

DENISE ALVARES PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE *SERK* DURANTE A
INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SOJA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010**

DENISE ALVARES PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE *SERK* DURANTE A
INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SOJA**

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

APROVADA: 20 de setembro de 2010.

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-orientador)

Prof. Luciano Gomes Fietto

Profa. Andreia Barcelos Passos Lima

Prof. Pedro Ivo Vieira Good God

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

Aos meus queridos pais, Marco e Myriam,

As minhas irmãs Luciana e Fernanda,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e proteger.

Aos meus pais, Marco e Myriam, pelo imensurável carinho, paciência e apoio, que foram essenciais para o meu equilíbrio.

As minhas irmãs Fernanda e Luciana, pela amizade, cuidado e incentivo nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Maurílio A. Moreira, pela oportunidade de trabalho, confiança e orientação.

Ao professor Everaldo G. Barros, pelos ensinamentos, apoio e atenção dedicada.

Aos professores F. Murilo Zerbini Jr, Luciano G. Fietto, Wagner C. Otoni e Luzimar Campos, pelas sugestões e apoio aos projetos.

Aos amigos do Laboratório de Sequenciamento Ana Paula, Carol, Cassiana, Christina, Magali, Mariana, Larissa, Lídia, Lucas, Rafa, Roberta, Roméria e Williane, pelo incentivo, aprendizado e agradável convívio. Em especial, à Bia, Maria Andréia e Mari, pelos ensinamentos e pela ajuda.

Aos amigos dos Laboratórios de Proteína e Biomol Fernanda, Lorêta, Klever, Marcão e Leonardo, pela amizade e prestatividade.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular Alison, Jorge, Renan, Fábio e Fernanda; e do Laboratório de Anatomia Vegetal Nívea, Ana Cláudia, Diego e Lorena, pelo auxílio e contribuição na execução de parte dos experimentos.

Aos funcionários Cássio, Gláucia e Marlene, pela presteza. Ao Newton e Zé Carlos, pelo apoio nas atividades da casa de vegetação.

As minhas grandes amigas Simone, Priscila, Natália Cordeiro, Camila, Juliana, Kelly, Pricila e Paula, pelo enorme carinho, pelos conselhos, incentivos e alegrias compartilhadas.

BIOGRAFIA

DENISE ALVARES PEREIRA, filha de Marco Antonio Pereira Damasceno e Myriam Lucia Alvares de Oliveira, nasceu em 17 de julho de 1985, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Em março de 2004, iniciou o curso de Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se em julho de 2008. Durante a graduação, desenvolveu atividades de Iniciação Científica na Linha de Pesquisa de Genética de Plantas e Biologia Molecular de Microrganismos (2007/2008), no BIOAGRO/UFV.

Em agosto de 2008, ingressou no curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 20 de setembro de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Embriogênese zigótica	3
2.2 Embriogênese somática	6
2.2.1 Aquisição de competência embriogênica	6
2.2.2 O papel do gene <i>SERK</i> na indução de competência	8
2.3 Transformação genética de plantas	11
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Análises “ <i>in silico</i> ”	15
4.1.1 Seleção de genes candidatos a codificar a proteína <i>SERK</i>	15
4.1.2 Predição de domínios conservados	15
4.1.3 Caracterização da região promotora	16
4.2 Material vegetal e cultivo asséptico	16
4.3 Identificação e clonagem dos genes <i>SERK</i>	17
4.3.1 Extração de RNA total	17
4.3.2 Tratamento das amostras de RNA e síntese do cDNA	17
4.3.3 RT-PCR Convencional	18
4.4 Produção da sonda <i>antisense</i>	20
4.4.1 Clonagem dos fragmentos no vetor pSPT18	20
4.4.2 Sequenciamento	21
4.4.3 Marcação da sonda <i>antisense</i>	22
4.5 Hibridização <i>in situ</i>	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Identificação e caracterização dos genes <i>SERK</i> de soja	24
5.2 Clonagem dos genes <i>GmSERK</i>	33
5.3 Análise do padrão de expressão de <i>GmSERK1</i>	37
6. CONCLUSÕES	45
7. PERSPECTIVAS	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

RESUMO

PEREIRA, Denise Alvares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010. **Caracterização e expressão do gene *SERK* durante a indução de embriogênese somática em soja.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Co-orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Wagner Campos Otoni.

A embriogênese somática é uma ferramenta útil para a propagação de plantas e consiste num sistema modelo adequado para a elucidação de eventos iniciais do desenvolvimento embrionário. Estudos genéticos e moleculares focados no desenvolvimento vegetal têm relatado o envolvimento do gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) no processo de aquisição de competência embriogênica. Para que seja possível o aumento da eficiência dos processos de regeneração de plantas, é preciso compreendê-los melhor. Dessa forma, os objetivos do presente trabalho foram determinar se o gene *SERK* está presente no genoma da soja e analisar a sua expressão durante a indução de embriogênese somática. Genes que codificam três novos membros da superfamília de receptores cinase ricos em leucina (LRR-RLK - Leucine-rich repeat receptor like kinase) foram identificados. Esses genes foram denominados *GmSERK1*, *GmSERK2* e *GmSERK3*, já que compartilham com outros membros da família *SERK* uma conservada estrutura íntron/éxon e codificam um peptídeo sinal, um zíper de leucina, cinco repetições de leucina (LRR), um domínio rico em prolina (SPP - *serine proline proline*), um domínio transmembrana e um domínio cinase com 11 subdomínios, características que distinguem os receptores *SERK* dos demais membros da superfamília LRR-RLK. Com o objetivo de verificar a posição das proteínas *GmSERK* dentro da superfamília de LRR-RLKs de plantas, partes conservadas de seus domínios extracelular e intracelular foram comparadas a outras sequências de LRR-RLKs retiradas da literatura. Em relação ao domínio LRR, verificou-se que as proteínas *SERK* apresentam todos os aminoácidos conservados da sequência consenso das LRR de plantas. Além disso, a conservação dos resíduos de ácido aspártico (D) na posição 1, asparagina (N) na posição 4 e glicina (G) na posição 16 em proteínas da família *SERK*

foi observado, embora não seja consenso entre as LRRs de plantas. Uma árvore filogenética foi construída com base nos domínios cinase e os resultados mostraram que as proteínas SERK formam um ramo distinto dos outros tipos de receptores LRR-RLKs e as GmSERKs agrupam-se melhor com outros membros da família SERK, como as de *Medicago truncatula* (*MtSERK1*), *Teobroma cacao* (*TcSERK*) e *Solanum tuberosum* (*StSERK1*). O tratamento dos explantes com ácido 2,4-diclorofenoxyacético (40 mg/L) mostrou-se eficiente em induzir embriões somáticos a partir da cultivar CAC-1 e um grande número de embriões globulares pode ser visualizado após 30 dias de cultivo. Entretanto, um grande efeito do genótipo na resposta morfogênica foi observado. Ao contrário de CAC-1, explantes derivados da cultivar CS303 apresentaram uma baixa frequência de indução e apenas um pequeno número de embriões somáticos foi obtido. As análises de expressão, realizadas por meio da técnica de hibridização *in situ*, mostraram que um alto nível de transcritos correspondentes ao gene *GmSERK1* pôde ser detectado em tecidos embriogênicos de CAC-1 durante a fase de indução de embriogênese somática. Em contraste, cotilédones imaturos da cultivar de soja CS303 apresentaram um baixo acúmulo de transcritos de *GmSERK1*. Estes resultados sugerem o envolvimento do gene *GmSERK1* no processo de embriogênese somática, provavelmente atuando como um importante fator na aquisição de competência embriogênica.

ABSTRACT

PEREIRA, Denise Alvares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010. **Characterization and expression of *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis in soybean.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Wagner Campos Otoni.

Somatic embryogenesis is a useful tool for plant propagation and a suitable model system for deciphering early events during embryo development. Molecular and genetic studies focused in plant development have reported the involvement of *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) gene in the acquisition of embryogenic competence. In order to increase the efficiency of plant regeneration processes we need to understand it better. Therefore, the purpose of the present work was to determine if the *SERK* gene is present in the soybean genome and analyze its expression during somatic embryogenesis. Genes encoding three novel members of the Leucine-rich repeat receptor like kinase (LRR-RLK) superfamily have been identified. These genes were named *GmSERK1*, *GmSERK2* and *GmSERK3*, since they share a conserved intron/exon structure with other members of the *SERK* family and encode a signal peptide, a leucine zipper domain, five LRR, the SPP domain, a single transmembrane domain and a kinase domain with 11 subdomains, features that distinguishes *SERK* proteins from other proteins belonging to the LRR-RLK superfamily. To investigate the position of *GmSERK* proteins in the plant LRR-RLKs superfamily, the conserved parts of the extracellular or intracellular domains were compared to other published LRR-RLKs sequences taken from literature. In the LRR domain, *SERK* proteins share all conserved amino acids of the plant LRR consensus sequence. Moreover, conservations of an aspartic acid (D) at position 1, an asparagine (N) at position 4 and a glycine (G) at position 16 were observed, although they are not consensus between other LRRs. A phylogenetic tree was constructed based on kinase domains and results showed that *SERK* proteins form a distinct branch in the phylogenetic tree and *GmSERKs* clustered most closely with *SERK* gene members such as *Medicago truncatula* (*MtSERK1*),

Teobroma cacao (TcSERK) and *Solanum tuberosum* (StSERK1). Treatment of explants with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (40 mg/L) was effective in inducing somatic embryos derived from the cultivar CAC-1 and a large number of globular embryos could be viewed after 30 days. However, it was observed a strong effect of the genotype in the morphogenic response. Unlike CAC-1, explants derived from the cultivar CS303 showed a low frequency of induction and only a small number of somatic embryos were obtained. Analysis of gene expression, performed by in situ hybridization, showed that a high level of *GmSERK1* transcripts could be detected in embryogenic tissues of CAC-1 during the induction of somatic embryogenesis. In contrast, immature cotyledons of soybean cultivar CS303 showed low levels of *GmSERK1* transcripts. These results suggest the involvement of *GmSERK1* gene with somatic embryogenesis, probably acting as an important player in acquisition of embryogenic competence.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é a cultura oleaginosa mais importante no mundo e a maior do Brasil em área plantada. De acordo com a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção nacional de soja safra 2010, atualmente estimada em 68,69 milhões de toneladas, é 20,2% superior aos 57,17 milhões de toneladas colhidos no ano passado. As maiores produtividades são observadas nos estados do Paraná, com 3.139 kg/ha, e do Mato Grosso do Sul, com 3.100 kg/ha.

Além de ser um dos mais importantes componentes de rações animais, a soja tem se tornado bastante importante na dieta humana por ser uma boa fonte de proteína e óleo vegetal. Diversos laboratórios no mundo inteiro desenvolvem pesquisas que visam o melhoramento da qualidade nutricional dos grãos soja e a tolerância a estresses bióticos e abióticos (Loganathan & Maruthasalam, 2010).

O melhoramento genético dos cultivares de soja, por meio do melhoramento clássico, é um processo laborioso e demorado (Loganathan & Maruthasalam, 2010). Alternativamente, a Engenharia Genética oferece excelentes oportunidades para o melhoramento de cultivares de soja comercial, baseadas nas técnicas de transformação de plantas (Santarém, 2000).

A cultura de tecidos vegetais via organogênese e embriogênese somática permite a obtenção de células totipotentes, que servirão como hospedeiras para o DNA exógeno nos sistemas de transformação. Para as espécies de leguminosas que são consideradas recalcitrantes à transformação, a regeneração *in vitro* tem se mostrado altamente genótipo-específica (Somers *et al.*, 2003).

A formação de um organismo funcional a partir de uma célula somática requer a aquisição espacial coordenada de várias identidades celulares, gerada pela expressão diferencial de alguns genes envolvidos no processo (Chugh & Khurana, 2002). As auxinas, além de serem indispensáveis para a viabilidade das plantas, têm sido amplamente utilizadas para a indução de aquisição de competência embriogênica em

sistemas de cultura de tecidos vegetais (Raghavan, 2004; Fehér, 2005; Benjamins & Scheres, 2008).

Estudos genético-moleculares realizados com diversas espécies de plantas têm identificado a presença de genes marcadores das células embriogenicamente competentes. A expressão de um desses genes, conhecido por *Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase* (SERK), foi correlacionada com a presença de células competentes à embriogênese em espécies como *Daucus carota* (Schmidt *et al.*, 1997), *Arabidopsis thaliana* (Salaj *et al.*, 2008), *Solanum tuberosum* (Sharma *et al.*, 2008) e *Medicago truncatula* (Nolan *et al.*, 2009).

O programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV desenvolveu, por métodos convencionais, um germoplasma especial visando à criação de variedades de soja para a indústria de alimentos. Em vista da perspectiva de benefícios nutricionais e econômicos, o programa tem investido na transformação de plantas visando o silenciamento de genes que codificam fatores antinutricionais na semente de soja. Para que o processo de transformação seja efetivo, o DNA exógeno deve ser introduzido em células vegetais que sejam aptas a regenerar plantas completas. Dessa forma, o presente trabalho visou contribuir para a elucidação do processo de aquisição de competência embriogênica em soja, que é fundamental para o desenvolvimento de protocolos de regeneração mais eficientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Embriogênese zigótica

A embriogênese é o processo que inicia o desenvolvimento de organismos vegetais e animais. Em animais, o padrão de formação do embrião é evidente, uma vez que o embrião maduro é uma versão em miniatura do organismo adulto. Já em plantas, o processo gera apenas uma estrutura menos complexa, enquanto que a morfologia da planta adulta é gerada pela atividade dos meristemas apicais após a germinação (Berleth & Chatfield, 2002).

Vários estudos genético-moleculares foram realizados com *Arabidopsis thaliana*, visando à identificação e caracterização de genes que controlam o estabelecimento da polaridade, diferenciação de tecidos e elaboração de padrões durante o desenvolvimento do embrião (Dodeman *et al.*, 1997).

No processo de embriogênese, o embrião zigótico se desenvolve a partir de uma célula ovo fertilizada, posicionada dentro do saco embrionário, que é embebida num tecido materno protetor. Para completar a fertilização, o tubo polínico penetra no óvulo através da micrópila e entrega dois núcleos espermáticos haplóides, um que irá fundir com o núcleo da oosfera, enquanto que o outro combina com dois núcleos polares. Esse evento de dupla fertilização inicia o desenvolvimento de duas estruturas multicelulares intimamente conectadas, o embrião e o endosperma (Berleth & Chatfield, 2002).

Inicialmente, o zigoto sofre um alongamento de cerca de três vezes o seu tamanho. Em seguida, divide-se assimetricamente, gerando uma pequena célula apical e uma célula basal maior. Essas duas células diferem-se amplamente na composição e no seu padrão subsequente de divisão (Jenik *et al.*, 2007).

A maior parte do embrião maduro é derivada da célula apical. A célula apical contém citoplasma denso e é o local de grande atividade de síntese protéica, enquanto que a célula basal e seus descendentes são altamente vacuolados. Após duas divisões anticlinais e uma periclinal, a célula apical

dá origem ao embrião octante. Simultaneamente, a célula basal divide-se periclinalmente e produz uma estrutura filamentosa, o suspensor, e a hipófise (Berleth & Chatfield, 2002).

No estágio de octante, pelo menos quatro tipos celulares diferentes podem ser distinguidos: (1) o domínio apical, formado pelas quatro células superiores do embrião, que origina o meristema apical do caule e a maior parte dos cotilédones; (2) o domínio central do embrião, formado pelas quatro células inferiores do embrião, que formará o hypocótilo, a raiz e contribuirá para a formação de cotilédones e meristema apical da raiz; (3) o domínio basal, a hipófise, que originará a parte distal do meristema da raiz, o centro quiescente e as células-tronco centrais; e (4) o suspensor, tecido que provê conexão do embrião com o tecido materno. Todos esses tipos celulares não variam apenas na forma e posição relativa, mas também no perfil transcricional (Laux *et al.*, 2004; Jenik *et al.*, 2007).

O processo de desenvolvimento do suspensor é um pouco variável, embora as duas células terminais adotem destinos conservados. A célula mais apical, a hipófise, sofre uma sequência de divisões, dando origem à parte do meristema primário da raiz, que compreende o centro quiescente e as iniciais centrais (columela) da raiz. A célula mais basal do suspensor aumenta enormemente de tamanho e estabelece grande contato com os tecidos maternos circundantes, provavelmente facilitando o suprimento de nutrientes para o embrião (Berleth & Chatfield, 2002).

Ciclos de divisões periclinais separam uma camada externa das oito células precursoras da epiderme. A protoderme e as camadas internas logo se tornam morfologicamente distinguíveis entre os estágios em que o embrião apresenta oito e dezesseis células. Devido à predominância de divisões anticlinais na camada externa, a protoderme permanece essencialmente separada das células internas ao longo do desenvolvimento (Jenik *et al.*, 2007).

Enquanto o formato externo do embrião permanece globular, divisões de células internas já revelam a formação do eixo e a diferenciação regional. Inicialmente, as células internas sofrem divisões celulares de mesma orientação, na qual novas paredes celulares são alinhadas ao longo do eixo

apical-basal. Portanto, as células internas permanecem em duas camadas organizadas, mas o número de células é amplificado (Berleth & Chatfield, 2002).

No estágio globular tardio, o embrião assume gradualmente a forma triangular devido ao crescimento localizado em regiões de posições opostas no domínio apical. O embrião no estágio cordiforme precoce compreende aproximadamente duzentas células e o primórdio dos maiores órgãos da planta, cotilédones, hipocótilo e raiz primária, assim como tipos de tecidos básicos, provascular, protoderme e córtex são anatomicamente discerníveis (Taiz & Zeiger, 2006).

No embrião do estágio de torpedo, o interior de duas camadas de tecido fundamental é separado por divisões assimétricas e periclinais e resultam em camadas que adquirem identidades distintas, endoderme e parênquima cortical. Num grande número de espécies, é observada a existência de plasmodesmas entre o embrião e o tecido materno, em contraste com as várias conexões simplásticas dentro do embrião. A transição para o estágio cotiledonar coincide com a iniciação da raiz primordial e do ápice radicular. Neste estágio, a formação do embrião propriamente dito é finalizada (Berleth & Chatfield, 2002).

Mudanças fisiológicas, como a dessecação, completam o processo de formação da semente. O embrião de *Arabidopsis* entra em dormência após ter gerado, aproximadamente, vinte mil células e a maturação do embrião também requer expressão gênica específica. Para a adaptação da célula a condição especial de dormência, é necessária uma reprogramação da expressão gênica (Dodeman *et al.*, 1997).

O produto do gene *Abscisic Acid Insensitive 3 (ABI3)* é um fator transcricional que controla a expressão de genes que codificam proteínas armazenadas nos cotilédones durante a fase de maturação da embriogênese. Além de ABI3, foi visto que o gene *Leafy Cotyledon 1 (LEC1)* também é ativo na fase final da embriogênese. Os mutantes *lec1* não conseguem sobreviver à dessecação e por isso não entram em dormência. A aparência e o desenvolvimento normais dos mutantes *lec1* maduros

indicam que o gene LEC1 é necessário apenas durante a embriogênese (Taiz & Zeiger, 2006).

A análise de mutantes de *Arabidopsis* com falhas no estabelecimento da polaridade axial, ou com desenvolvimento anormal, possibilitou a identificação de genes relacionados à embriogênese. Por exemplo, foi visto que defeitos na síntese de esterol podem prejudicar a formação do eixo embrionário. Mutações no gene *Fackel* (*FK*) resultam em plantas jovens com hipocótilo muito reduzido, que ainda assim produzem os cotilédones e os meristemas caulinar e radicular. *FK* codifica uma redutase do esterol e mutações nesse gene são associadas com composição anormal de esterol, anomalias na divisão e alongamento celular (Taiz & Zeiger, 2006).

As mutações no gene *Monopteros* (*MP*) resultam em plântulas com ausência de hipocótilo e raiz, embora os mutantes sejam capazes de produzir a região apical. Entretanto, a estrutura apical de embriões *mp* mutantes não é aparentemente normal e os tecidos dos cotilédones são desorganizados. Os embriões *mp* inicialmente demonstram anormalidades no estágio octante e não formam o procâmbio, na parte inferior do embrião globular, porção que daria origem ao hipocótilo e à raiz. Posteriormente, o tecido vascular é formado nos cotilédones, porém os feixes são inapropriadamente conectados (Berleth & Jurgens, 1993).

Os genes Short Root (*SHR*) e Scarecrow (*SCR*) mostraram-se necessários para a diferenciação celular, não apenas no embrião, mas também em raízes primárias, secundárias e no hipocótilo. Mutantes *shr* e *scr* produzem raízes com uma única camada de tecido fundamental. As células pertencentes a essa única camada exibem uma identidade mista e demonstram características tanto de células endodérmicas quanto de células corticais. Essas plantas mutantes também perdem a camada de células correspondente à bainha amilífera (Taiz & Zeiger, 2006).

2.2 Embriogênese somática

2.2.1 Aquisição de competência embriogênica

Embora o processo de embriogênese em plantas tenha início com a união do núcleo espermático e da oosfera, células somáticas também

podem originar embriões sob condições especiais (Dodeman *et al.*, 1997). Este fenômeno ocorre exclusivamente em plantas, sendo possível devido às propriedades de totipotência e plasticidade genética das células vegetais (Verdeil *et al.*, 2007).

A embriogênese somática pode ocorrer de forma direta ou indireta. No processo de embriogênese somática indireta, as células precursoras passam por uma etapa intermediária de formação de calo, anterior à formação do embrião. Neste caso, fatores presentes no meio de cultura induzem a desdiferenciação das células somáticas e a iniciação da divisão celular, antes que elas possam expressar a competência embriogênica. Alternativamente, a embriogênese pode ocorrer pela via direta, a partir de células da superfície do tecido organizado (Guerra *et al.*, 1999).

As condições ideais para a indução da embriogênese somática em diferentes espécies de plantas são geralmente descobertas por meio de ensaios que visam analisar os efeitos de diferentes fatores no desenvolvimento de respostas morfogênicas do explante, tais como reguladores de crescimento, equilíbrio osmótico, pH e concentrações de nutrientes. Dessa forma, é possível determinar qual é a melhor combinação dos fatores e estabelecer protocolos de regeneração mais eficientes. Entretanto, a frequência de indução de embriões não depende apenas das condições de cultivo, mas também do genótipo (cultivar/espécie), tipo de explante, estágio de desenvolvimento e níveis endógenos de hormônios (Namasivayam, 2007).

As auxinas são os principais agentes utilizados para indução de embriogênese somática, estando envolvidas na mediação da transição do estágio somático para o embriogênico (Chugh & Khurana, 2002). Entre os análogos de diferentes auxinas utilizadas para indução de embriogênese somática, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) tem se mostrado mais estável e eficiente e, portanto, é o regulador de crescimento sintético mais utilizado nos sistemas de cultura de tecidos (Fehér *et al.*, 2003).

Durante a transição do estado somático para o embriogênico, as células precisam se desdiferenciar e ativar o seu ciclo de divisão celular por meio de alterações fisiológicas, metabólicas e dos padrões de expressão

gênica. Os animais são capazes de responder a sinais externos através de alterações de comportamento, enquanto que as plantas se adaptam às condições ambientais por meio da reprogramação dos padrões de expressão gênica (Namasivayam, 2007).

Além da utilização da auxina como o principal indutor da embriogênese, outros reguladores de crescimento, tais como citocininas ou ácido abscísico (ABA), e diversos compostos de indução de estresse oxidativo, estresse osmótico e íons de metais pesados foram capazes de influenciar positivamente a indução de embriões somáticos em diversas espécies (Fehér *et al.*, 2002). Essas alterações foram associadas ao aumento da expressão de diversos genes relacionados ao estresse, evocando a hipótese de que a embriogênese somática é um processo de adaptação de células às condições *in vitro* (Dudits *et al.*, 1995).

Os níveis hormonais endógenos podem ser considerados fatores importantes na determinação da especificidade das respostas celulares aos estímulos de estresse. Durante os últimos anos, diversos trabalhos mostraram a importância dos níveis endógenos de ácido indol-acético (IAA) e ácido abscísico (ABA) durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário. Em um experimento de cultura de tecidos de cenoura, pesquisadores relataram que a suplementação do meio de cultura com 2,4-D estimulou o acúmulo de grandes quantidades de AIA endógeno. Dessa forma, foi sugerido que o 2,4-D, acima de uma determinada concentração, tem um efeito duplo no desenvolvimento das culturas *in vitro*, seja como auxina (diretamente ou através do metabolismo AIA endógeno) ou como um estressor (Fehér *et al.* 2001).

2.2.2 O papel do gene *SERK* na indução de competência

A indução de embriões somáticos *in vitro*, além de permitir a propagação vegetativa e a conservação do germoplasma, fornece um bom modelo experimental para a realização de estudos que visam à elucidação das bases celulares e moleculares do processo de desenvolvimento das plantas (Fehér *et al.*, 2003., Sharma *et al.*, 2008).

Alguns pesquisadores tentaram descrever diferenças morfológicas e celulares que estariam relacionadas com a aquisição de competência embriogênica. No entanto, não foi possível identificar um marcador estrutural ou fisiológico reprodutível, que pudesse então ser aplicado a diversas espécies de plantas (Namasivayam, 2007).

A identificação de genes relacionados à embriogênese somática tem sido realizada por meio de análises de expressão gênica diferencial em explantes submetidos a condições favoráveis para a formação de embriões somáticos, em comparação a explantes não submetidos à indução. Alguns genes identificados são expressos apenas durante o processo de indução da embriogênese somática, enquanto outros têm sua expressão verificada durante o processo de diferenciação do embrião, até o completo desenvolvimento da planta (Zimmerman, 1993).

Dois grupos de genes envolvidos na aquisição de competência embriogênica em *Arabidopsis* foram identificados: (1) reguladores negativos como *Primordial Timing (PT)*, *Clavata (CLV)* e *Pickle (PKL)*; e (2) reguladores positivos associados a um aumento de competência embriogênica após a expressão ectópica, sem aplicação externa de hormônios, como *Agamous-Like15 (AGL15)*, *Baby Boom (BBM)*, *Wuschel (WUS)*, *Leafy Cotyledon 1 e 2 (LEC1 e 2)* e *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 (SERK1)* (Schellenbaum *et al.*, 2008).

Vários experimentos que tentaram correlacionar o potencial embriogênico ao padrão de expressão de genes específicos levaram à identificação dos genes *SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase)* em diversas espécies de plantas (Baudino *et al.*, 2001).

O produto do gene *SERK* é uma proteína que apresenta um peptídeo sinal, um zíper de leucina, um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR), um domínio rico em prolina (SPP), um domínio transmembrana (TM) e um domínio cinase intracelular. Essas proteínas pertencem à superfamília de receptores do tipo cinase (*RLK-Receptor like kinases*) e parecem estar envolvidos em rotas de transdução de sinais (Santos *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2008; Pérez-Nunez *et al.*, 2009).

Receptores do tipo cinase são essenciais em diversos processos do desenvolvimento de plantas, devido a sua atuação em rotas de transdução de sinais que geram respostas celulares a sinais externos (Salaj *et al.*, 2008). Na presença de ligantes extracelulares, RLKs sofrem mudanças na conformação, que resultam na fosforilação de proteínas-alvo intracelulares. Esses receptores atuam em vias de sinalização celular em diversos processos de desenvolvimento das plantas, resistência a doença e auto-incompatibilidade (Baudino *et al.*, 2001).

O primeiro gene *SERK* foi identificado em células de cenoura (*Daucus carota*), como resultado de uma triagem de genes expressos em culturas embriogênicas. O gene *DcSERK* mostrou ser expresso no início do processo de indução de embriogênese somática, sendo detectado até o estágio de embrião globular (Schmidt *et al.*, 1997).

Hecht e colaboradores (2001) verificaram a existência de cinco genes *SERK* em *Arabidopsis*. A expressão de um desses genes, denominado *AtSERK1*, foi correlacionada com o processo de formação de células embriogênicas (Salaj *et al.*, 2008).

Plantas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *AtSERK1* exibiram aumento de cerca de três a quatro vezes na eficiência de iniciação de embriões. A atuação de *AtSERK1* e *AtSERK2* também foi associada ao controle da esporogênese masculina, principalmente no desenvolvimento do tapete e maturação do micrósporo (Hecht *et al.*, 2001).

O gene *SERK* também foi isolado em *Medicago truncatula*. O papel de *MtSERK1* foi associado ao processo de indução de embriogênese somática, no qual grandes níveis de expressão foram detectados quando os explantes foram submetidos simultaneamente a indução com ANA e BAP (Nolan *et al.*, 2003).

Em *Theobroma cacao*, *TcSERK* mostrou-se altamente expresso nos estágios iniciais de desenvolvimento de calos embriogênicos, embora também tenha sido detectado em embriões somáticos maduros e embriões zigóticos, sugerindo que o seu papel não é restrito à indução de aquisição embriogênica (Santos *et al.*, 2005).

Em espécies de plantas monocotiledôneas, como o milho, a expressão de genes da família *SERK* também foi associada com o processo de embriogênese somática, embora a expressão de *ZmSERK1* e *ZmSERK2* não seja restrita às células embriogênicas. Observou-se que *ZmSERK1* é preferencialmente expresso em tecidos reprodutivos, enquanto a expressão de *ZmSERK2* foi aparentemente uniforme nos tecidos analisados (Baudino *et al.*, 2001).

O isolamento e a caracterização de genes *SERK* em diversas espécies de plantas revelou que estes genes constituem uma pequena família de receptores do tipo cinase, apresentando cinco membros em *Arabidopsis* (Hecht *et al.*, 2001), três em milho (Baudino *et al.*, 2001), e pelo menos um em batata (Sharma *et al.*, 2008), coco (Pérez-Nunez *et al.*, 2009) e *Medicago truncatula* (Nolan *et al.*, 2009).

2.3 Transformação genética de plantas

A transformação de plantas é uma técnica que oferece estratégias para superexpressão ou supressão de genes endógenos. Além disso, a introdução de novos genes ou manipulação da expressão de genes endógenos gerou uma ferramenta útil para a investigação de funções gênicas (Somers *et al.*, 2003).

De acordo com Santarém (2000), as técnicas de transformação genética de plantas têm permitido acelerar o melhoramento vegetal, gerando variedades com desempenho superior e adaptadas ao ambiente de cultivo. Os métodos de transferência de genes podem variar em eficiência e aplicabilidade, dependendo da espécie e/ou do tecido-alvo da transformação.

Sistemas de transformação requerem o desenvolvimento de uma fonte de células totipotentes que servem como hospedeiro para o DNA exógeno, um vetor de entrega do DNA à célula alvo e um sistema capaz de selecionar ou identificar as células transformadas (Somers *et al.*, 2003).

Os métodos de transformação utilizados na produção de plantas geneticamente modificadas podem ser classificados como diretos e indiretos. Os métodos diretos de transformação são aqueles que provocam

modificações nas paredes e membranas celulares para introdução de DNA exógeno, através de processos físicos ou químicos. Diversos métodos como a eletroporação de protoplastos, a transformação mediada por polietilenoglicol e a aceleração de partículas, têm sido propostos, variando em termos de eficiência e praticidade (Fisk & Dandekar, 1993; Santarém, 2000).

O método indireto requer a utilização de um vetor biológico para a introdução do DNA na planta (Santarém, 2000). Os vetores mais utilizados são derivados de *Agrobacterium tumefaciens* (Gelvin *et al.*, 2003) e *Agrobacterium rhizogenes* (Tepfer *et al.*, 1987; Tiwari *et al.*, 2008), patógenos vegetais com a capacidade de transferir parte de seu DNA para o genoma da planta.

A transferência de genes mediada por *Agrobacterium* é bastante empregada, em razão de sua conveniência e da alta probabilidade de integração de uma ou poucas cópias do gene introduzido. Plantas transgênicas têm sido desenvolvidas para as principais espécies cultivadas, expressando aumento da qualidade nutricional ou resistência a herbicidas, insetos ou fungos (Santarém, 2000).

Para que o processo de transformação seja efetivo, o DNA deve ser introduzido em células vegetais aptas a regenerar plantas completas. Em muitas situações, a esterilidade total ou parcial das plantas transgênicas pode consistir numa grande barreira para a sua regeneração. Portanto, para iniciar os trabalhos de transformação, os aspectos relacionados à regeneração de plantas, através da cultura de tecidos, devem ser completamente elucidados (Santarém, 2000).

As vantagens do uso de embriões somáticos como hospedeiros do DNA exógeno incluem a transformação de tecidos embriogênicos pré-determinados (os clones transformados serão embriogênicos) e a habilidade de aplicar a seleção contínua para eliminar falsos clones (Finer & McMullen, 1991). Grandes quantidades de embriões podem ser formadas em suspensões de células com um mínimo de manipulação e espaço físico de laboratório, principais componentes do custo da micropropagação de plantas (Torres *et al.*, 1998).

Expandir a gama de genótipos dentro das espécies que são recalcitrantes à manipulação *in vitro* proveria uma grande contribuição na melhoria dos sistemas de transformação. Este avanço pode ser obtido tanto pelo método convencional de manipulação da composição do meio de cultura (tipo e concentração de fitormônios) e fonte de explante (tipo, idade), ou, alternativamente, através da superexpressão de genes que possam contribuir para a melhoria da resposta embriogênica e da capacidade de regeneração das plantas (Somers *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo identificar e determinar o padrão de acúmulo de mRNA correspondente ao gene que potencialmente codifica a proteína SERK em soja, em cotilédones imaturos mantidos em meio de cultivo para indução de embriões somáticos. Para atingir estes objetivos, foram realizadas as seguintes etapas:

- Identificação e caracterização *in silico* das regiões candidatas a codificar o gene *SERK* em soja, a partir de sequências retiradas do banco de dados de soja (Phytozome);
- Desenho de *primers* para a amplificação de um fragmento dos genes que potencialmente codificam a proteína SERK;
- Indução de embriões somáticos a partir de cotilédones imaturos das cultivares de soja CAC-1 e CS303;
- Clonagem dos fragmentos dos genes *SERK* no vetor pSPT18 e sequenciamento dos clones transformantes recombinantes;
- Síntese das sondas de RNA *antisense* para o monitoramento do acúmulo de mRNA correspondente ao gene *SERK*;
- Hibridização *in situ* em cortes histológicos de cotilédones imaturos de soja, cultivados em meio de cultivo para a indução de embriogênese somática.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análises “*in silico*”

4.1.1 Seleção de genes candidatos a codificar a proteína SERK

Com o intuito de verificar a existência de sequências similares ao gene *SERK* em soja, foi realizada uma pesquisa nos bancos de dados do NCBI e TIGR. A partir da sequência codificante de genes *SERK* de espécies como cenoura (*DcSERK*), *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK1*, *AtSERK2*) e *Medicago truncatula* (*MtSERK1*) como protótipos, foram realizadas buscas no banco de dados de soja *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/>), a fim de localizar as possíveis regiões candidatas a codificar uma proteína SERK em soja.

4.1.2 Predição de domínios conservados

A partir do alinhamento de sequências, realizado no *Phytozome*, foram selecionados os dez locos que apresentaram maior identidade com as sequências utilizadas como protótipos, para a realização de análises que possibilitassem a classificação das proteínas correspondentes. As predições dos domínios conservados das proteínas foram realizadas pelos softwares “PROSITE” (<http://www.expasy.org/prosite/>) e “PROSCAN” (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html).

A existência e a localização do peptídeo sinal foram verificadas por meio da utilização do *software* “SignalP 3.0 Server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Já a predição da localização subcelular das proteínas foi realizada por meio do *software* “PSORT” (<http://psort.hgc.jp/form.html>), enquanto que a predição de hélices transmembranas foi realizada por meio da utilização do *software* “SOSUI” (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html). Para o alinhamento múltiplo das diversas proteínas SERK, utilizou-se o *software* “ClustalW” (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

4.1.3 Caracterização da região promotora

Cerca de 1.500 pb da região promotora de cada gene candidato a codificar a proteína SERK foram analisados pelo software PLACE (Plant Action *Cis* Element), disponível no endereço <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>, para a identificação, por meio de alinhamento, de *cis*-elementos que possivelmente estão relacionados com o processo de indução de embriogênese somática.

4.2 Material vegetal e cultivo asséptico

Para os ensaios de cultura de tecidos, foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) das cultivares CAC-1 e CS303, cultivadas em casa de vegetação sob aquecimento controlado e fotoperíodo de 14 h de luz. Aproximadamente 15 a 20 dias após o florescimento, vagens imaturas apresentando sementes de 4 a 6 mm de comprimento foram coletadas.

A desinfestação do material foi feita por imersão em etanol 70% (v/v) por 2 min e um tratamento com hipoclorito de sódio 2,5% acrescido de Tween 20 0,01%, por 20 min. Após quatro lavagens com água destilada estéril, para remoção do excesso de hipoclorito, as vagens foram dissecadas com auxílio de pinças e bisturis. As sementes foram individualizadas, o eixo embrionário foi retirado e os pares cotiledonares foram transferidos para o meio de indução com a fase abaxial em contato com o meio (Santarém *et al.*, 1997). Todos esses procedimentos foram realizados em condições assépticas em câmara de fluxo laminar.

No processo de indução de embriogênese somática, os explantes foram cultivados em placa de Petri estéril (90 x 15mm) com meio MSD40 (Finer & Nagasawa, 1988), contendo sais de MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), sacarose 3%, Gelrite® 0,2% e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) 40 mg/L, pH 7,0. As placas foram vedadas com filme plástico de PVC para impedir a entrada e o crescimento de microrganismos contaminantes no meio de cultura. O material foi incubado à temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 h de luz e irradiância de $24\text{-}36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os explantes permaneceram no meio

MSD40 por até 40 dias, sendo que a cada três dias foram coletadas amostras para a extração de RNA e fixação em paraformaldeído 4%.

4.3 Identificação e clonagem dos genes *SERK*

4.3.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total de cotilédones imaturos de soja foi realizada com o reagente Brazol (LGC Biotecnologia), segundo o protocolo do Trizol (Invitrogen). Todas as etapas de extração foram realizadas a 4°C e em condições livres de ribonucleases.

Amostras de cotilédones imaturos de soja cultivados em meio MSD40 foram coletadas a cada três dias (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de indução) para a extração de RNA total. Cerca de 150 mg de cotilédones de cada cultivar foram macerados individualmente em 500 µL de Brazol, utilizando o pistilo do aparelho Politron, até a total homogeneização da solução. Em seguida, o material foi transferido para um tubo de 2 mL, ao qual foram adicionados mais 500 µL do reagente Brazol. As amostras foram homogeneizadas no vórtex por 15 s. Após uma incubação a 25°C por 5 min, a solução foi centrifugada por 10 min a 12.000 x *g* à 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 250 µL de clorofórmio. O material foi novamente homogeneizado no vórtex e incubado a 25°C por 3 min.

Após a centrifugação por 15 min a 12.000 x *g* à 4°C, a fase superior foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e submetida à precipitação com 500 µL de isopropanol gelado por 2 h a -20°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 x *g* à 4°C e o precipitado resultante foi lavado com 250 µL de etanol 70% e seco à temperatura ambiente. Cada amostra foi ressuspensa em 30 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Após a extração, as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro a 260 nm e analisadas em gel de agarose 1,5%.

4.3.2 Tratamento das amostras de RNA e síntese do cDNA

Para utilização nas reações de RT-PCR, as amostras de RNA total foram previamente tratadas com *RQ1 RNase-free DNase* (Promega), com o

objetivo de eliminar a contaminação com DNA. Cerca de 40 µg de RNA de cada amostra foram incubados em tampão da DNase 1X (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0; MgSO₄ 10 mM e CaCl₂ 1 mM), 8U de enzima DNase e água q.s.p. 100 µL por 55 min/37°C. Em seguida, foi realizada a desproteínização com igual volume (50 µL) de fenol e de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram agitadas no vórtex por 1 min e centrifugadas a 12.000 x g por 2 min a 4 °C.

A fase superior foi transferida para um novo tubo, no qual foi realizada uma nova extração com 100 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase superior resultante foi submetida à precipitação com 30 µL acetato de sódio 3 M e 250 µL etanol 95% por 2h a -20°C e posteriormente centrifugada por 15 min a 12.000 x g. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µL água DEPC. As amostras foram novamente quantificadas em espectrofotômetro e sua qualidade foi analisada em gel de agarose 1,5%.

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se a enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Cerca de 1 µg de RNA total dos cotilédones imaturos de cada tratamento foi incubado com 1 µL de oligo(dT)₁₂₋₁₈, 1 µL dos quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) 10 mM cada e água q.s.p. 13 µL a 65°C por 5 min e em seguida, mantidos no gelo por 1 min. A seguir, foram adicionados 4 µL do tampão First Strand 5X, 1 µL de DTT 0,1 mM, 1 µL *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* e as amostras foram incubadas a 37°C por 2 min. Posteriormente, foram adicionadas 200 U da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase*. As amostras foram incubadas a 37°C por 50 min e a reação foi inativada por aquecimento a 70°C por 15 min. Para cada amostra foi feito um controle negativo contendo todos os reagentes, exceto a transcriptase reversa.

4.3.3 RT-PCR Convencional

A verificação da eficiência do processo de tratamento das amostras de RNA total com DNase foi realizada por meio da amplificação do cDNA

com *primers* de actina de soja (*Forward*: 5' CCC CTC AAC CCA AAG GTC AAC AG 3' e *Reverse*: 5' GGA ATC TCT CTG CCC CAA TTG TG 3'). Cada reação de amplificação de 20 µL continha 1 µL da reação de síntese da primeira fita, 4 µL do tampão de PCR IVB 5X (Phoneutria), 0,25 mM de cada um dos quatro dNTPs, 0,5 µM de cada *primer* e 1U de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria).

Os ciclos de amplificação da reação de PCR foram constituídos por uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 30 ciclos constituídos por uma segunda etapa de desnaturação a 94°C por 30 s, uma etapa de anelamento a 56°C por 30 s e uma etapa de extensão a 72°C por 20 s. Após o 30º ciclo foi realizado um passo final de extensão a 72°C por 4 min.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Mastercycler® ep/Eppendorf®) e os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

Os oligonucleotídeos específicos para amplificação dos genes alvos foram construídos com base em seqüências codificantes retiradas do banco de dados de soja *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/>). Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa *Primer3 Input v. 0.4.0* (<http://frodo.wi.mit.edu>) e os sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas *EcoRI* e *KpnI* foram adicionados à extremidade 5' dos *primers forward* e *reverse*, respectivamente (Tabela 1).

Para a detecção e isolamento dos genes de interesse, as reações de síntese da segunda fita de cDNA foram realizadas com os *primers* específicos sintetizados, usando como molde a reação de síntese da primeira fita de cDNA.

As reações de amplificação do gene alvo foram constituídas por uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min; 60°C por 1 min; 72°C por 1 min. Após o 30º ciclo, foi realizado um passo final de extensão a 72°C por 4 min.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes *SERK* em soja. As bases sublinhadas indicam os sítios para as enzimas de restrição.

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência	Enzima de restrição
<i>GmSERK1</i>	Glyma10F	5' GGCGAATTCTGGCCTTAGGTTTCATTTGG 3'	<i>EcoRI</i>
	Glyma10R	5' GGCGGTACCAAAGCTACTCTTTTCCGGGT 3'	<i>KpnI</i>
<i>GmSERK2</i>	Glyma 20F	5' GAGAATTCGTCAACTTGTTCCGCAGCTT 3'	<i>EcoRI</i>
	Glyma 20R	5' ATGCCAGGTACCAAGCTATTCTTTTCTAGTT 3'	<i>KpnI</i>
<i>GmSERK3</i>	Glyma 02F	5' GAGAATTCCTCCAATCTCAGCTCCAGAAG 3'	<i>EcoRI</i>
	Glyma 02R	5' GAGGTACCGGTCCATAGGGGAACCTTGT 3'	<i>KpnI</i>

4.4 Produção da sonda *antisense*

4.4.1 Clonagem dos fragmentos no vetor pSPT18

Os fragmentos amplificados dos genes *SERK* foram clonados no vetor *pSPT18*, de acordo com as recomendações do fabricante (Roche Applied Science). O vetor, contendo o inserto, foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α por choque térmico, segundo Sambrook *et al.* (1989).

Para a transformação, foram adicionados 5 μ L da reação de ligação a 50 μ L de células ultracompetentes em um microtubo e este foi incubado no gelo por 20 min. O choque térmico foi realizado a 42°C por 50 s, seguido de uma incubação no gelo por 2 min. Para a recuperação das células, foram adicionados 800 μ L de meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, NaCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM, KCl 2,5 mM e 20% de glicose) e a cultura foi incubada a 37°C por 1 h a 150 rpm. Após esse período, as células foram concentradas por centrifugação a 5.000 g por 10 min, ressuspensas em 100 μ L de meio SOC e plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (50 μ g/mL). As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 15 h.

Para a análise dos transformantes, foram selecionadas algumas colônias brancas e o diagnóstico para a confirmação foi feito por meio de PCR. As colônias que mostraram a amplificação do produto esperado foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16 h sob agitação de 180 rpm. Após o crescimento, as bactérias foram aliquotadas em glicerol 25%, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

O isolamento de DNA plasmidial foi feito pelo método de purificação em colunas, utilizando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante, com exceção do uso da enzima RNase. As amostras de DNA plasmidial foram utilizadas em ensaios de PCR com os *primers* específicos e em reações de restrição enzimática para a confirmação da clonagem.

Posteriormente, os plasmídeos foram linearizados por meio da digestão de 60 µL de DNA plasmidial com a enzima *EcoR1*, acrescida de 10 µL de tampão da enzima num volume total de 100 µL. A reação ocorreu em banho-maria por 2 horas, a 37°C, sendo posteriormente aquecida a 70°C, com o objetivo de inativar a enzima.

O DNA plasmidial digerido foi precipitado com a adição de 10 µL de acetato de sódio 3M e 500 µL de etanol absoluto gelado e mantido a -20 por 2h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm à 4°C e o excesso de sal foi retirado lavando-se o precipitado com 1 mL de etanol 70%. Depois de seco, o precipitado de DNA plasmidial foi ressuspendido em 13 µL de água tratada com DEPC.

4.4.2 Sequenciamento

O sequenciamento dos clones recombinantes foi realizado pela empresa MacroGen, em sequenciador automático 3730XL™ de 96 capilares (Applied Biosystems), utilizando o kit *BigDye™ XTerminator®* (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram os mesmos usados para a amplificação dos fragmentos dos genes *SERK*.

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa *Sequencher™* versão 4.1.4 (Genes Code Corporation) e a busca por

similaridades com outras sequências depositadas no *Genbank* foi feita usando o algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

4.4.3 Marcação da sonda *antisense*

A sonda de RNA *antisense* foi marcada com digoxigenina (DIG-UTP), utilizando-se para tanto o “DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)”, segundo recomendações do fabricante (Roche Applied Science). Além dos 13 µL do vetor linearizado, a reação foi composta por 2 µL da mistura de NTPs (ATP, CTP, GTP, UTP e UTP-DIG) a 10 mM cada, 40 U de inibidor de RNase, 40 U da enzima RNA polimerase (SP6 ou T7) e 2 µL do tampão 10 X da enzima. A reação ocorreu em termociclador por 2 h a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 80 µL de água DEPC ao tubo que continha o RNA marcado, que foi armazenado em freezer – 20°C até a sua utilização nos experimentos de hibridização *in situ*.

4.5 Hibridização *in situ*

Os cotilédones submetidos à indução de embriogênese somática foram coletados em diversos períodos de cultivo (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 27 e 30 dias) e imersos em paraformaldeído 4% (p/v) *overnight*, sob temperatura de 4°C. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente (30% a etanol absoluto) e armazenadas em etanol absoluto a -20°C até a sua inclusão em parafina.

Para o preparo dos cortes histológicos, as amostras armazenadas foram infiltradas em solução de etanol:xilol, nas concentrações de 3:1, 1:1, 1:3, a cada 4 horas, seguido de xilol (100%) por 8 horas. As amostras foram então transferidas para estufa a 65°C e gradativamente infiltradas com parafina (4-5 dias). Em seguida, o material foi incluído em parafina fresca, com auxílio de suportes feitos de papel. Os cortes histológicos semi-finos (8 µm) foram montados sob lâminas previamente tratadas com solução de acetona:3-aminopropil-trietoxi-silano (2%).

A técnica de hibridização *in situ* compreendeu as seguintes fases:

Pré-hibridização: as lâminas preparadas passaram pelo processo de desparafinização, utilizando-se banhos com xilol (100%), solução xilol:etanol

nas concentrações 3:1, 1:1 e 1:3 e etanol absoluto. Depois de secas ao ar, as lâminas foram tratadas com proteinase K ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5) por 10 minutos a 37°C e lavadas duas vezes em água tratada com DEPC, à temperatura ambiente.

Hibridização: aproximadamente 300 μL do mix de hibridização (1M Tris-HCl; 5M NaCl; formamida deionizada; 0,5 M EDTA; Denharts; 50% dextran sulfato) contendo 300-600 ng.mL^{-1} da sonda do gene *GmSERK1* ou *GmSERK3* marcadas com DIG-UTP foram adicionados sobre as lâminas, que foram cobertas com parafilme. A hibridização foi conduzida *overnight* a 42°C .

Pós-hibridização: foram realizadas duas lavagens de 30 minutos cada, a 42°C . A primeira foi realizada com SSC 4x (NaCl 0,6 M; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,06 M) e segunda com SSC 2x (NaCl 0,3 M; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 M). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água DEPC por três vezes de 1 min cada.

Imunodeteção: o material foi tratado com a solução DB1 (Tris-HCl 1 M; NaCl 5 M; pH 7,5) por 5 minutos, seguido por 30 minutos em solução bloqueadora DB2 (1% reagente de bloqueamento Roche, dissolvido em DB1) e novamente por 1 minuto em DB1. A detecção da sonda foi realizada com anticorpo anti-DIG conjugado à fosfatase alcalina, diluído em solução de bloqueamento DB2 (1:1000) e mantida por 1 h em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes de 15 min cada em DB1 e por 5 min em DB3 (Tris-HCl 1 M; NaCl 5 M; MgCl_2 1 M; pH 9,5). Para a visualização do sinal, foi utilizada uma solução comercial de NBT/BCIP, substrato da fosfatase alcalina. O material foi mantido no escuro durante um período *overnight* e a preparação das lâminas permanentes foi realizada na manhã seguinte, utilizando-se a resina de montagem *Entellan* (Merck). A observação das lâminas e o registro fotográfico foram realizados em microscópio invertido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação e caracterização dos genes *SERK* de soja

Através da busca por sequências similares ao gene *SERK* em soja, realizada nos bancos de dados do NCBI e TIGR, verificou-se que o acesso do GenBank nº EU869193, denominado *GmSERK1*, corresponde a um possível candidato a codificar uma proteína *SERK* em soja, embora nenhum trabalho de caracterização deste gene tivesse sido publicado.

Durante a realização deste trabalho, Yang e colaboradores (2010) publicaram um trabalho caracterizando o gene *GmSERK1* em soja. Por meio de análises de expressão transiente em células epidérmicas e RT-PCR, esses pesquisadores mostraram que o gene *GmSERK1* codifica uma proteína que se localiza na membrana plasmática e que supostamente está envolvida no processo de embriogênese somática.

Das regiões do genoma de soja que apresentaram maior identidade de sequência com os genes *SERK* de outras espécies, foram selecionados dez locos para a predição de domínios conservados e a classificação das proteínas correspondentes. Por meio do alinhamento de sequências, verificou-se que o gene correspondente ao loco *Glyma10g36280* foi o que apresentou maior identidade com a sequência codificante de *GmSERK1* (EU869193).

As análises *in silico* do presente trabalho, realizadas a partir da sequência de aminoácidos de *GmSERK1*, confirmaram que a proteína predita pertence à família *SERK*. Nossos resultados mostraram que a proteína *GmSERK1* apresenta todos os domínios característicos da família *SERK*, incluindo cinco repetições ricas em leucina, uma região rica em prolina e os domínios transmembrana e cinase (Figura 1).

Com o auxílio do *software* “SignalP 3.0 Server” foi possível prever um peptídeo sinal localizado na região N-terminal da proteína *GmSERK1*, com provável ponto de clivagem entre os resíduos 27 e 28. Adjacente ao sítio de clivagem do peptídeo sinal, foi verificada a existência de um domínio rico em leucina com cerca de 45 aminoácidos, contendo o motivo conservado de zíper de leucina LX₆ LX₆ LX₆L.

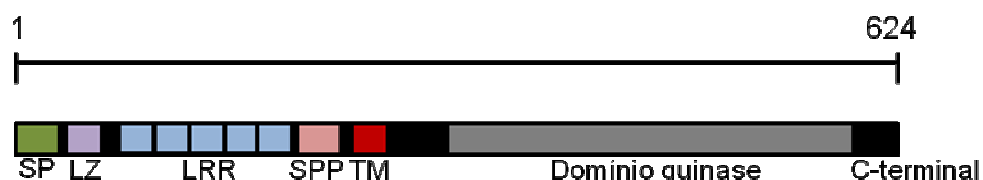


Figura 1. Desenho esquemático da estrutura da proteína GmSERK1, apresentando todos os domínios conservados. *SP*- peptídeo sinal; *LZ*- zíper de leucina; *LRR*- repetições ricas em leucina; *SPP*- região rica em prolina, *TM*- região transmembrana.

A existência de domínios de zíper de leucina foi confirmada em todas as proteínas SERK estudadas em diversos organismos, com a exceção de DcSERK (Schmidt *et al.*, 1997). A presença deste domínio parece estar correlacionada com a capacidade de oligomerização das proteínas.

Shah e colaboradores (2001) relataram que a eliminação da região que codifica o zíper de leucina na proteína SERK1 de *Arabidopsis* levou à perda da sua capacidade de dimerização, e consequentemente, apenas formas monoméricas de AtSERK1 foram identificadas. A dimerização dos receptores cinase ocorre na presença de ligantes externos, que estimulam a autofosforilação de ambos os monômeros e permitem o estabelecimento de sua conformação ativa.

A caracterização estrutural da proteína GmSERK1 também permitiu a predição de um domínio composto por 5 repetições ricas em leucina (LRR). O domínio LRR engloba a região correspondente aos resíduos de aminoácidos 72 a 192.

As repetições ricas em leucina da proteína GmSERK1 compartilham as seguintes características conservadas entre as LRR de plantas: apresentam 24 aminoácidos, estão supostamente localizadas extracelularmente e possuem todos os aminoácidos que caracterizam a sequência consenso. A respeito do número de repetições de leucina, a família SERK apresenta uma pequena quantidade, em comparação com a média de LRRs de outros tipos de LRR-RLKs (Baudino *et al.*, 2001).

Proteínas contendo domínios LRR foram identificadas em diversos organismos, desde bactérias até humanos, e compartilham apenas duas

características básicas: a presença de sequências repetitivas e o envolvimento em interações com proteínas. O dobramento dos domínios ricos em leucina depende do número de repetições presentes na proteína e parece estar diretamente correlacionado com a sua função. Em proteínas que apresentam várias LRR, estas parecem se organizar em uma estrutura em forma de ferradura, que promove a interação da proteína com outros ligantes (Kobe & Deseinhofer, 1995).

Na maior parte dos receptores ricos em leucina, as LRR são encontradas imediatamente adjacentes à região transmembrana. Entretanto, foi observado que uma região rica em prolina (SPP) antecede a região transmembrana da proteína *GmSERK1*, assim como descrito nas demais proteínas pertencentes à família SERK. O motivo SPP parece ser responsável por prover flexibilidade à região extracelular do receptor (Hetch *et al.*, 2001).

Em relação à organização gênica, observou-se uma grande conservação da estrutura de íntrons/éxons no gene *GmSERK1*, que é também característica dos membros da família SERK. A região codificante se organiza na forma de 11 éxons, que coincidem com os seguintes domínios funcionais: o éxon 1 codifica o peptídeo sinal, o éxon 2 codifica um suposto zíper de leucina, os éxons 3-6 codificam as repetições ricas em leucina (LRR), o éxon 7 uma região rica em prolina (SPP), o éxon 8 um domínio transmembrana e os éxons 9-11 o domínio de proteína cinase.

Os genes correspondentes aos locos *Glyma20g31320* e *Glyma02g08360* também apresentaram alta identidade com os genes *SERK* identificados em outras espécies de plantas, sendo potenciais candidatos a codificar proteínas SERK em soja. Entretanto, as predições realizadas por meio da utilização do *software* “SignalP 3.0 Server” verificaram a ausência da região correspondente ao peptídeo sinal. A predição da localização subcelular de *Glyma20g31320* e *Glyma02g08360*, realizada com auxílio da ferramenta PSORT (*Protein Subcellular Localization Prediction*), revelou que a localização das proteínas preditas na membrana plasmática é improvável.

Com o objetivo de verificar se, de fato, a ausência do peptídeo sinal é uma característica das proteínas preditas ou fruto de erros na predição das

ORFs, cerca de 1.000 pb da sequência genômica a montante da região codificadora dos locos *Glyma20g31320* e *Glyma02g08360* foram obtidos e analisados.

Por meio da tradução manual da sequência genômica imediatamente adjacente à região 5' do loco *Glyma20g31320*, foi verificada a presença de um provável peptídeo sinal. A predição da localização subcelular da proteína completa revelou o potencial de *Glyma20g31320* codificar uma provável proteína de membrana. A grande conservação da estrutura de íntrons/éxons dos membros da família SERK também foi observada. Baseando-se nessas evidências, o gene *Glyma20g31320* foi identificado como um membro da família SERK, sendo denominado *GmSERK2*.

Com base nas análises da sequência genômica a montante da região codificadora do gene *Glyma02g08360*, também foi possível prever a existência de um provável peptídeo sinal. Entretanto, a região que supostamente codifica o peptídeo sinal não foi encontrada imediatamente adjacente à região codificadora de *Glyma02g08360*, sendo separada por um íntron de aproximadamente 675 pb.

Em virtude da presença deste íntron, a predição das ORFs através de *softwares* especializados pode ter sido prejudicada e levou à geração da sequência incompleta da proteína, que foi depositada no banco de dados *Phytozome*. Dessa forma, a localização do peptídeo sinal só foi possível através do alinhamento dos 1.000 pb da sequência 5' de *Glyma02g08360* com a sequência codificadora do peptídeo sinal do gene *GmSERK1*. Assim como *Glyma10g36280* e *Glyma20g31320*, o loco *Glyma02g08360* foi identificado como um novo membro da família SERK em soja, sendo denominado *GmSERK3*.

A busca por cis-elementos nas regiões promotoras de *GmSERK1*, *GmSERK2*, *GmSERK3* permitiu a identificação de potenciais elementos reguladores como: motivos "TGACG" e "TGACGTGGC", compartilhados por *GmSERK1*, *GmSERK2*, motivo "CATATG", compartilhado entre *GmSERK2*, *GmSERK3* e o motivo "CWWWWWWWWG", compartilhado entre os três genes SERK de soja.

Liu e colaboradores descreveram que o motivo “TGACGTGGC”, presente no promotor de soja GH3, é um dos responsáveis por promover a responsividade à auxina, observada poucos minutos após a aplicação do hormônio (Liu *et al.*, 1994). Os motivos “TGACG”, identificado como um sítio de ligação para ASF-1; “CATATG”, presente no promotor de soja SAUR (Li *et al.*, 1994); e “CWWWWWWWWG”, sítio de ligação para AGL15 (Tang & Perry, 2003), também são sítios de promotores rapidamente e especificamente ativados em resposta a presença de auxinas.

	SP	LZ	
GmSERK1	-MERKFMALGFI--WWVVVHPLCLISANMEGDALHSLRNLQDPNNVLQSWDPTLVNPC		57
GmSERK2	MMERKFMALGFI--WWVVVLVHPLCLISANMEGDALHSLRNLQDPNNVLQSWDPTLVNPC		58
GmSERK3	-MERELWGSVFI--YWVLLARPLWLVSANMEGDALHSLRNLQDPNNVLQSWDPTLVNPC		57
MtSERK1	MEETKFCALAFICAFFLLLLHPLWLVSANMEGDALHNLRTNLQDPNNVLQSWDPTLVNPC		60
AtSERK1	-MESSYVVFILLS-LILLPNHSLWLASANLEGDALHTLRVTLVDPNNVLQSWDPTLVNPC		58
DcSERK	-----		
	LRR1	LRR2	
GmSERK1	TWFHVTCNNDNSVIRVDLGNAAALSGQLVLPQLGQLKLNQYLELYSSNNITGPIPSDLGNLTN		117
GmSERK2	TWFHVTCNNDNSVIRVDLGNAAALSGQLVLPQLGQLKLNQYLELYSSNNITGPIPSDLGNLTN		118
GmSERK3	TWFHVTCNNDNSVIRVDLGNAAALSGQLVLPQLGQLKLNQYLELYSSNNISGPIPNDLGNLTN		117
MtSERK1	TWFHVTCNNDNSVIRVDLGNAAALSGTLVLPQLGQLKLNQYLELYSSNNITGPIPSDLGNLTN		120
AtSERK1	TWFHVTCNNDNSVIRVDLGNAAELSGHLVPELGVLKLNQYLELYSSNNITGPIPSNLGNLTN		118
DcSERK	-----MNRNSIN--ILNYMQFTDAYLDKYGVIMT---LELYSSNNISGPIPSDLGNLTN		48
	* *: * . :. : : * * . *****:*****:*****		
	LRR3	LRR4	
GmSERK1	LVSLDLYLNHFTGPIPDLSGLKLSKLRFLRLNNNNSLSGPIPMSLTNITALQVLDLSNNHLS		177
GmSERK2	LVSLDLYLNHFTGPIPDLSGLKLSKLRFLRLNNNNSLSGPIPMSLTNITALQVLDLSNNHLS		178
GmSERK3	LVSLDLYLNRFSGPIPESLGKLSKLRFL-----DLSNNQLS		153
MtSERK1	LVSLDLYLNRFNNGPIPDLSGLKLSKLRFLRLNNNNSLMGPIPMSLTNISALQVLDLSNNQLS		180
AtSERK1	LVSLDLYLNSFSGPIPESLGKLSKLRFLRLNNNNSLTGSIPMSLTNITTLQVLDLSNNRLS		178
DcSERK	LVSLDLYMNSFSGPIPDTLGKLTRLRLFLRLNNNNSLSGPIPMSLTNITTLQVLDLSNNRLS		108
	*****:* * . *****:*****:*****		
	LRR5	SPP	
GmSERK1	GVVPDNGSFSLFTPIISFANNMDLCGPVTGHPCPGSPFFSPPPPFVPPPIISAPGGNGATG		237
GmSERK2	GVVPDNGSFSLFTPIISFANNLDLCGPVTGHPCPGSPFFSPPPPFVPPPIISAPGGNGATG		238
GmSERK3	GVVPDNGSFSLFTPIISFANNLDLCGPVTGHPCPGSPFFSPPPPFVPPSPIAPEGNSATG		213
MtSERK1	GVVPDNGSFSLFTPIISFANNLNLCPVTGHPCPGSPFFSPPPPFVPPPIISAPGSGGATG		240
AtSERK1	GSVPDNGSFSLFTPIISFANNLDLCGPVTSHPCPGSPFFSPPPPFIQPPPVSTPSGYGITG		238
DcSERK	GPVPDNGSFSLFTPIISFANNLNLCPVTGRPCPGSPFFSPPPPFIIPPSTQPPQGNGPTG		168
	* ***** * . ***** . ***** . ***** . *		

(*GmSERK1*, *GmSERK2* e *GmSERK3*), *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK1*) e cenoura (*DcSERK*) foram alinhadas e os domínios conservados foram localizados. *SP* = peptídeo sinal; *LZ* = zíper de leucina; *LRR* = repetições ricas em leucina; *SPP* = região rica em prolina; *TM* = região transmembrana; *I-XI* = subdomínios do domínio cinase; * = identidade de todos os resíduos de aminoácidos na coluna indicada; : = similaridade dos aminoácidos alinhados na coluna; . = baixa similaridade dos aminoácidos na coluna.

Com o objetivo de comparar as proteínas *GmSERK* com outros receptores da família de LRR-RLK de plantas, sequências de aminoácidos dos domínios extracelular e intracelular foram utilizadas, respectivamente, para análises estruturais e de agrupamento. Como o número de repetições de leucina é altamente variável entre as subfamílias de LRR-RLKs e dificultariam o alinhamento, a consenso das LRR presentes nas proteínas *GmSERK1*, *GmSERK2* e *GmSERK3* foi elaborado com auxílio do *software* “ClustalW” e alinhada com as sequências consenso de outras proteínas LRR-RLKs, retiradas da literatura (Figura 3).

A conservação dos resíduos de ácido aspártico (D) na posição 1, asparagina (N) na posição 4 e glicina (G) na posição 16 em proteínas da família SERK foi observada, embora não seja consenso entre as LRRs de plantas (Figura 3B). Resultados semelhantes foram relatados por Baudino e colaboradores (2001), ao analisarem o padrão de conservação dos resíduos de aminoácidos das LRR de proteínas SERK de milho (*ZmSERK1*, *ZmSERK2*), em comparação com outros tipos de receptores ricos em leucina.

Assim como reportado na literatura para diversas espécies, o número de repetições LRR encontrado nas proteínas SERK de soja é consideravelmente menor do que o da maioria dos LRR-RLKs. Apesar de *GmSERK3* apresentar apenas 4 LRR, em contraste com as 5 LRR de *GmSERK1* e *GmSERK2*, a presença de 5 LRR parece ser característica conservada dentro da família SERK.

<

Figura 3. Análise estrutural das repetições ricas em leucina de LRR-RLKs de plantas. **(A)** Sequência consenso das LRR codificadas pelos genes *GmSERK1*, *GmSERK2* e *GmSERK3*, obtidas com o auxílio do software ClustalW. **(B)** Comparação entre as sequências consenso das LRR dos genes *SERK* de soja e de diversos tipos de LRR-RLKs. x = qualquer aminoácido; a = aminoácidos hidrofóbicos (A, V, L, I, F, Y, M).

Com o objetivo de verificar a relação das proteínas SERK preditas com outros tipos de LRR-RLKs de diversas espécies, realizou-se uma análise de agrupamento a partir das sequências do domínio cinase, que geralmente é altamente conservado (Figura 4).

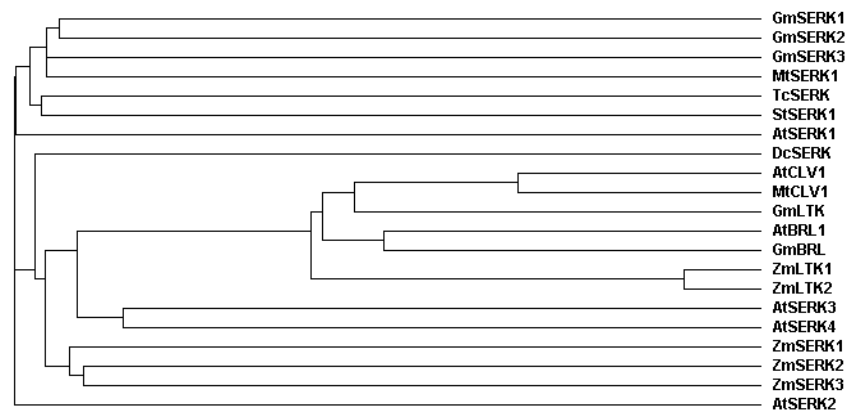


Figura 4. Cladograma formado pela comparação dos domínios cinase de diferentes subfamílias de LRR-RLKs, construído com auxílio do algoritmo Clustal. As sequências dos receptores (exceto as GmSERKs) correspondem a sequências de diversos organismos, retiradas da base de dados do NCBI.. Acessos: Soja - GmLTK (ACM89592), GmBRL (ACJ37420); *Medicago truncatula* - MtSERK1 (AY162177), MtCLV1 (AAW71475); cenoura - DcSERK (DCU93048); batata - StSERK1 (EF175216); *Arabidopsis thaliana* - AtSERK1 (A67827), AtSERK2 (AF384969), AtSERK3 (AF384970), AtSERK4 (AY056243), AtCLV1(NP_177710), AtBRL1 (NP_001117501); e milho - ZmSERK1 (AJ277702), ZmSERK2 (AJ277703), ZmSERK3(AJ400870), ZmLTK1 (AAC27894), ZmLTK2 (AAC27895).

Dentro da grande divergência observada entre as proteínas da família SERK, pode-se observar que as GmSERKs agrupam-se melhor com as proteínas SERK de *Medicago truncatula* (MtSERK1), *Teobroma cacao* (TcSERK) e *Solanum tuberosum* (StSERK1)(Figura 4).

O resultado da análise de agrupamento sugere que há maior similaridade entre as proteínas de uma mesma família de LRR-RLK, independente do organismo pertencente, do que entre receptores de diferentes subfamílias, presentes numa mesma espécie. Em relação ao processo evolutivo das plantas, esses resultados sugerem que mais de um gene estava presente no ancestral comum de monocotiledôneas e dicotiledôneas no momento da separação.

De maneira semelhante, as análises estruturais das repetições ricas em leucina mostraram que há grande divergência entre a sequência consenso e o número das LRR de diferentes famílias de LRR-RLKs, dentro de uma mesma espécie. Esse padrão observado fortalece o modelo no qual as duplicações de módulos de LRR ocorrem separadamente dentro de cada família de proteínas, originando sequências consenso similares (Kobe & Deisenhofer, 1994).

5.2 Clonagem dos genes *GmSERK*

Para o isolamento dos genes *GmSERK1*, *GmSERK2* e *GmSERK3*, o cDNA foi sintetizado a partir do RNA total extraído de cotilédones imaturos de soja, cultivados durante 9 dias em meio MSD40. Os fragmentos isolados foram obtidos por PCR, utilizando *primers* específicos para cada gene alvo.

A amplificação dos genes *GmSERK* foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose e o tamanho aproximado dos fragmentos observados correspondeu ao esperado para cada produto amplificado. Os tamanhos dos fragmentos foram de 1100 pb, para *GmSERK1*; 975 pb, para *GmSERK2* e 1019 pb, para *GmSERK3* (Figura 5).

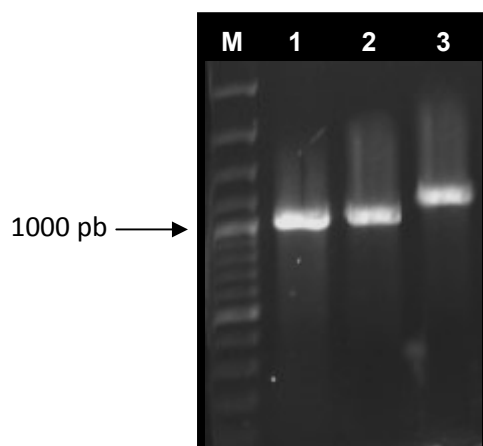


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos fragmentos dos genes *GmSERK* amplificados a partir do cDNA de cotilédones imaturos de soja após 9 dias de indução. 1 - *GmSERK2*, com 975 pb; 2 - *GmSERK3*, com 1019 pb; 3 - *GmSERK1*, com 1100 pb. M = marcador de tamanho (100 bp DNA Ladder - Fermentas).

Após a confirmação da amplificação, os fragmentos obtidos foram purificados do gel de agarose, visando à eliminação dos produtos inespecíficos que são eventualmente amplificados nas reações de PCR. Os fragmentos de cada gene foram ligados ao vetor pSPT18 e utilizados para transformar células ultracompetentes de *Escherichia coli*. Dez colônias recombinantes para cada inserto foram analisadas por meio de PCR, utilizando os *primers* específicos correspondentes. As colônias que continham os fragmentos de tamanho esperado foram escolhidas e a clonagem foi confirmada por meio do sequenciamento do DNA plasmidial isolado.

As sequências amplificadas de *GmSERK1*, *GmSERK2* e *GmSERK3* foram alinhadas com as sequências originais, retiradas do banco de dados *Phytozome*. O resultado do alinhamento de sequências confirmou a identidade de cada fragmento com as sequências dos genes aos quais eles se referem (Figura 6).

(A)

Glyma10	1	TCCACTATGCCTGATTTTCAGCTAACATGGAAGGAGATGCTTTGCATAGTCTGAGGACAAA	60
GmSERK1	1	TCCACTATGCCTGATTTTCAGCTAATATGGAAGGAGATGCTTTGCATAGTCTGAGGACAAA	60
Glyma10	61	CTTACAGGATCCCAACAATGTTTTGCAAAGTTGGGATCCTACACTTGTCATCCCTGTAC	120
GmSERK1	61	CTTACAGGATCCCAACAATGTTTTGCAAAGTTGGGATCCTACACTTGTCATCCCTGTAC	120
Glyma10	121	ATGGTTTCATGTGACATGCAACAATGATAATAGTGTCATAAGAGTTGATCTGGGGAATGC	180
GmSERK1	121	ATGGTTTCATGTGACATGCAACAATGATAATAGTGTCATAAGAGTTGATCTGGGGAATGC	180
Glyma10	181	TGCGCTGTCTGGTCAACTTGTTCCGCAGCTTGGTCAGCTTAAGAATTTGCAGTATTTGGA	240
GmSERK1	181	TGCGCTGTCTGGTCAACTTGTTCCGCAGCTTGGTCAGCTTAAGAATTTGCAGTATTTGGA	240
Glyma10	241	ACTTTACAGCAATAACATTACTGGCCCTATTCCAAGTGACCTGGGGAATCTTACTAACTT	300
GmSERK1	241	ACTTTACAGCAATAACATTACTGGCCCTATTCCAAGTGACCTGGGGAATCTTACTAACTT	300
Glyma10	301	GGTGAGCTTGGATCTGTACCTGAACCATTTCACTGGCCCAATCCCAGATTCTGTTGGGCAA	360
GmSERK1	301	GGTGAGCTTGGATCTGTACCTGAACCATTTCACTGGCCCAATCCCAGATTCTGTTGGGCAA	360
Glyma10	361	GTTGTCAAAATTGCGTTTCCTTCGGCTTAACAACAACAGCTTGTCTGGGTCCTATTCCCAT	420
GmSERK1	361	GTTGTCAAAATTGCGTTTCCTTCGGCTTAACAACAACAGCTTGTCTGGGTCCTATTCCCAT	420

Glyma10 421 GTCAGTCAAGAATTTGCAGTATTTGGAAGTCTACAGCAATAACATTACTGGCCCTATT 480
 |||
 GmSERK1 421 GTCAGTCAAGAATTTGCAGTATTTGGAAGTCTACAGCAATAACATTACTGGCCCTATT 480

Glyma10 481 AGTGGTTCCTGATAATGGCTCCTTCTCATTATTCACTCCTATCAGTTTGCACCAACAT 540
 |||
 GmSERK1 481 AGTGGTTCCTGATAATGGCTCCTTCTCATTATTCACTCCTATCAGTTTGCACCAACAT 540

Glyma10 541 GGATCTATGTGGACCTGTCACTGGGACCCCTTGTCAGGCTCTCCTCCATTTTCTCCTCC 600
 |||
 GmSERK1 541 GGATCTATGTGGACCTGTCACTGGGACCCCTTGTCAGGCTCTCCTCCATTTTCTCCTCC 600

Glyma10 601 TCCCCCTTTTGTCCCTCCACCTCCAATTTCTGCCCCAGGGGGTAATGGTGCCACTGGAGC 660
 |||
 GmSERK1 601 TCCCCCTTTTGTCCCTCCACCTCCAATTTCTGCCCCAGGGGGTAATGGTGCCACTGGAGC 660

Glyma10 661 AATAGCCGGAGGTGTTGCCGCTGGTGCTGCTCTATTATTTGCTGCACCTGCAATTGCATT 720
 |||
 GmSERK1 661 AATAGCCGGAGGTGTTGCCGCTGGTGCTGCTCTATTATTTGCTGCACCTGCAATTGCATT 720

Glyma10 721 TGCCTGGTGGCGTCGAAGGAAACCACAAGAATTTTCTTTGATGTGCCTGCTGAAGAGGA 780
 |||
 GmSERK1 721 TGCCTGGTGGCGTCGAAGGAAACCACAAGAATTTTCTTTGATGTGCCTGCTGAAGAGGA 780

Glyma10 781 CCCTGAAGTCCATCTGGGACAGCTTAAGAGGTTCTCACTGCGAGAACTGCAAGTTGCAAC 840
 |||
 GmSERK1 781 CCCTGAAGTCCATCTGGGACAGCTTAAGAGGTTCTCACTGCGAGAACTGCAAGTTGCAAC 840

Glyma10 841 GGATAGTTTCAGCAATAAGAACATTCTTGGGAGGGGAGGATTTGGTAAGGTGTACAAAGG 900
 |||
 GmSERK1 841 GGATAGTTTCAGCAATAAGAACATTCTTGGGAGGGGAGGATTTGGTAAGGTGTACAAAGG 900

Glyma10 901 ACGCTTGGCAGATGGTTCACTGGTGGCTGTGAAAAGATTGAAAGAGGAACGCCTCTGG 960
 |||
 GmSERK1 901 ACGCTTGGCAGATGGTTCACTGGTGGCTGTGAAAAGATTGAAAGAGGAACGCCTCTGG 960

Glyma10 961 TGGGGAGCTTCAGTTTCAGACTGAAGTGAGATGATTAGCATGGCTGTGCATAGAAATCT 1020
 |||
 GmSERK1 961 TGGGGAGCTTCAGTTTCAGACTGAAGTGAGATGATTAGCATGGCTGTGCATAGAAATCT 1020

Glyma10 1021 CCTCCGACTACGCGGGTTCTGTATGACACCAACAGAAAGGCTACTTGTTT 1070
 |||
 GmSERK1 1021 CCTCCGACTACGCGGGTTCTGTATGACACCAACAGAAAGGCTACTTGTTT 1070

(B) Glyma20 1 GGTCAAGTCAAGAATTTGCAGTATTTGGAAGTCTACAGCAATAACATTACTGGCCCTATT 60
 |||
 GmSERK2 1 GGTCAAGTCAAGAATTTGCAGTACTTGGAACTCTACAGCAATAACATTACTGGCCCTATT 60

Glyma20 61 CCAAGTGACCTGGGGAATCTTACTAACTTGGTGAGCTTGGATCTGTACCTAAATCATTTT 120
 |||
 GmSERK2 61 CCAAGTGACCTGGGGAATCTTACTAACTTGGTGAGCTTGGATCTGTACCTAAATCATTTT 120

Glyma20 121 ACTGGCCCAATCCCAGATTCACTGGGCAAGTTGTCAAAATTGCGTTTCTTCGGCTTAAC 180
 |||
 GmSERK2 121 ACTGGCCCAATCCCAGATTCACTGGGCAAGTTGTCAAAATTGCGTTTCTTCGGCTTAAC 180

Glyma20 181 AATAACAGCTTGTCAAGTCTATCCCCATGTCACTGACTAATATTACAGCTCTCCAAGTT 240
 |||
 GmSERK2 181 AATAACAGCTTGTCAAGTCTATCCCCATGTCACTGACTAATATTACAGCTCTCCAAGTT 240

Glyma20 241 CTGGATTTGTCTAATAATCATCTATCAGGAGTGGTTCTGATAATGGCTCCTTCTCATT 300
 |||
 GmSERK2 241 CTGGATTTGTCTAATAATCATCTATCAGGAGTGGTTCTGATAATGGCTCCTTCTCATT 300

Glyma20 301 TTCCTCCTATCAGTTTGTCAAACAACTTGGATCTATGTGGACCTGTCACTGGGCACCCCT 360
 |||||
 GmSERK2 301 TTCCTCCTATCAGTTTGTCAAACAACTTGGATCTATGTGGACCTGTCACTGGGCACCCCT 360
 Glyma20 361 TGTCCAGGCTCTCCTCCATTTTCTCCTCCTCCCCCTTTGTCCCTCCACCTCCAATTTCT 420
 |||||
 GmSERK2 361 TGTCCAGGCTCTCCTCCATTTTCTCCTCCTCCCCCTTTGTCCCTCCACCTCCAATTTCT 420
 Glyma20 421 GCCCCAGGAGGTAATGGTGCCACCGGAGCAATAGCTGGAGGAGTTGCTGCTGGTGCTGCT 480
 |||||
 GmSERK2 421 GCCCCAGGAGGTAATGGTGCCCTCCGGAGCAATAGCTGGAGGAGTTGCTGCTGGTGCTGCT 480
 Glyma20 481 CTATTATTTGCTGCACCTGCAATTGCATTTGCCTGGTGGCGTCGAAGGAAACCACAAGAA 540
 |||||
 GmSERK2 481 CTATTATTTGCTGCACCTGCAATTGCATTTGCCTGGTGGCGTCGAAGGAAACCACAAGAA 540
 Glyma20 541 TTTTCTTTGATGTGCCTGCTGAAGAGGATCCTGAAGTCCATCTGGGACAGCTTAAGAGG 600
 |||||
 GmSERK2 541 TTTTCTTTGATGTGCCTGCTGAAGAGGATCCTGAAGTCCATCTGGGACAGCTTAAGAGG 600
 Glyma20 601 TTCTCACTACGAGAACTGCAAGTTGCAACAGATAGTTTCAGTAATAAGAACATTCTTGGG 660
 |||||
 GmSERK2 601 TTCTCACTACGAGAACTGCAAGTTGCAACAGATAGTTTCAGTAATAAGAACATTCTTGGG 660
 Glyma20 661 AGGGGAGGATTTGGTAAGGTGTACAAAGGACGTTTGGCAGATGGTTCATTGGTGGCTGTG 720
 |||||
 GmSERK2 661 AGGGGAGGATTTGGTAAGGTGTACAAAGGACGTTTGGCAGATGGTTCATTGGTGGCTGTG 720
 Glyma20 721 AAAAGATTGAAAGAGGAACGCACACCAGGTGGGGAGCTTCAGTTTCAGACTGAAGTAGAG 780
 |||||
 GmSERK2 721 AAAAGATTGAAAGAGGAACGCACACCAGGTGGGGAGCTTCAGTTTCAGACTGAAGTAGAG 780
 Glyma20 781 ATGATTAGCATGGCTGTGCATAGAAATCTCCTTCGACTACGTGGGTTCGTATGACACCA 840
 |||||
 GmSERK2 781 ATGATTAGCATGGCTGTGCATAGAAATCTCCTTCGACTACGTGGGTTCGTATGACACCA 840
 Glyma20 841 ACAGAAAGGCTACTTGTATTATCCCTACATGGCTAATGGAAGTGTGCTTCATGCTTAAGA 900
 |||||
 GmSERK2 841 ACAGAAAGGCTACTTGTATTATCCCTACATGGCTAATGGAAGTGTGCTTCATGCTTAAGA 900

(C) Glyma02 1 TAGCTGGAGGAGTAGCTGCAGGTGCTGCTCTGTTATTTGCTGCTCCTGCAATTGTGTTTG 60
 |||||
 GmSERK3 1 TAGCTGGAGGAGTAGCTGCAGGTGCTGCTCTGTTATTTGCTGCTCCTGCAATTGTGTTTG 60
 Glyma02 61 CTTGGTGGCGTCGAAGGAAACCACAGGAGTTTTTCTTTGATGTGCCCCTGAAGAGGATC 120
 |||||
 GmSERK3 61 CTTGGTGGCGTCGAAGGAAACCACAGGAGTTTTTCTTTGATGTGCCCCTGAAGAGGATC 120
 Glyma02 121 CTGAAGTACACCTTGGGCAGCTTAAGAGGTTCTCATTACGAGAACTGCAAGTTGCAACAG 180
 |||||
 GmSERK3 121 CTGAAGTACACCTTGGGCAGCTTAAGAGGTTCTCATTACGAGAACTGCAAGTTGCAACAG 180
 Glyma02 181 ATACTTTCAGCAATAAGAACATTCTTGAAGGGGAGGATTTGGTAAGGTTTACAAAGGAC 240
 |||||
 GmSERK3 181 ATACTTTCAGCAATAAGAACATTCTTGAAGGGGAGGATTTGGTAAGGTTTACAAAGGAC 240
 Glyma02 241 GTTTGACTGATGGTTCACTGGTTGCTGTGAAAAGATTGAAAGAGGAGCGCACGCCTGGTG 300
 |||||
 GmSERK3 241 GTTTGACTGATGGTTCACTGGTTGCTGTGAAAAGATTGAAAGAGGAGCGCACGCCTGGTG 300
 Glyma02 301 GGGAGCTTCAGTTTCAGACTGAAGTAGAGATGATTAGCATGGCTGTGCACCGAAATCTCC 360
 |||||
 GmSERK3 301 GGGAGCTTCAGTTTCAGACTGAAGTAGAGATGATTAGCATGGCTGTGCACCGAAATCTCC 360

```

Glyma02 361 TCCGTTTACGTGGGTTCTGTATGACTCCTACTGAAAGGCTACTTGTATATCCTTACATGG 420
|||||
GmSERK3 361 TCCGTTTACGTGGGTTCTGTATGACTCCTACTGAAAGGCTACTTGTATATCCTTACATGG 420

Glyma02 421 CTAATGGTAGTGTTCCTCATGCTTAAGAGAGCGTCCGGCACATCAACAACCCCTTGATT 480
|||||
GmSERK3 421 CTAATGGTAGTGTTCCTCATGCTTAAGAGAGCGTCCGGCACATCAACAACCCCTTGATT 480

Glyma02 481 GGCCGACAAGGAAAAGAATAGCATTGGGATCAGCAAGGGGTCTTTCATATTTGCATGATC 540
|||||
GmSERK3 481 GGCCGACAAGGAAAAGAATAGCATTGGGATCAGCAAGGGGTCTTTCATATTTGCATGATC 540

Glyma02 541 ATTGTGACCCAAAGATTATTCATCGTGATGTAAAAGCTGCAAACATACTGTTGGACGAGG 600
|||||
GmSERK3 541 ATTGTGACCCAAAGATTATTCATCGTGATGTAAAAGCTGCAAACATACTGTTGGACGAGG 600

Glyma02 601 AGTTTGAGGCTGTTGTTGGAGATTTTGGGTTGGCTAAACTGATGGACTACAAGGACACCC 660
|||||
GmSERK3 601 AGTTTGAGGCTGTTGTTGGAGATTTTGGGTTGGCTAAACTGATGGACTACAAGGACACCC 660

Glyma02 661 ATGTTACAACCTGCTGTACGGGGCACAATTGGGCACATAGCACCAGAGTACCTGTCTACTG 720
|||||
GmSERK3 661 ATGTTACAACCTGCTGTACGGGGCACAATTGGGCACATAGCACCAGAGTACCTGTCTACTG 720

Glyma02 721 GTAAATCTTCAGAGAAAACAGACGCTCTTGGGTATGGTATAATGCTTCTGGAGCTAATCA 780
|||||
GmSERK3 721 GTAAATCTTCAGAGAAAACAGACGCTCTTGGGTATGGTATAATGCTTCTGGAGCTAATCA 780

Glyma02 781 CTGGACAAAGGGCTTTTGACTTGGCTCGACTTGCAAATGATGATGATGTTATGTTGCTGG 840
|||||
GmSERK3 781 CTGGACAAAGGGCTTTTGACTTGGCTCGACTTGCAAATGATGATGATGTTATGTTGCTGG 840

Glyma02 841 ATTGGGTAAAAGGACTTCTGAAAGAAAAGAAGCTAGAAATGCTGGTTGATCCTGATCTCC 900
|||||
GmSERK3 841 ATTGGGTAAAAGGACTTCTGAAAGAAAAGAAGCTAGAAATGCTGGTTGATCCTGATCTCC 900

Glyma02 901 ATAGCAATTACATAGATGCTGAGGTAGAACAGT 933
|||||
GmSERK3 901 ATAGCAATTACATAGATGCTGAGGTAGAACAGT 933

```

Figura 6. Alinhamento da região sequenciada dos fragmentos dos genes *GmSERK1*, *GmSERK2* e *GmSERK3*, com as sequências correspondentes dos locos depositadas no banco de dados *Phytozome*. **(A)** Refere-se ao alinhamento de *GmSERK1* com a sequência do loco Glyma10g36280; **(B)** Refere-se ao alinhamento de *GmSERK2* com a sequência do loco Glyma20g31320; **(C)** refere-se ao alinhamento de *GmSERK3* com a sequência do loco Glyma02g08360. As barras em azul indicam as bases idênticas no alinhamento.

5.3 Análise do padrão de expressão de *GmSERK1*

Embriões somáticos de soja foram obtidos por meio do cultivo de cotilédones imaturos em meio suplementado com 40 mg/L de 2,4-D. A grande concentração de auxina no meio de cultura mostrou-se eficiente na

indução de embriões somáticos da cultivar de soja CAC-1, gerando um grande número de embriões globulares por cotilédone imaturo.

O processo de cultura de tecidos *in vitro* expõe os explantes a um nível de estresse significativo, uma vez que eles são retirados do seu ambiente original e colocados num meio sintético contendo concentrações não-fisiológicas dos reguladores de crescimento, sais e componentes orgânicos. A resposta a condições de estresse depende de dois parâmetros principais: o nível de estresse e o estado fisiológico das células. Se o nível de estresse exceder a tolerância celular, as células morrerão. Em contrapartida, baixos níveis de estresse são capazes de ativar mecanismos que irão induzir a adaptação celular às novas condições (Fehér *et al.*, 2003).

As respostas morfogênicas do processo de indução de embriogênese somática a partir de cotilédones imaturos de CAC-1 podem ser visualizadas na Figura 7. Após 15 dias em meio de indução, regiões das bordas dos cotilédones imaturos começaram a apresentar pequenas protuberâncias (Figura 7C).

Setores dos cotilédones apresentando características embriogênicas começaram a ser visualizados após 21 dias de cultivo. Inicialmente, surgiram células bastante individualizadas e arredondadas, principalmente nas bordas dos cotilédones e na superfície adaxial. Após 30 dias, com a progressão do entumescimento por todo o explante e a multiplicação das células com características embriogênicas, estes setores embriogênicos tornaram-se maiores e melhor definidos. A massa pró-embriogênica formada é distinta das demais regiões do calo por seu aspecto granular, coloração mais clara e translúcida (Figura 7D).

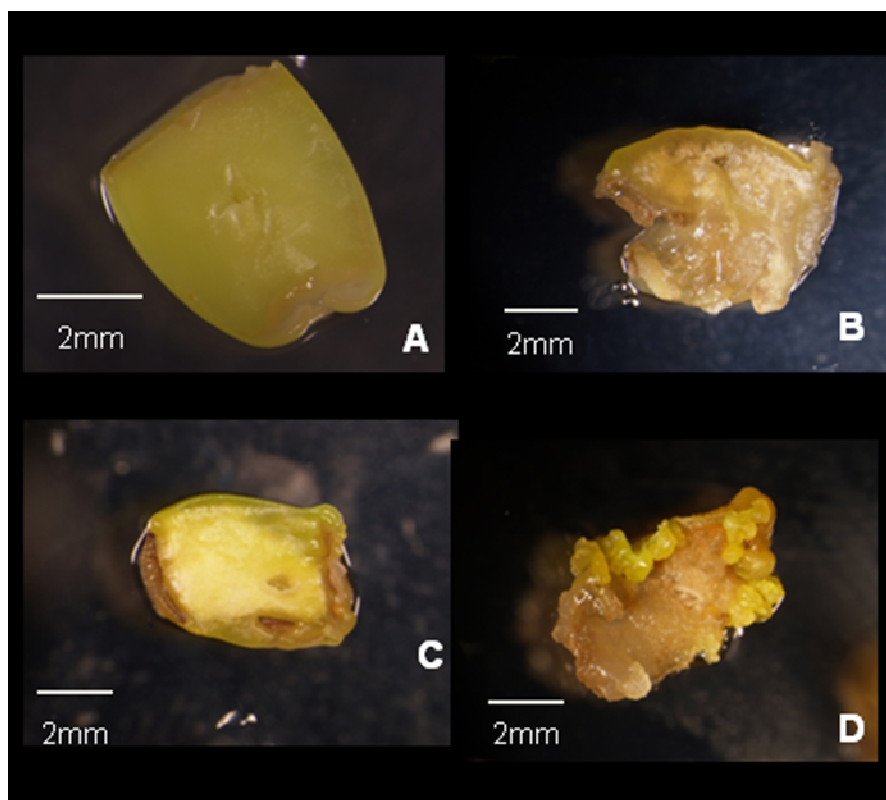


Figura 7. Desenvolvimento de embriões somáticos obtidos a partir do cultivo de cotilédones imaturos da cultivar de soja CAC-1 em meio MSD40. A - cotilédone imaturo utilizado como explante inicial; B - Explante com 12 dias de cultivo em meio de indução de embriogênese somática; C - Cultura após 15 dias no meio de indução de embriogênese; D - Massa embriogênica formada após 30 dias de cultivo em meio de indução.

Com relação à formação de embriões somáticos nos explantes da cultivar CS303, a frequência da resposta ao processo de indução de embriogênese foi relativamente baixa, levando a formação de poucos embriões globulares. As respostas morfogênicas, observadas no processo de indução de embriões somáticos da cultivar de soja CS303, podem ser visualizadas na Figura 8. Após 18 dias em meio de indução, regiões das bordas dos cotilédones imaturos começaram a apresentar pequenas protuberâncias (Figura 8C).

Setores dos cotilédones apresentando características embriogênicas começaram a ser visualizados aos 21 dias de cultivo. Após 30 dias,

observou-se também a progressão do entumecimento por todo o explante, embora os setores embriogênicos parecem não ter se expandido (Figura 8D).

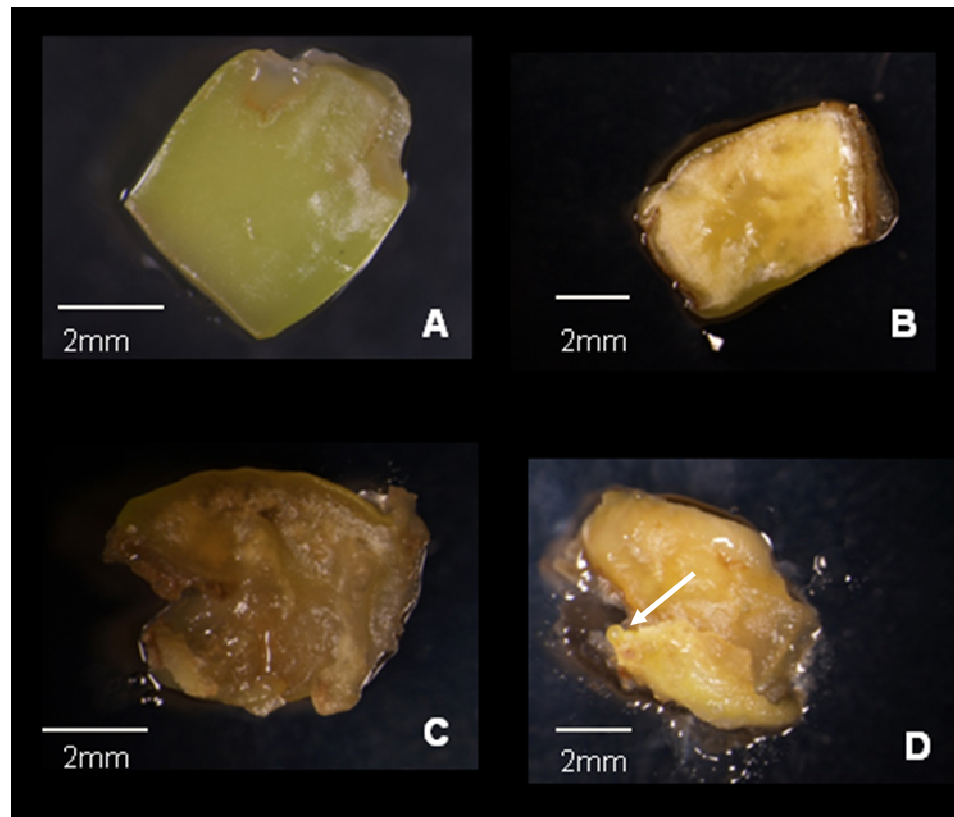


Figura 8. Resposta morfogênica dos cotilédones imaturos da cultivar de soja CS303, cultivados em meio MSD40. **A** - cotilédone imaturo utilizado como explante inicial; **B** - Explante com 12 dias de cultivo em meio de indução de embriogênese somática; **C** - Cultura após 18 dias no meio de indução de embriogênese; **D** – Resposta morfogênica observada após 30 dias de cultivo em meio de indução. A seta indica a formação de um único embrião somático na extremidade do explante.

Gesteira (2002) avaliou o potencial genético de nove cultivares de soja em relação à embriogênese somática, a fim de selecionar os genótipos mais responsivos para a utilização em sistemas de transformação, e verificou um efeito marcante do genótipo nas respostas morfogênicas. A cultivar CAC-1 apresentou-se mais responsiva à indução do que CS303, com potencial de indução, em média, cinco vezes superior.

Uma série de genes candidatos a marcadores de células competentes foram descritos em diversas espécies de plantas. Schmidt e colaboradores (1997) verificaram que a expressão de um desses genes, conhecido por *Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK)*, está correlacionada qualitativa e quantitativamente com a presença de células competentes à embriogênese. Durante a indução de competência embriogênica, o gene *SERK* mostrou ser expresso inicialmente num conjunto de células pequenas, pouco vacuolizadas e de citoplasma denso.

Como as análises *in silico* verificaram a existência de proteínas da família SERK codificadas por regiões do genoma de soja, experimentos tentando correlacionar o grande potencial embriogênico da cultivar de soja CAC-1, com um aumento de expressão do gene SERK durante o processo de indução de embriogênese somática foram realizados.

O padrão de acúmulo de mRNA correspondente aos genes *GmSERK1* e *GmSERK3* foi monitorado por meio do processo de hibridização *in situ*. Apenas a sonda *antisense* sintetizada a partir de *GmSERK1* mostrou-se efetiva para detectar os transcritos correspondentes, durante o processo de indução de embriogênese somática.

Por meio das análises de hibridização *in situ*, verificou-se que os cotilédones imaturos, utilizados como explante inicial, não apresentavam sinais de acúmulo de mRNA correspondente ao gene *GmSERK1* (Figura 9A).

Ao longo do processo de indução de competência embriogênica na cultivar CAC-1, observou-se que o acúmulo de mRNA correspondente ao gene *GmSERK1* inicia-se por volta dos 12 dias de cultivo. Neste estágio, observou-se a formação de um precipitado de coloração roxa nas células epidérmicas e subepidérmicas da superfície abaxial dos cotilédones, evidenciando o acúmulo de mRNA correspondente ao gene *GmSERK1* (Figura 9B). De acordo com o padrão de formação de embriões somáticos observado, pode-se inferir que as regiões que expressam *GmSERK1* são as mesmas que darão origem aos embriões somáticos.

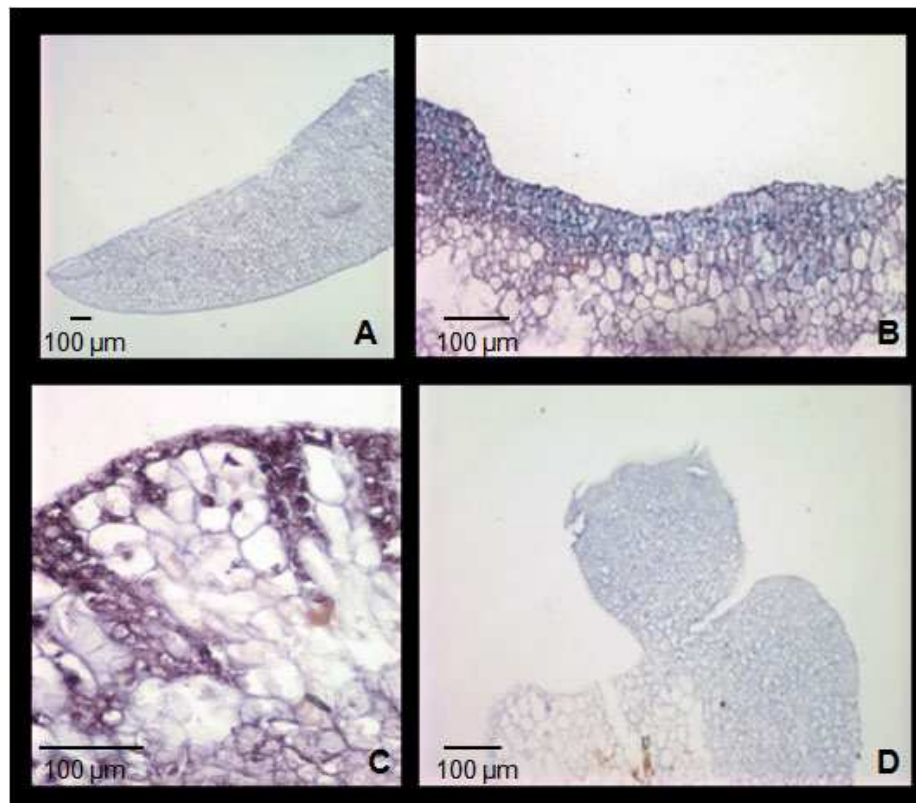


Figura 9. Dinâmica de expressão do gene *GmSERK* durante a indução de embriogênese somática na cultivar de soja CAC-1. A - cotilédone imaturo utilizado como explante inicial; B - Explante com 12 dias de cultivo em meio de indução de embriogênese somática; C - Cultura após 15 dias no meio de indução de embriogênese; D – Embrião globular formado após 21 dias de cultivo em meio de indução.

Após 15 dias de cultivo, a intensificação das divisões celulares e a formação de agregados celulares, que iniciam o processo de transição para o estágio globular, foram observadas. Algumas células da protoderme não mais apresentavam o sinal de expressão de *GmSERK1* (Figura 9C). No final do período de cultivo dos explantes no meio de indução, observou-se que o nível de transcritos de *GmSERK1* não é mais detectável (Figura 9D).

O término da expressão de *GmSERK1* é detectado no estágio de transição do pró-embrião. Essa expressão transiente é condizente com a hipótese de que a proteína SERK seja responsável pela transdução do sinal presente no meio de cultura e desencadeie o processo de embriogênese somática. O aumento de expressão do gene *SERK* tem sido correlacionado

com a capacidade de aquisição de competência embriogênica de diversas espécies de plantas.

A expressão ectópica do gene *AtSERK1* em plantas de *Arabidopsis*, sob controle do promotor 35S, levou ao aumento da frequência de embriogênese somática *in vitro*, mas não afetou o desenvolvimento das plantas *in vivo* (Hecht *et al.*, 2001). Deste modo, sugere-se que o gene *SERK* possa ser utilizado como uma ferramenta para aumentar o potencial embriogênico de cultivares de soja que apresentem baixa capacidade de indução.

Durante o processo de indução de embriogênese somática a partir de cotilédones da cultivar CS303, o acúmulo de mRNA foi visivelmente muito baixo. A expressão de *GmSERK1* foi detectada somente a partir dos 18 dias de cultivo, nas bordas dos cotilédones imaturos utilizados como explantes (Figura 10 A-D). No final do período de cultivo em meio de indução (30 dias), também foi observado que o nível dos transcritos correspondentes ao gene *GmSERK1* não é mais detectável (Figura 10D).

Gesteira (2002) associou as fracas respostas embriogênicas da cultivar CS303 à baixa qualidade das sementes utilizadas no plantio, que se encontravam enrugadas, apesar do crescimento da planta e a formação de vagens terem sido aparentemente normais. Embora a baixa resposta dos explantes ao processo de indução de embriogênese somática possa ser consequência do estado fisiológico da planta doadora, os resultados dos experimentos de hibridização *in situ* com o gene *GmSERK1* sugerem que o papel do gene *SERK* possa ser decisivo para o sucesso de aquisição de competência embriogênica.

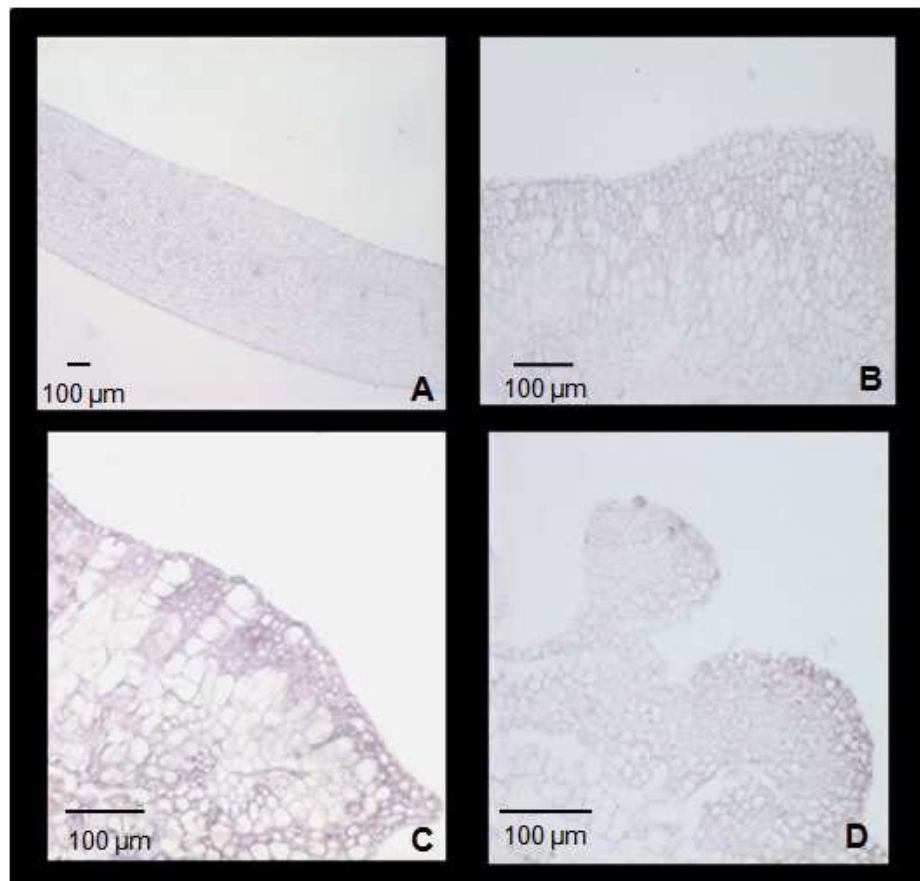


Figura 10. Dinâmica de expressão do gene *GmSERK* durante a indução de embriogênese somática da cultivar de soja CS303. **A** - Cotilédone imaturo utilizado como explante inicial; **B** - Explante com 12 dias de cultivo em meio de indução de embriogênese somática; **C** - Cultura após 18 dias no meio de indução de embriogênese; **D** - Massa embriogênica formada após 30 dias de cultivo em meio de indução de embriogênese.

6. CONCLUSÕES

- Foram identificados pelo menos três novos membros da família de genes *SERK* em soja (*GmSERK1*, *GmSERK2* e *GmSERK3*), isolados a partir dos cotilédones imaturos cultivados em meio para indução de embriogênese somática;
- A busca por cis-elementos na região promotora dos genes *GmSERK* permitiu a identificação de elementos reguladores que são potencialmente responsáveis por promover a responsividade à auxina;
- As análises *in silico*, realizadas a partir das sequências de aminoácidos dos genes *GmSERK*, confirmaram que a proteína predita apresenta todos os domínios característicos da família *SERK*: um peptídeo sinal, 5 repetições ricas em leucina (exceto *GmSERK3*, que apresentou apenas 4 LRR), uma região rica em prolina e os domínios transmembrana e cinase;
- A grande concentração de auxina no meio de cultura mostrou-se eficiente apenas na indução de embriões somáticos a partir de cotilédones da cultivar de soja CAC-1, enquanto que na cultivar CS303 os explantes se mostraram pouco responsivos, levando à formação de um baixo número de embriões globulares.
- Durante a indução de embriogênese somática, observou-se que um grande acúmulo de mRNA correspondente ao gene *GmSERK1* pôde ser detectado na cultivar CAC-1, enquanto que na cultivar CS303 esse acúmulo foi visivelmente muito baixo. Com base nas análises *in silico* e nos padrões de acúmulo de mRNA, observados por meio dos experimentos de hibridização *in situ*, pode-se inferir que o gene *GmSERK1* possivelmente está envolvido no processo de aquisição de competência embriogênica.

7. PERSPECTIVAS

Para a confirmação do envolvimento do gene *GmSERK1* no processo de indução de embriogênese somática, análises quantitativas de PCR em tempo real serão realizadas, na tentativa de comprovar que o nível de transcritos deste gene é maior em explantes que apresentam potencial embriogênico do que em outros tecidos da planta doadora.

Adicionalmente, análises de expressão e funcionalidade das proteínas codificadas pelos genes *GmSERK1*, *GmSERK2* e *GmSERK3* ainda precisam ser realizadas, já que serão fundamentais para a elucidação dos eventos que controlam o processo de aquisição de competência embriogênica.

Com a comprovação da participação do gene *GmSERK1* no processo de aquisição de competência embriogênica, a sua superexpressão constituirá numa alternativa para aumento do potencial embriogênico de cultivares de soja, podendo contribuir para a geração de protocolos de regeneração *in vitro* mais eficientes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, pp. 3389-3402, 1997.
- BAUDINO, S., HANSEN, S., BRETTSCHEIDER, R., HECHT, V.F.G., DRESSELHAUS, T., LÖRZ, H., DUMAS, C., ROGOWSKY, P.M. Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. **Planta**, v. 213, pp. 1-10, 2001.
- BENJAMINS, R., SCHERES, B. Auxin: The looping star in plant development. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, pp. 443-465, 2008.
- BERLETH, T., CHATFIELD, S. Embryogenesis: Pattern formation from a single cell. **The Arabidopsis Book**, pp. 1-22, 2002.
- BERLETH, T., JÜRGENS, G. The role of the *Monopteros* gene in organizing the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. **Develop.**, v. 118, pp. 575-587, 1993.
- CHUGH, A., KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis- recent advances. **Curr. Sci.**, v. 83, pp. 715-730, 2002.
- DODEMAN, V.L., DUCREUX, G., KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **J. Exp. Bot.**, v. 48, pp. 1493-1509, 1997.
- DUDITS, D., GYORGYEY, J., BOGRE, L., BAKÓ, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1995. pp. 267-308.
- FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, A.; SAMAJ, J. (Ed.). **Somatic embryogenesis**, Berlin: Springer Verlag, 2005. pp. 85-101.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; MISKOLCZI, P.; AYAYDIN, F.; DUDITS, D. Induction of the embryogenic pathway in somatic plant cells. **Acta Horticul.**, v. 560, pp. 293-298, 2001.

- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FINER, J.J., NAGASAWA, A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L) Merrill]. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 15, pp. 125-136, 1988.
- FINER, J.J., McMULLEN, M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension tissue culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 27, pp. 175-182, 1991.
- FISK, H.J., DANDEKAR, A.M. The introduction and expression of transgenes in plants. **Sci. Hortic.**, v. 55, pp. 5-36, 1993.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res.**, v. 50, pp. 1-158, 1968.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, v. 2, 1999. pp. 533–568.
- GELVIN, S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeyind” tool. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.**, v. 67, n. 1, pp.16-37, 2003.
- GESTEIRA, A.S. **Avaliação do potencial embriogênico de cultivares de soja e transformação com o gene da citrato sintase**. 65 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.
- HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J.P.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.L.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; de VRIES, S.C. The *Arabidopsis Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiol.**, v. 127, p. 803–816, 2001.

- JENIK, P.D., GILLMOR, C.S., LUKOWITZ, W. Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 23, pp. 207-236, 2007.
- KOBE, B., DEISENHOFER, J. Proteins with leucine-rich repeats. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 5, pp. 409-416, 1995.
- KOBE, B., DEISENHOFER, J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. **Trends Biochem. Sci.**, v. 19, pp. 415-421, 1994.
- LAUX, T., WURSCHUM, T., BREUNINGER, H. Genetic regulation of embryonic pattern formation. **The plant Cell.**, v. 16, pp. 190-202, 2004.
- LI, Y., L., Z-B., SHI, X, HAGEN, G., GUILFOYLE, T.J. An auxin-inducible element in soybean SAUR promoters. **Plant Physiol.**, v. 106, pp. 37-43, 1994.
- LIU, Z-B, ULMASOV, T., SHI, X., HAGEN, G., GUILFOYLE, T.J. Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. **ASPP**, v. 6, pp. 645-657, 1994.
- LOGANATHAN, M., MARUTHASALAM, S. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merrill) through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 46, pp. 265-273, 2010.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 15, pp. 473-479, 1962.
- NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 90, pp. 1-8, 2007.
- NOLAN, K.E., KURDYUKOV, S., ROSE, R.J. Expression of the *somatic embryogenesis receptor-like kinase 1* (SERK1) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. **J. Exp. Bot.**, v. 60, pp. 1759-1771, 2009.
- PÉREZ-NUÑÉZ, M.T.; SOUZA, R.; SÁENZ, L.; CHAN, J.L.; ZÚÑIGA-AGUILAR, J.J.; OROPEZA, C. Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Rep.**, v. 28, pp. 11-19, 2009.

- RAGHAVAN, V. 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. **Am. J. Bot.**, v. 91, pp. 1743-1756, 2004.
- SALAJ, J.; VON RECKLINGHAUSEN, I.R.; HECHT, V.; DE VRIES, S.C.; SCHEL, J.H.N.; VAN LAMMEREN, A.A.M. AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.46, pp. 709-714, 2008.
- SAMBROOK, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTARÉM, E.R. Efficient methods for genetic plants transformation. **R. Cien. Tecnol.**, v. 15, pp. 81-90, 2000.
- SANTARÉM, E.R., FERREIRA, A.G. Transformação de soja via bombardeamento de partículas. **ABCTP Notícias**, v. 29, pp. 2-9, 1997.
- SANTOS, M.O., ROMANO, E., YOTOKO, K.S.C., TINOCO, M.L.P., DIAS, B.B.A., ARAGÃO, F.J.L. Characterization of the cacao *somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Sci.**, v. 168, pp. 723-729, 2005.
- SEMIARTI, E., INDRIANTO, A., PURWANTORO, A., ISMININGSIH, S., SUSENO, N., ISHIKAWA, T., YOSHIOKA, Y., MACHIDA, Y., MACHIDA, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*. **Plant Biotechnol.**, v. 24, pp. 265-272, 2007.
- SCHELLENBAUM, P., JACQUES, A., MAILLOT, P. Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3*, and *VvLIL* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Rep.**, v. 27, pp. 1799-1809, 2008.
- SHAH, D.M., HIGHTOWER, R.C., Meagher, R. B. Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene. **PNAS**, v. 79, pp. 1022-1026, 1982.
- SHAH, K., GADELLA, T.W.J., VAN ERP, H., HECHT, V., VRIES, S.C. Subcellular localization and oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein. **J. Mol. Biol.**, v. 309, pp. 641-655, 2001.

- SHARMA, S. K.; MILLAM, S.; HEIN, I.; BRYAN, G. J. Cloning and molecular characterization of a potato SERK gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. **Planta**, v. 228, pp. 319–330, 2008.
- SCHMIDT, E.D.L.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.J.; de VRIES, S.C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Develop.**, v. 124, pp. 2049–2062, 1997.
- SOMERS, D.A., SAMAC, D.A., OLHOFT, P.M. Recent advances in legume transformation. **Plant Physiol.**, v. 131, pp. 892-899, 2003.
- SOMLEVA, M.N.; SCHMIDT, E.D.L.; de VRIES, S.C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. **Plant Cell Rep.**, v. 19, pp. 718–726, 2000.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. São Paulo: Artmed, 2006. 719 p.
- TANG, W., PERRY, S.E. Binding site selection for the plant MADS domain protein AGL15. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 30, pp. 28154-28159, 2003.
- TEPFER, M., CASSE-DELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiol. Sci.**, v. 4, pp. 24-28, 1987.
- TIWARI, R.K, TRIVEDI, M., GUANG, Z.-C, GUO, G.-Q., ZHENG, G.-C. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Scutellaria baicalensis* and production of flavonoids in hairy roots. **Biol. Plant.**, v. 52, n. 1, pp. 26-35, 2008.
- TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 3.ed. v. 1. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. 508 p.
- VERDEIL, J-L, ALEMANN, L., NIEMENAK, N. TRANBARGER, T.J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant. Sci.**, v. 12, n. 6, pp. 245-252, 2007.
- YANG, C., ZHAO, T., YU, D., GAI, J. Isolation and functional characterization of a *SERK* gene from soybean. **Plant Mol. Biol. Rep.**, 2010.
- ZIMERMANN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, pp. 1141-1423, 1993.