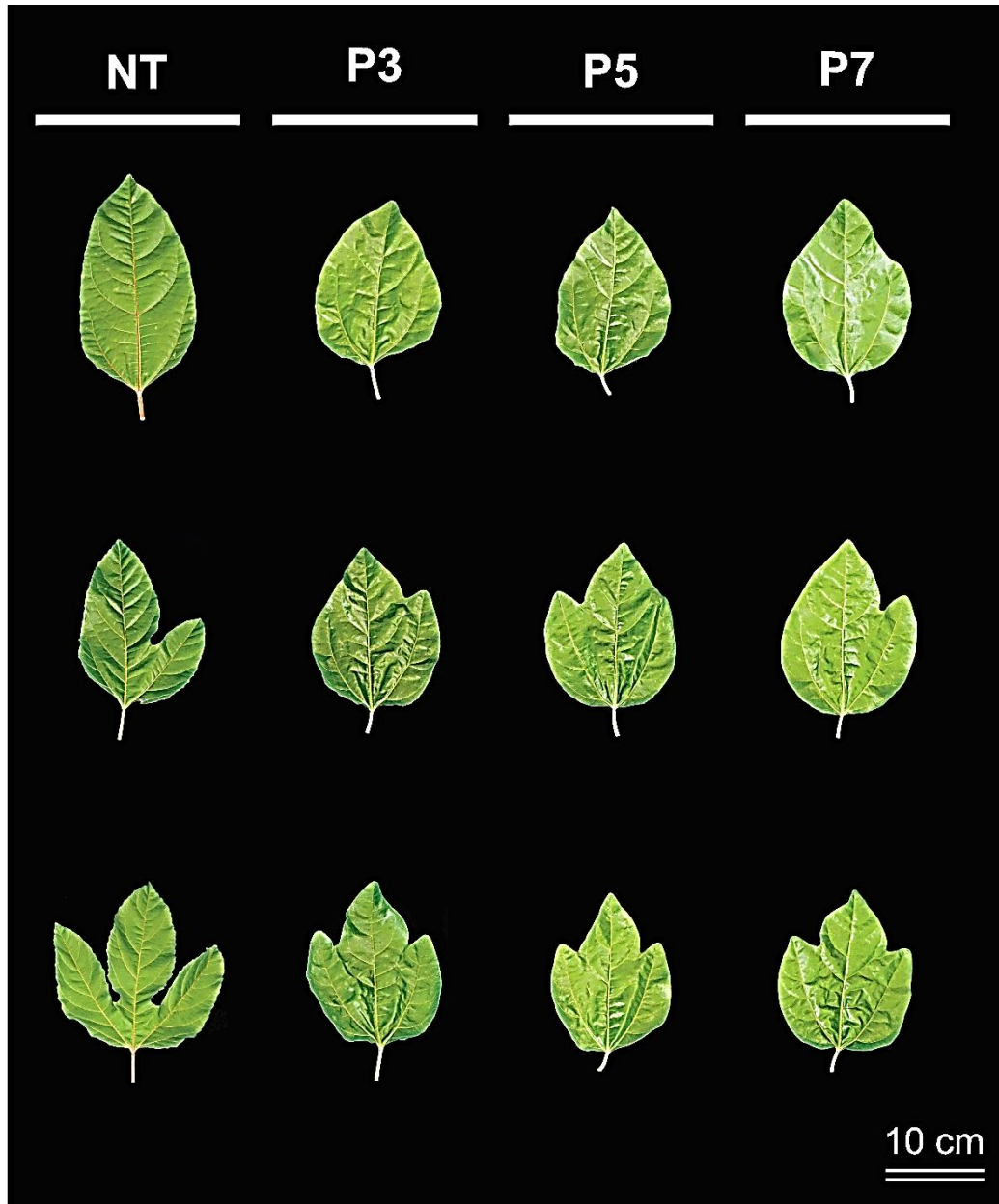


Figura 4. Morfologia foliar durante o processo heteroblástico de plantas de *Passiflora edulis* não-transgênica (NT) e linhagens transgênicas superexpressando *miR156* (P3, P5 e P7). Folhas completamente expandidas de plantas aos 120 dias em casa de vegetação.

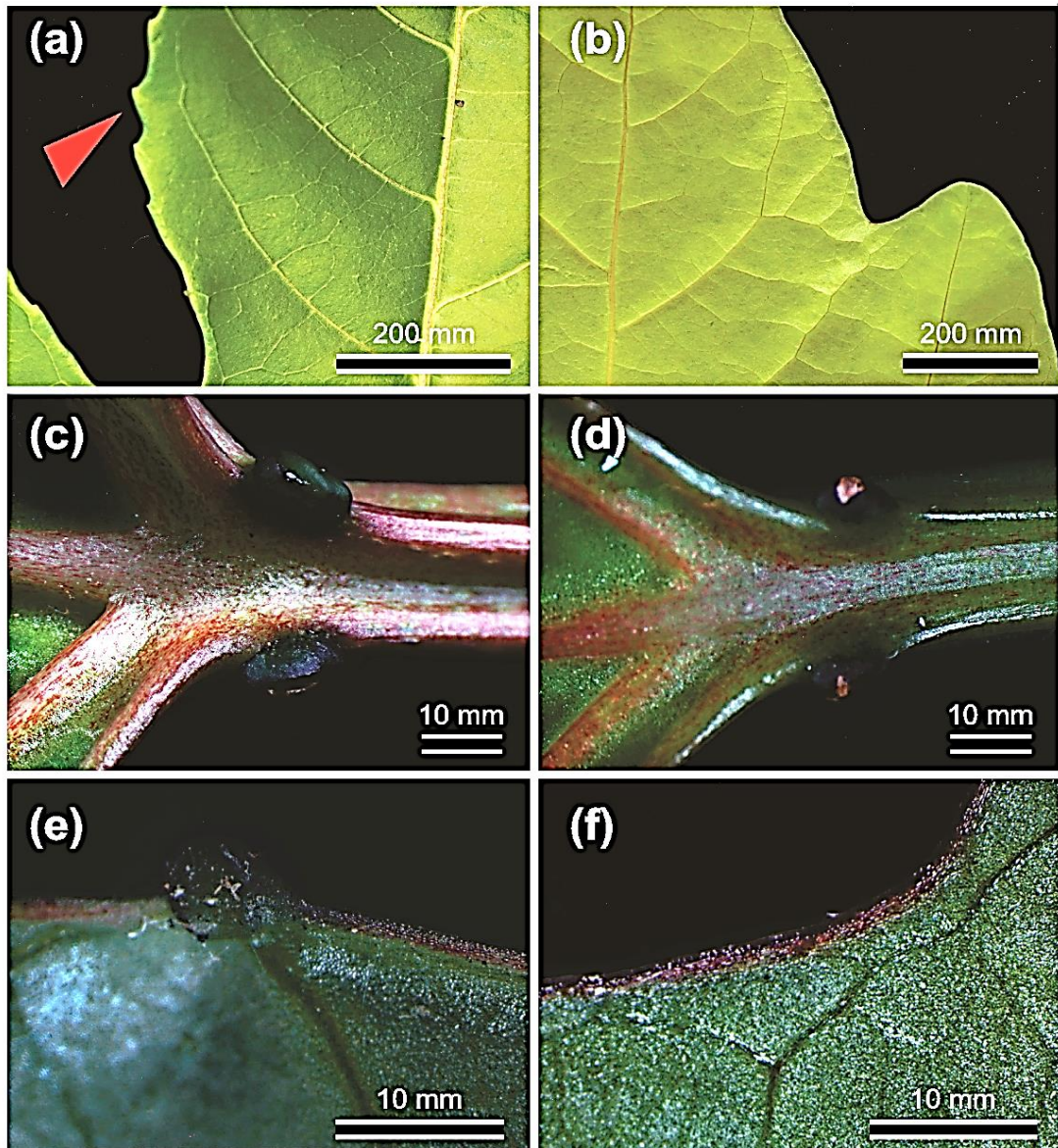


Figura 5. Efeitos da superexpressão de *miR156* sobre margem foliar e nectários extraflorais de *Passiflora edulis*. (a) Serrilhamento presente na margem da região apical de folhas de linhagens não-transgênicas e (b) ausente em linhagem transgênica superexpressando *miR156*. (c) Nectários peciolares de folhas de linhagem não transgênica e (d) linhagem transgênica superexpressando *miR156*. (e) Nectário na lâmina de folha trilobada presente em linhagem não-transgênica e (f) linhagem transgênica superexpressando *miR156*. O fenótipo transgênico de superexpressão foi representado pela linhagem P5.

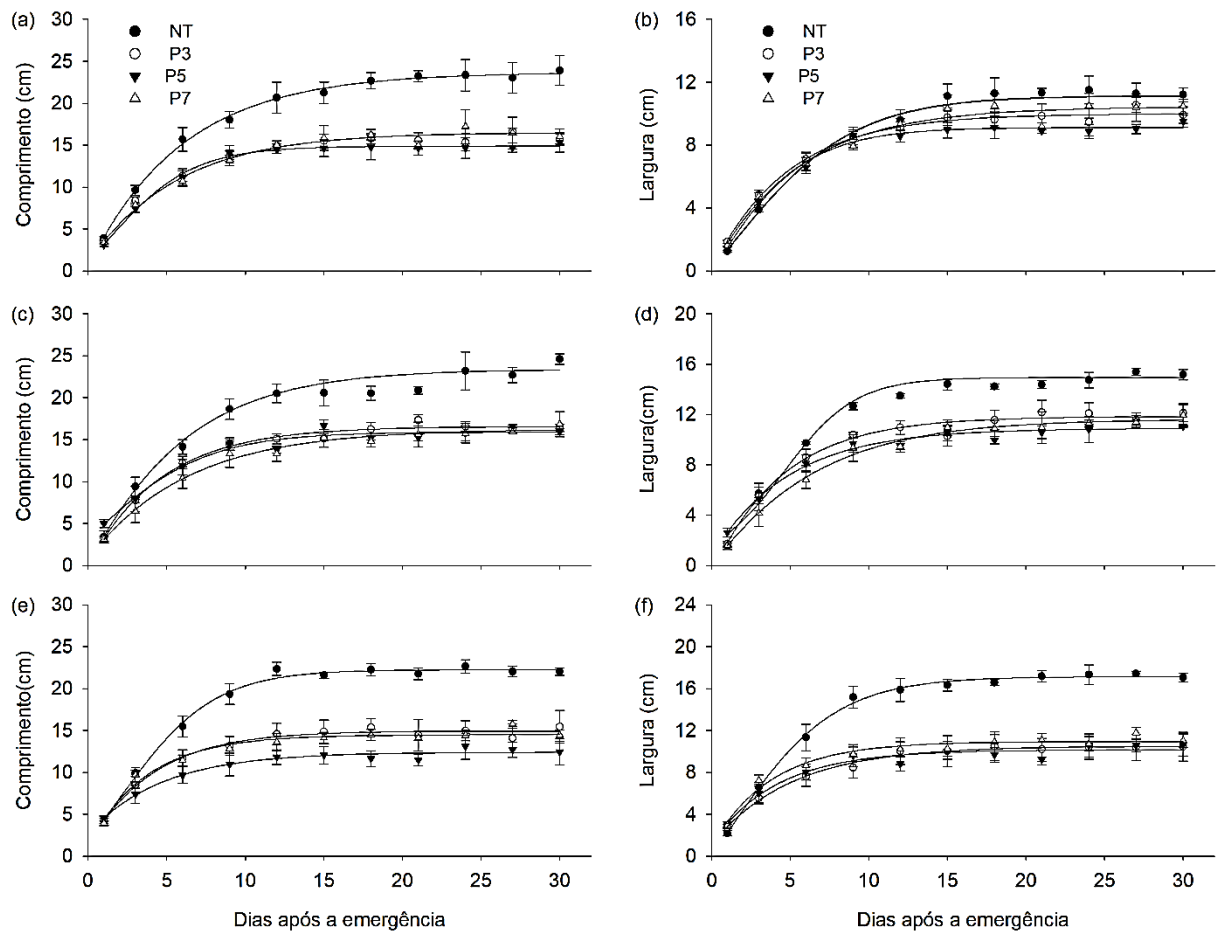


Figura 6. Dinâmica de crescimento de folhas de *Passiflora edulis* durante o processo heteroblástico. **(a, b)** Comprimento e largura de folhas monlobadas, **(c, d)** folhas bilobadas e **(e, f)** folhas triobadas. O crescimento em comprimento e largura foram descritos pela função sigmoideal $y = y_0 + a / (1 + \exp\{-[(x-x_0)/b]\})$. Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão de quatro repetições biológicas. NT: não-transgênica. P3, P5 e P7: linhagens transgênicas superexpressando *miR156*.

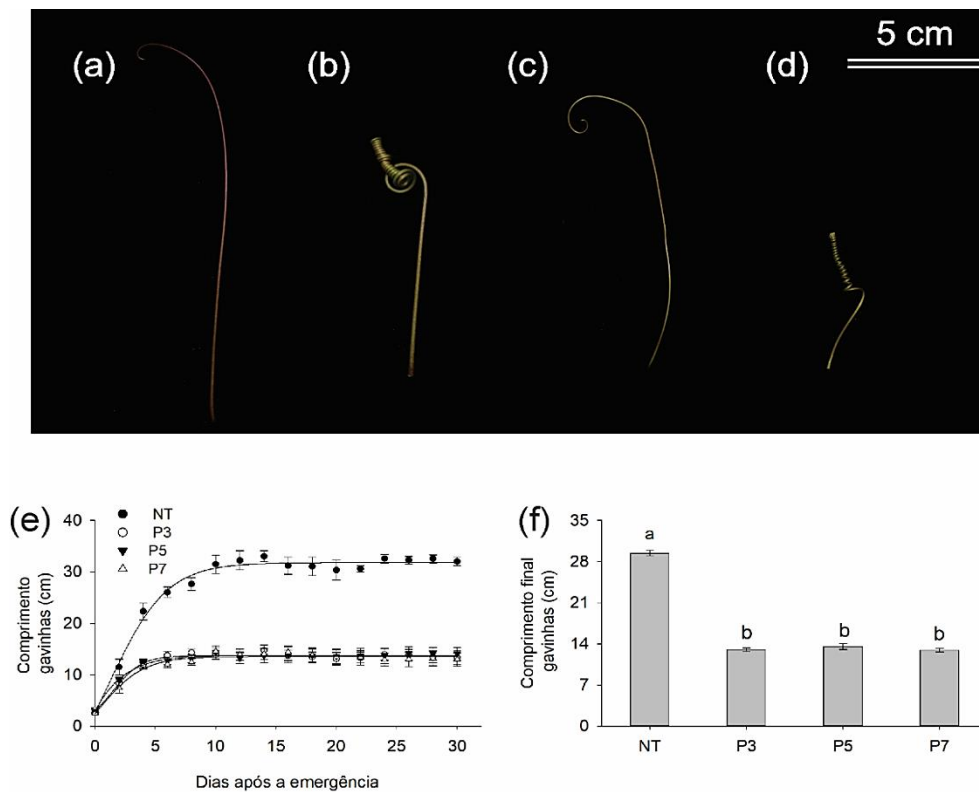


Figura 7. Morfologia e crescimento de gavinhas em plantas de *Passiflora edulis*. (a) Gavinha em alongamento e (b) plenamente alongada de planta não transgênica (NT). (c) Gavinha em alongamento e (d) plenamente alongada em linhagem superexpressando *miR156*. O fenótipo transgênico de superexpressão foi representado pela linhagem P5. (e) Dinâmica de crescimento em comprimento de gavinhas durante 30 dias após sua emergência, descrito pela função sigmoideal $y = y_0 + a / (1 + \exp\{-[(x-x_0) / b]\})$ (n=6). (f) Comprimento médio de todas as gavinhas plenamente alongadas aos 70 dias em casa de vegetação. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as linhagens, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão de amostras biológicas independentes. NT: não-transgênica. P3, P5 e P7: linhagens transgênicas superexpressando *miR156*.

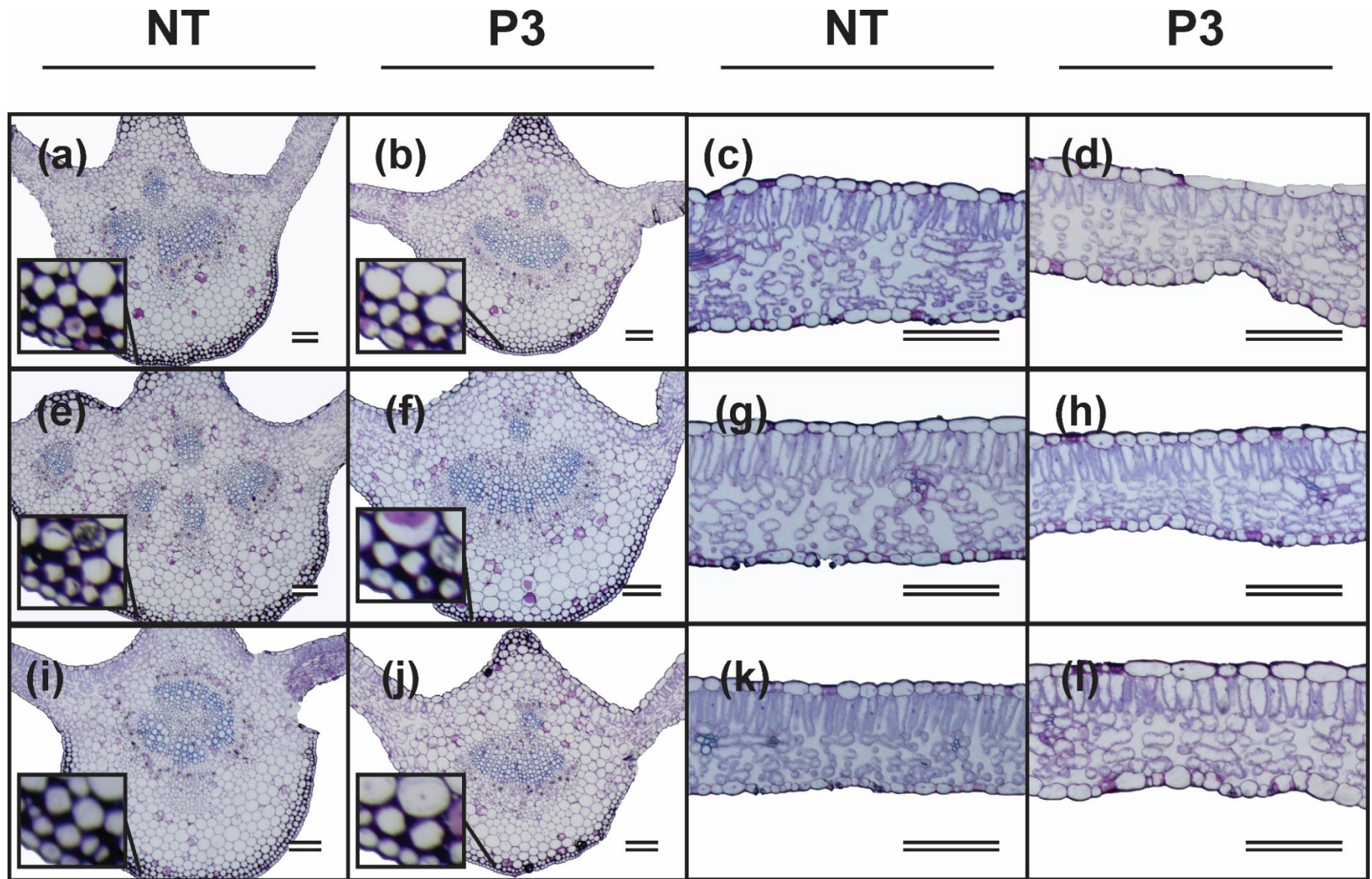


Figura 8. Secções anatômicas transversais de folhas de *Passiflora edulis*. Nervura mediana de folhas **(a, b)** monolobadas, **(e, f)** bilobadas, **(i, j)** trilobadas de linhagens não-transgênica e transgênica superexpressando *miR156*, respectivamente. Lâmina foliar **(c, d)** monolobadas, **(g, h)** bilobadas, **(k, l)** trilobadas de linhagens não-transgênica e transgênica superexpressando *miR156*, respectivamente. Região em destaque aponta o número de camadas de células colenquimáticas na região abaxial da nervura mediana. NT: não-transgênica. As linhagens transgênicas foram representadas pela P3. Barras correspondem a 500 µm.

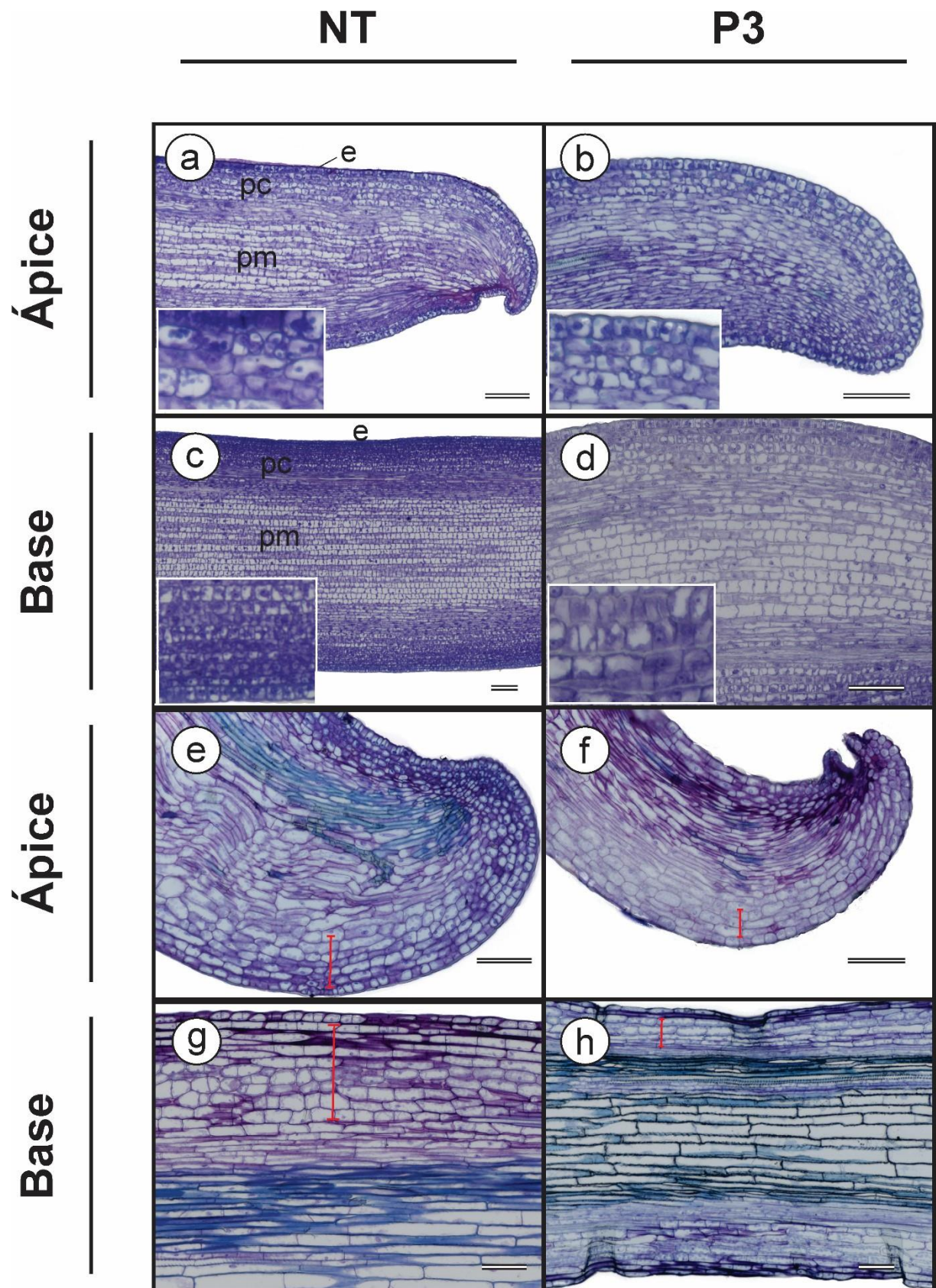


Figura 9. Anatomia de gavinhas em *Passiflora edulis* não-transgênica e linhagem transgênica superexpressando *miR156*. **(a, c)** Ápice e base da gavinha de plantas não-transgênica em alongamento. **(b, d)** Ápice e base da gavinha de linhagem transgênica em alongamento. **(e, g)** Ápice e base de gavinha da linhagem não-transgênica plenamente alongada. **(f, h)** Ápice e base de gavinha da linhagem transgênica plenamente alongada. Região em destaque aponta divisão celular em gavinha não transgênica e transgênica em alongamento. Detalhe (barra vermelha) evidenciando número de camadas do parênquima cortical em gavinha não-transgênica e transgênica plenamente alongadas. NT: não-transgênica. As linhagens transgênicas foram representadas pela P3. Barras correspondem a 300 µm. e: epiderme; pc: parênquima cortical; pm: parênquima medular.

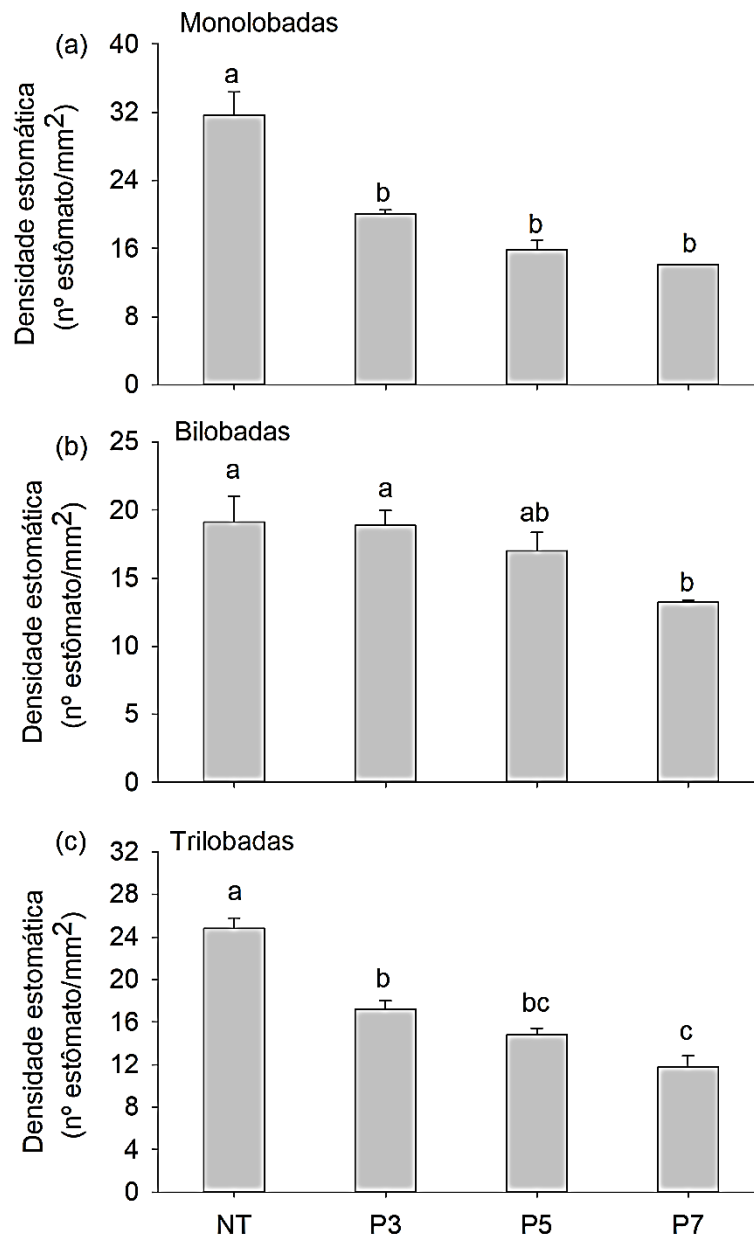


Figura 10. Densidade estomática em folhas de *Passiflora edulis* com diferentes morfologias. **(a)** Folhas monolobadas. **(b)** Folhas bilobadas. **(c)** Folhas trilobadas. Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão de quatro repetições biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as linhagens, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). NT: não-transgênica. P3, P5 e P7: linhagens superexpressando *miR156*.

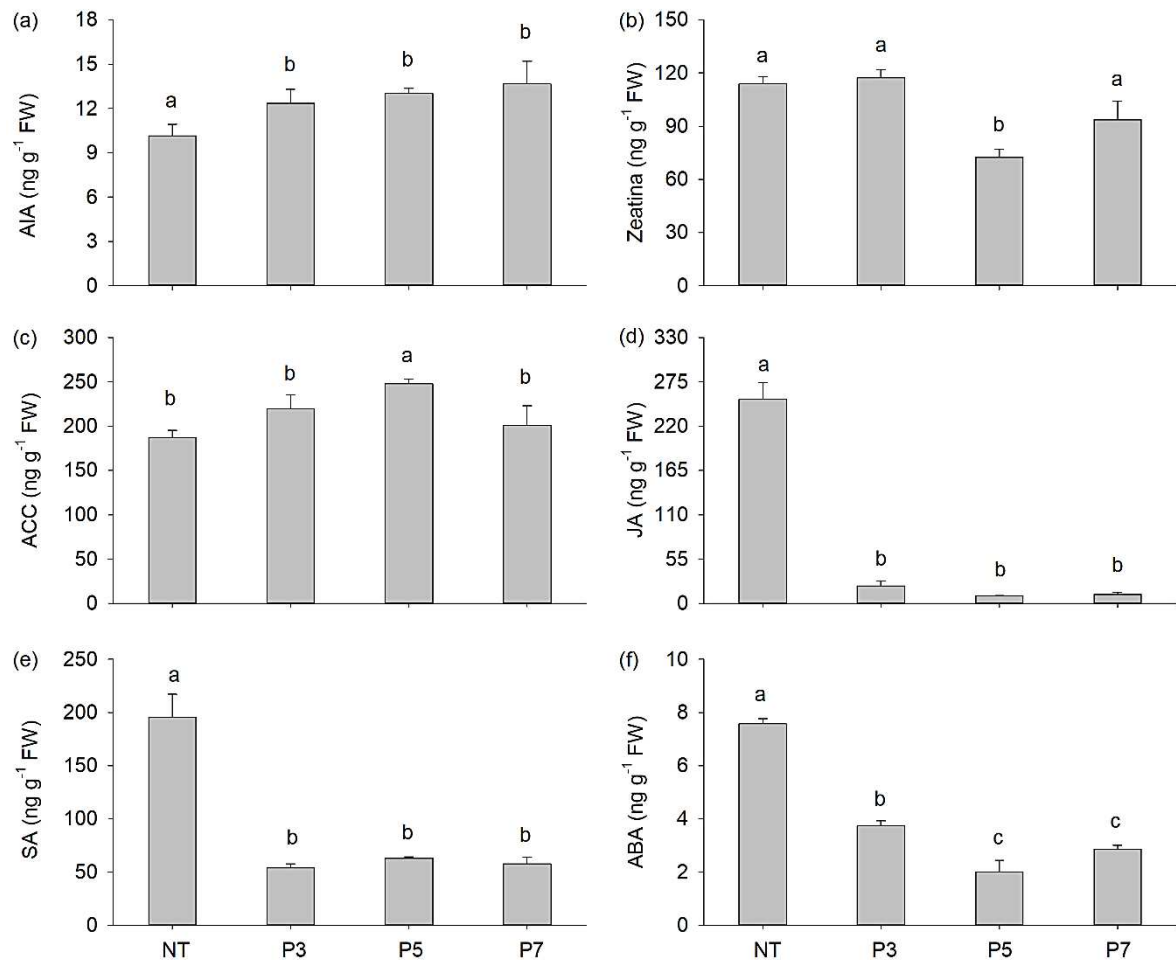


Figura 11. Níveis hormonais endógenos em *P. edulis*. **(a)** AIA (ácido indol-3-acético). **(b)** Zeatina. **(c)** ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano). **(d)** JA (ácido jasmônico). **(e)** SA (ácido salicílico). **(f)** ABA (ácido abscísico). Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão de quatro repetições biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as linhagens, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). NT: não-transgênica; P3,P5 e P7: linhagens transgênicas superexpressando *miR156*.

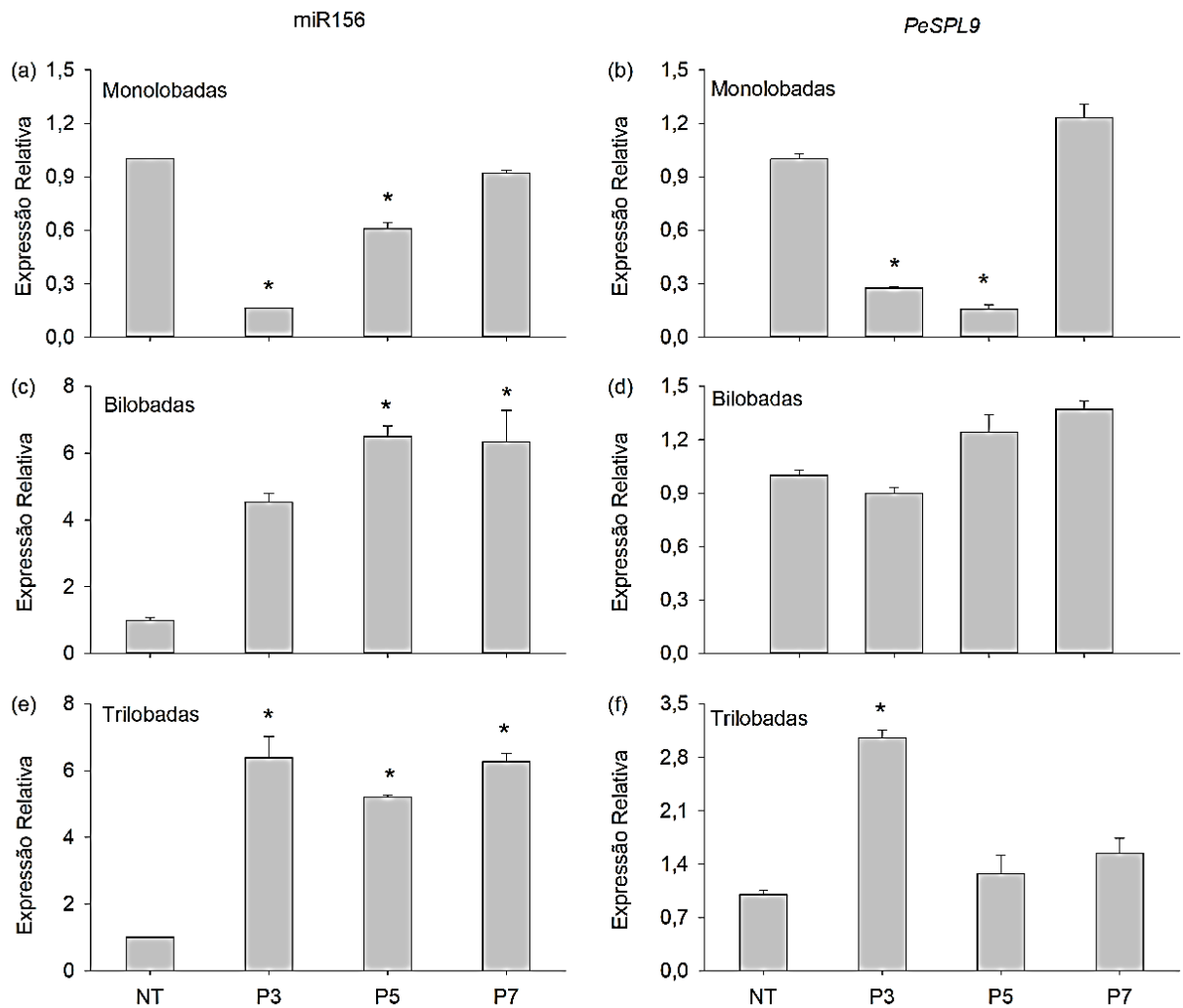


Figura 12. Padrão de expressão do *miR156* e seu gene alvo *SPL9* de folhas em expansão de *Passiflora edulis*. (a, b) Expressão relativa normalizada em folhas monolobadas, (c, d) folhas bilobadas e (e, f) folhas trilobadas. Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão de três repetições biológicas independentes. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P \leq 0,01$) pelo teste de Dunnett. NT: não-transgênica. P3, P5 e P7: linhagens transgênicas superexpressando *miR156*.

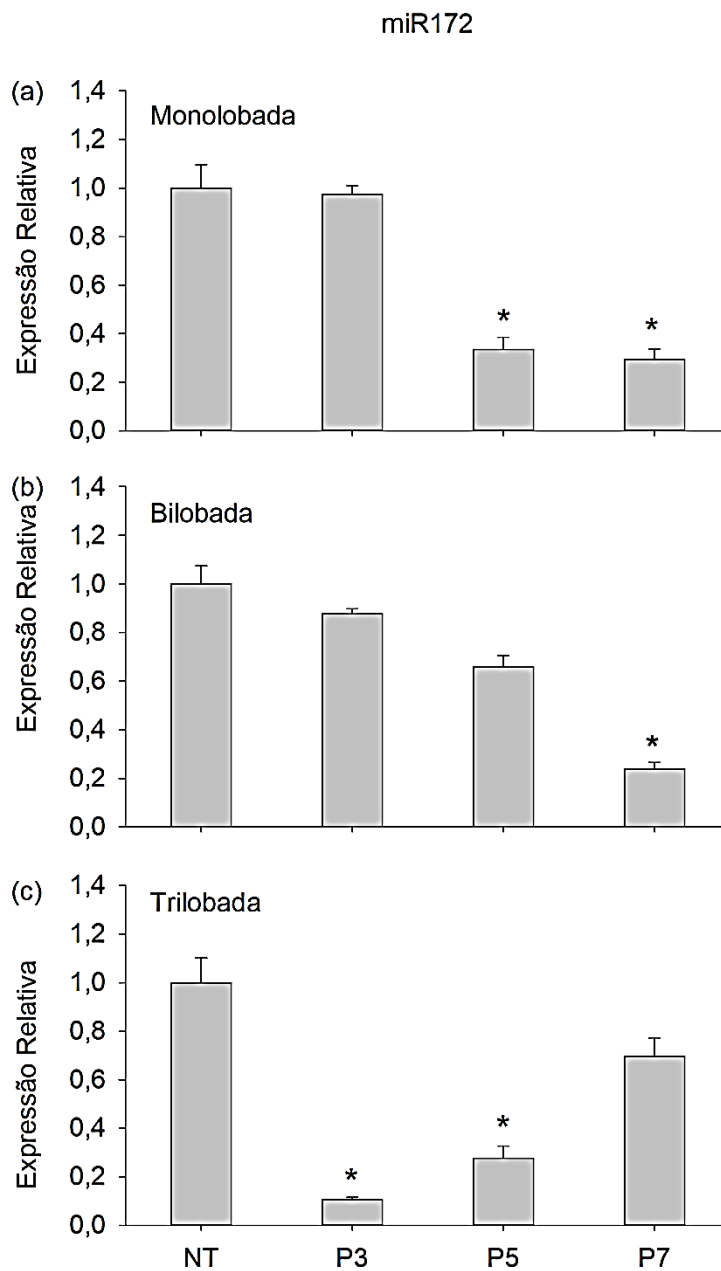


Figura 13. Padrão de expressão do *miR172* de folhas em expansão de *Passiflora edulis*. (a) Expressão relativa normalizada em folhas monolobadas. (b) Expressão relativa normalizada em folhas bilobadas. (c) Expressão relativa normalizada em folhas trilobadas. Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão de três repetições biológicas independentes. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P \leq 0,01$) pelo teste de Dunnett. NT: não-transgênica. P3, P5 e P7: linhagens transgênicas superexpressando *miR156*.

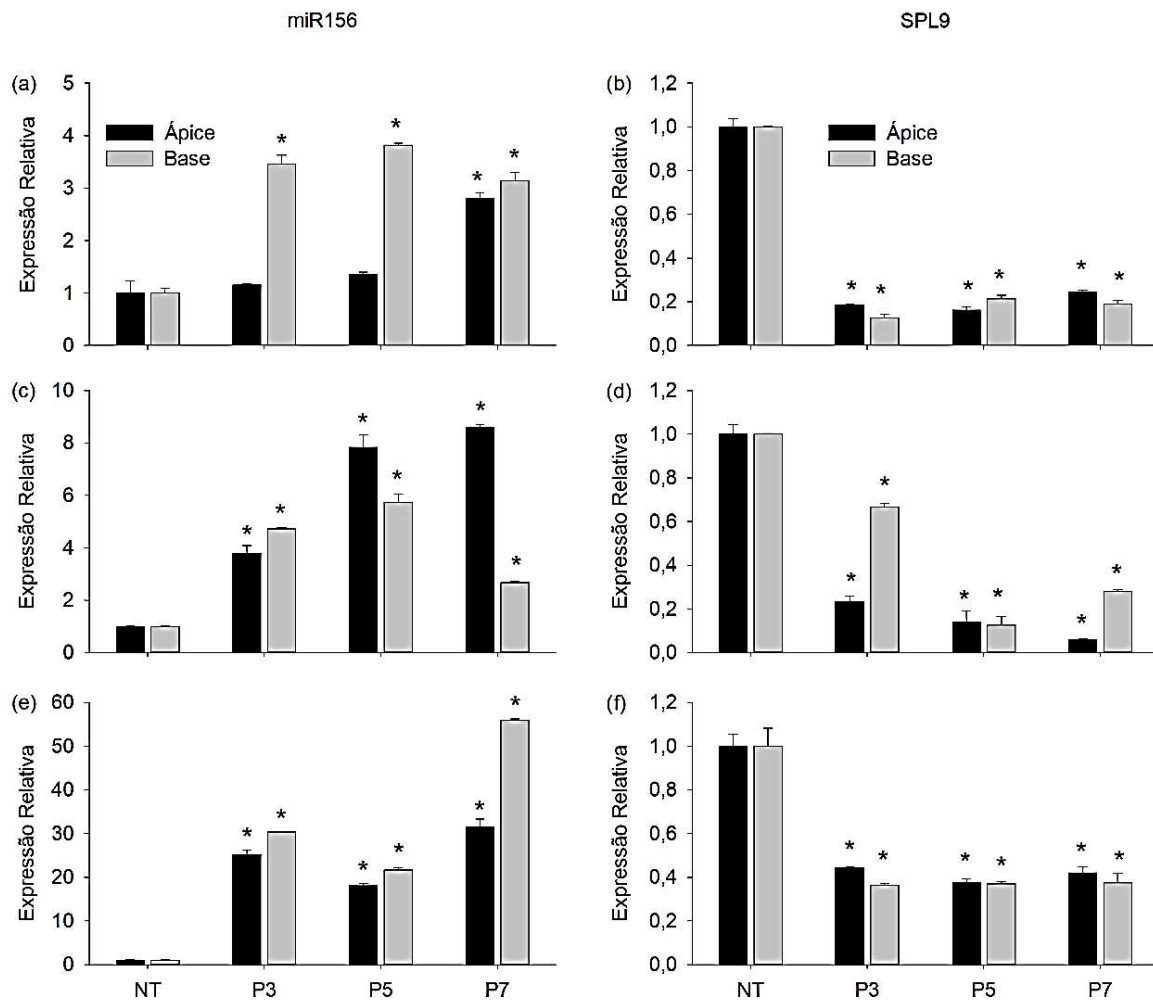


Figura 14. Padrão de expressão do *miR156* e *SPL9* na região apical e basal em gavinhas de *Passiflora edulis*. (a, b) Expressão relativa normalizada em gavinhas com 2 cm, (c, d) gavinhas com 6 cm e (e, f) gavinhas com 12cm. Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão de três repetições biológicas independentes. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P \leq 0,01$) pelo teste de Dunnett. NT: não transgênica. P3, P5 e P7: linhagens transgênicas superexpressando *miR156*.

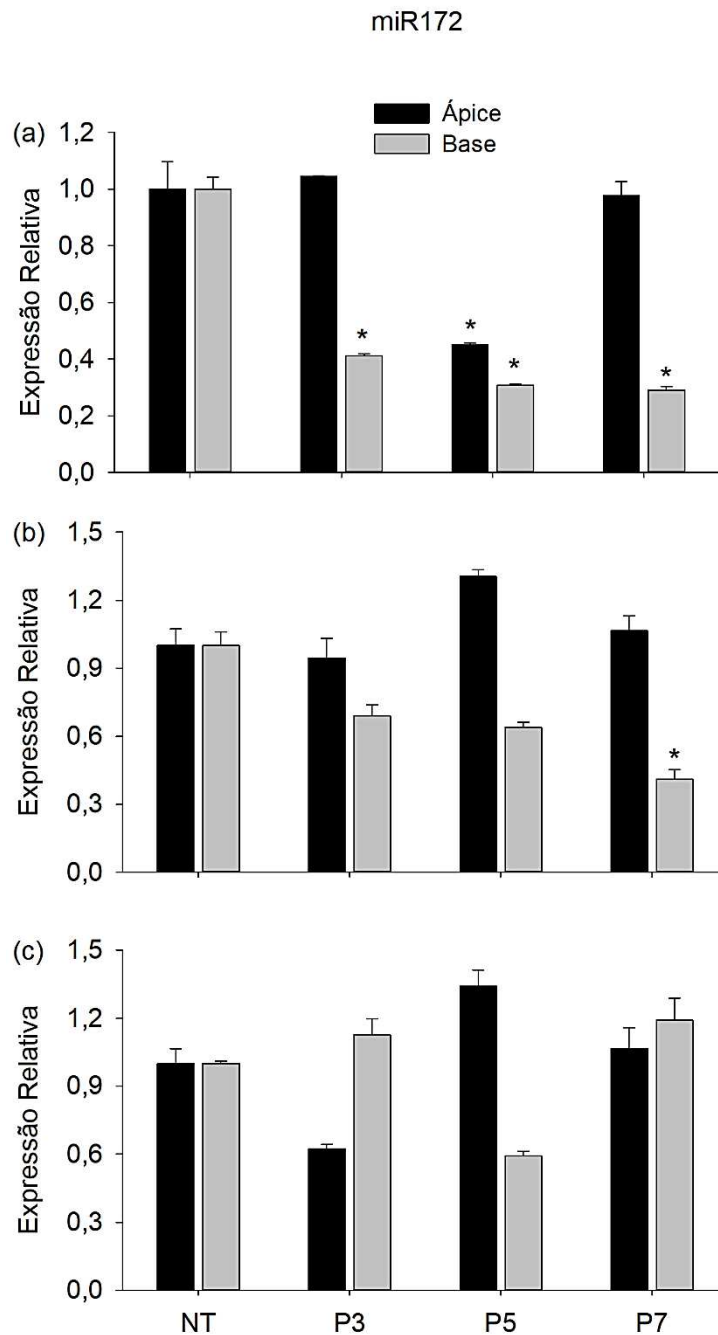


Figura 15. Padrão de expressão do *miR172* na região apical e basal de gavinhas de *P. edulis*. (a) Expressão relativa normalizada em gavinhas com 2 cm, (b) gavinhas com 6 cm e (c) gavinhas com 12 cm. Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão de três repetições biológicas independentes. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P \leq 0,01$) pelo teste de Dunnett. NT: não-transgênica. P3, P5 e P7: linhagens transgênicas superexpressando *miR156*.

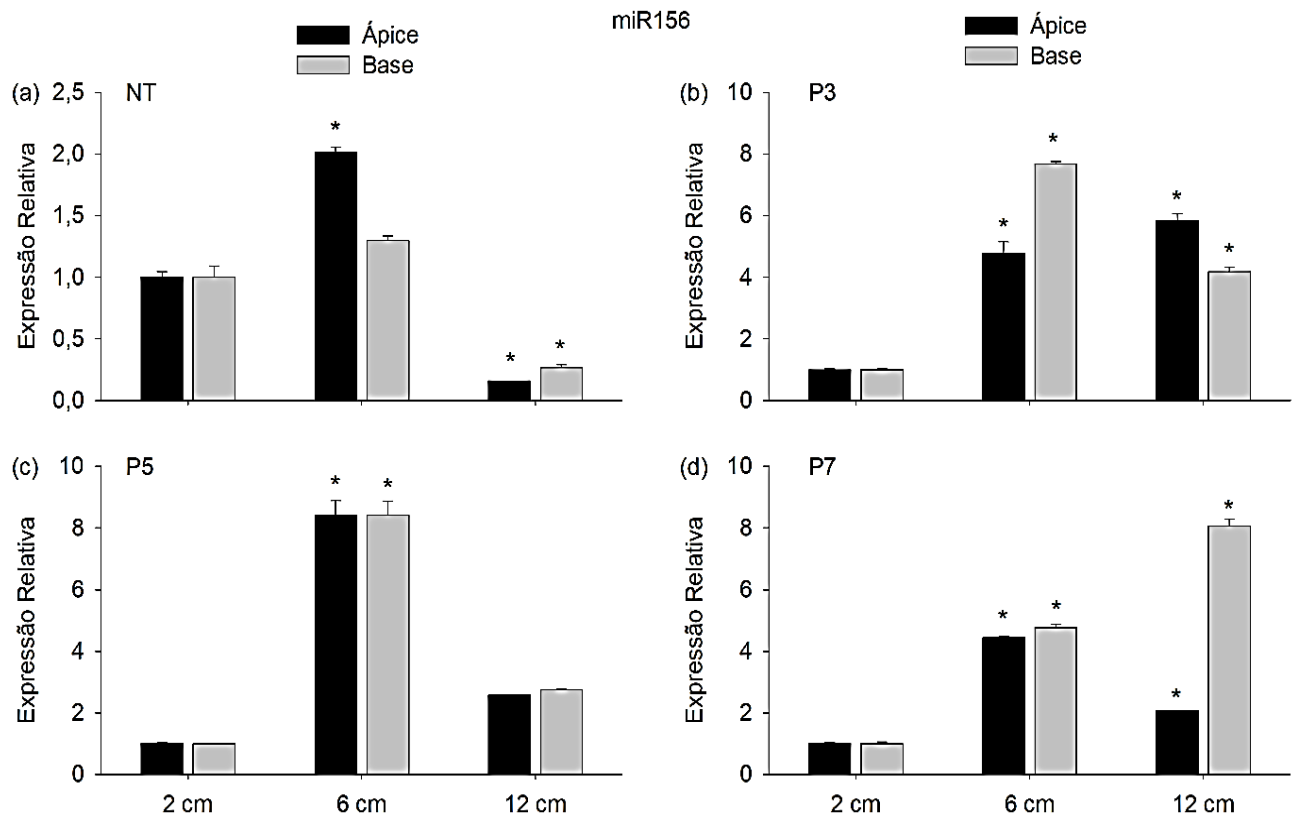


Figura 16. Padrão de expressão do *miR156* na região apical e basal em gavinhas com diferentes tamanhos (cm). **(a)** Linhagem não-transgênica (NT). **(b)** Linhagem P3. **(c)** Linhagem P5. **(d)** Linhagem P7. Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão de três repetições biológicas independentes. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P \leq 0,01$) pelo teste de Dunnett.