

JULIANA LACORTE CAZOTO

**Expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário
zigótico e somático em *Passiflora edulis***

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIANA LACORTE CAZOTO

**Expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário
zigótico e somático em *Passiflora edulis***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JULIANA LACORTE CAZOTO

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
para a obtenção do título de Doutora em
Biologia Vegetal.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO CARNIER DORNELAS

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C319e Cazoto, Juliana Lacorte, 1984-
Expressão gênica durante o desenvolvimento
embrionário zigótico e somático em *Passiflora edulis* /
Juliana Lacorte Cazoto. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcelo Camier Domelas.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Embriogênese zigótica. 2. Embriogênese
somática. 3. *Passiflora edulis*. 4. Expressão gênica.
I. Domelas, Marcelo Camier, 1970-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Gene expression during somatic and zygotic embryo development
in *Passiflora edulis*

Palavras-chave em Inglês:

Zygotic embryogenesis

Somatic embryogenesis

Passiflora edulis

Gene expression

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Marcelo Camier Domelas [Orientador]

Paulo Mazzafera

Juliana Lischika Sampaio Mayer

Maria Helena de Souza Goldman

Adriana Pinheiro Martinelli

Data da defesa: 03-12-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 03 de dezembro de 2012

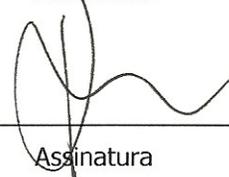
BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas
(Orientador)**



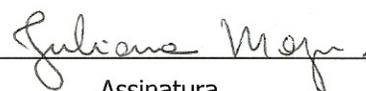
Assinatura

Prof. Dr. Paulo Mazzafera



Assinatura

Profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer



Assinatura

Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman



Assinatura

Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli



Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro

Assinatura

Profa. Dra. Vera Lúcia Scatena

Assinatura

Dra. Sara Adrián López de Andrade

Assinatura

AGRADECIMENTOS

A Deus e a meus pais, Roseli e Antonio, por estarem sempre presentes em minha vida.

Ao Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas pela orientação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do IB-UNICAMP.

Ao Depto. de Fisiologia Vegetal do IB-UNICAMP pela infra-estrutura.

Ao Prof Dr. Elliot Watanabe Kitajima pela disponibilização do laboratório de microscopia eletrônica (NAP/MEPA) da USP-ESALQ.

À CAPES e à FAPESP (Processo 08-57588-1) pelo apoio financeiro.

Aos amigos do Depto. de Biologia Vegetal que estiveram presentes durante todos de estudos.

A todos que, profissional ou pessoalmente, contribuíram para a realização desse trabalho.

Conteúdo

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Material.....	17
3.2. Metodologia	17
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Análise morfo-anatômica da embriogênese zigótica em <i>P. edulis</i>	25
4.2. Análise morfo-anatômica da embriogênese somática em <i>P. edulis</i>	32
4.3. Data-mining e análise das sequências obtidas do banco de dados de EST - Passioma 38	
4.4. Análise de expressão dos genes <i>PeAux/IAA</i> ; <i>PeYAB1</i> e <i>PeWOX4</i> durante o desenvolvimento embrionário zigótico e somático em <i>P. edulis</i>	45
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS.....	70

RESUMO

Durante o desenvolvimento vegetal, o meristema apical caulinar e o meristema apical radicular são determinados durante o processo de embriogênese, enquanto que outros órgãos como folhas, flores e frutos são produzidos durante o desenvolvimento pós-embrionário. Durante o desenvolvimento vegetal, a expressão de diferentes fatores de transcrição em um determinado local e tempo culmina com a ativação de domínios celulares responsáveis pelo estabelecimento e manutenção dos meristemas. Foi hipotetizado que os mesmos genes que são ativados durante o desenvolvimento embrionário zigótico são também ativados durante a embriogênese somática. Portanto, o padrão de expressão de genes preferencialmente expressos durante o desenvolvimento embrionário em espécies modelo nesses dois processos foi analisado e comparado. Para este propósito, o processo de embriogênese zigótica e somática em *Passiflora edulis* foi caracterizado anatomicamente. Posteriormente, genes preferencialmente expressos durante a embriogênese somática e zigótica foram identificados e caracterizados. Foram selecionados genes das famílias *YABBY*, *WOX* e *Aux/IAA*. Estes genes foram encontrados por meio de análises de bioinformática no banco de dados de etiquetas de sequências expressas (ESTs) de *Passiflora*, PASSIOMA. As sequências putativas de aminoácidos codificadas pelos genes estudados, juntamente com seus possíveis homólogos em *Arabidopsis*, foram alinhadas e analisadas. O padrão de expressão desses genes foi estudado por RT-PCR, qPCR e hibridização *in situ* durante diferentes estágios do desenvolvimento embrionário somático e zigótico em *P. edulis*. A caracterização morfo-anatômica do embrião zigótico nessa espécie resultou na elaboração de um cronograma que identifica, a partir do dia da polinização, os diferentes estágios de desenvolvimento do mesmo. Além disso, os dados de expressão gênica sugerem que os mecanismos moleculares responsáveis pelos processos de embriogênese zigótica e somática apresentaram padrão de expressão similares no início do desenvolvimento embrionário vegetal em *P. edulis*.

ABSTRACT

During plant development, the shoot apical meristem (SAM) and the root apical meristem (RAM) are established during the embryo formation process, while the other organs as leaves, flowers and fruits are produced during the post-zygotic development. During plant embryogenesis, the expression of different transcription factors in a given time and place culminates with the activation of cellular domains responsible for the establishment and maintenance of the meristems. We hypothesized that the same genes that are activated during zygotic embryo development are also activated during somatic embryogenesis. Therefore we analyzed and compared the expression patterns of genes preferably expressed during embryo development in these two processes. For this purpose, we characterized anatomically both somatic and zygotic embryogenesis in *Passiflora edulis* (passion fruit). Later, we identified and characterized genes preferably expressed during somatic and zygotic embryogenesis in this species. Among the identified genes are members from *YABBY*, *WOX* and *Aux/IAA* families. These genes were selected by bioinformatics analysis from the PASSIOMA database of *Passiflora* reproductive expressed sequence tags (ESTs). The putative protein sequences encoded by the studied genes, together with possible homologs in *Arabidopsis*, were analyzed by sequence alignment. The expression patterns of these genes were studied by RT-PCR, qPCR and *in situ* hybridization during different developmental stages of *P. edulis* somatic and zygotic embryogenesis. The morpho-anatomical characterization of zygotic embryos in this species resulted in a schedule elaboration that identifies, from the first day of pollination, the different developmental stages of the embryo. Moreover, the gene expression data suggest that the molecular mechanisms responsible for the processes of zygotic and somatic embryogenesis presented similar expression pattern during the beginning of the plant embryo development in *P. edulis*.

1. INTRODUÇÃO

O início da vida é frequentemente relacionado à fusão de duas células haplóides (gametas) e à formação do zigoto. Embora no processo de desenvolvimento embrionário o zigoto seja o ponto inicial mais comum, a embriogênese pode facilmente acontecer a partir de células somáticas (Koltunow e Grossniklaus, 2003; Nolan et al., 2009; Singh et al., 2011). Muitos protocolos descrevem a indução da embriogênese somática em diferentes espécies incluindo *Arabidopsis*, cenoura e muitas outras (Aleith e Richter, 1991; Little et al., 2000; Ikeda-Iwai et al., 2003). Diferentes tecidos podem ser utilizados como explantes para se começar o processo de embriogênese somática pela técnica de cultura de tecidos, mas normalmente o sinal necessário para se iniciar esse processo *in vitro* é uma combinação de hormônios vegetais em diferentes concentrações, principalmente auxina e citocinina (Aleith e Richter, 1991; Little et al., 2000; Ikeda-Iwai et al., 2003; Su et al., 2009). Esses hormônios apresentam um papel importante durante a embriogênese zigótica e somática. A auxina é especialmente envolvida com a instalação da polaridade zigótica e, conseqüentemente, com o controle dos genes relacionados ao eixo apical – basal do embrião (Friml, 2003; Dettmer e Friml, 2011).

O primeiro passo ativado durante a embriogênese é a determinação da polaridade do embrião (Jeong et al., 2011; Zhang e Laux, 2011). A formação de uma estrutura com dois meristemas estabelecidos em polos opostos, conectadas por tecido vascular e sem conexão vascular com a planta mãe descreve as características clássicas de um embrião regular (Cazoto e Dornelas, 2009). Entretanto, variações nos mecanismos moleculares que controlam a embriogênese podem modificar o destino celular nos diferentes passos do desenvolvimento do embrião (Mayer et al., 1993; Hamann et al., 2002; Long et al., 2002). Essas variações podem ocorrer naturalmente ou podem ser induzidas por ferramentas moleculares que estão disponíveis para estudos de desenvolvimento, permitindo pesquisas

que visam compreender melhor as variantes que controlam o processo de embriogênese (De Smet et al., 2010). Nesse trabalho, aspectos morfo-anatômicos e moleculares foram analisados para o estudo do desenvolvimento embrionário de *Passiflora edulis*. Além disso, o entendimento da embriogênese *per se* como um processo altamente conservado e reproduzível em diferentes tipos celulares guiou a análise dos resultados obtidos.

Embriogênese zigótica e somática

A embriogênese é um processo amplamente estudado. Trabalhos do início do século XX descrevem as diversas fases do processo da embriogênese em diferentes espécies vegetais (Smith, 1956; Stamp, 1986; Jong et al., 1993). Tais estudos indicam o antigo interesse de pesquisadores em determinar os fatores que controlam o início da divisão celular do zigoto e a sua posterior compartimentação que culmina no desenvolvimento de um embrião completo. A descrição anatômica e morfológica de diferentes tipos de embriões em diferentes espécies é mostrada frequentemente em estudos botânicos clássicos e, atualmente, as recentes abordagens são feitas também sob uma visão molecular (Cazoto e Dornelas, 2009). Apesar da embriogênese zigótica determinada pela fusão de gametas ser mais comum em plantas, a embriogênese somática não é um fenômeno tão raro (Koltunow e Grossniklaus, 2003; Nolan et al., 2009; Singh et al., 2011). Existem dois tipos principais de embriogênese somática vegetal: embriogênese somática *in vitro* e embriogênese somática *in planta*. A embriogênese somática *in vitro* é normalmente induzida pela aplicação exógena de hormônios vegetais em meios de cultura enriquecidos e pode ser classificada como direta ou indireta (Braybrook e Harada, 2008). Na embriogênese somática direta o embrião começa a se desenvolver diretamente da superfície do explante. Na embriogênese indireta, os embriões se desenvolvem depois da produção de calo. A embriogênese *in vitro* é bem descrita na literatura [veja revisão de Yang e Zhang (2010)], e por ser facilmente induzida

em diferentes espécies, pode ser considerada o modelo mais simples para o estudo da embriogênese somática.

A embriogênese somática *in planta* é um fenômeno observado apenas em algumas espécies vegetais (Garces et al., 2007; Cazoto e Dornelas, 2009). Quando oriundo de tecidos foliares, como no gênero *Bryophyllum*, é considerado um fenômeno raro. Entretanto algumas espécies produzem embriões que derivam de tecidos do óvulo ou ovário, chamados embriões apomíticos. Também se trata de embriogênese somática *in planta* e é descrito em diversas famílias (Koltunow 1993). Nestes eventos, uma célula ou um pequeno grupo de células somáticas inicia o programa embriogênico, produzindo embriões somáticos que são clones da planta mãe (Cazoto e Dornelas, 2009). O sinal que inicia esse processo não é bem conhecido, mas é provavelmente uma resposta a sinais ambientais como fotoperíodo e estresses.

Embora os diferentes tipos de embriogênese apresentem o zigoto ou células somáticas como o passo inicial para o desenvolvimento do embrião, é provável que os programas moleculares que conduzem o processo de formação embrionária em todos esses casos sejam conservados. Alguns genes são comumente relacionados à aquisição da competência embriogênica. *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* é um desses genes. *SERK* foi primeiramente identificado em células que se desenvolveram em embriões a partir da cultura de células de cenoura em suspensão (Schmidt et al., 1997; Nolan et al., 2009). A proteína produzida a partir desse gene é da classe Membrane-Localized Receptor-like Kinases (RLKs). Elas são proteínas com domínios transmembranares e um domínio quinase intracelular. Quando ativadas, essas proteínas iniciam uma cascata de sinalização que culmina em uma resposta metabólica, incluindo a repressão e ativação de transcritos (Becraft, 2002; Salaj et al., 2008). Proteínas quinases receptoras são importantes para diferentes processos no desenvolvimento vegetal, atuando nas vias de transdução de sinais no desenvolvimento do pólen e inflorescência, no estabelecimento de padrões

celulares, formação do meristema apical caulinar e embriogênese (Thomas et al., 2004; Salaj et al., 2008).

SERK está diretamente relacionada com a embriogênese somática. Desde a descrição da expressão de *SERK* nas células de cultura embriogênica de cenoura (Schmidt et al., 1997), o mesmo padrão de expressão foi encontrado em muitas outras espécies como *Dactylis glomerata* (Somleva et al., 2000); *Arabidopsis* (Hecht et al., 2001), *Medicago truncatula* (Nolan et al., 2003), *Helianthus annuus* (Thomas et al., 2004), entre outras. Entretanto, a sua expressão também foi descrita em embriões zigóticos de cenoura (Schmidt et al., 1997), *Arabidopsis* (Hecht et al., 2001) e trigo (Singla et al., 2008). Além disso, transcritos do gene *SERK* também foram detectados em eventos apomíticos (Tucker et al., 2003; Albertini et al., 2005). Apomixia é descrita como um tipo especial de embriogênese *in planta*. Ela é definida como a formação assexuada de embriões a partir de tecidos do óvulo (Bicknell e Koltunow, 2004).

Em todos os diferentes tipos de embriogênese, observou-se a expressão do gene *SERK* em células que originaram embriões e durante o início da embriogênese, até o começo do estágio globular/coração (Hecht et al., 2001). Alguns estudos também mostraram a presença de *SERK* em outros tipos celulares. Em *M. truncatula* *SERK* foi também relacionado à formação de calo e ao desenvolvimento de raízes, sendo sua expressão detectada na junção entre diferentes tipos de tecidos e em células procambiais. Nolan et al. (2009) concluíram que o gene *SERK* em *M. truncatula* está provavelmente relacionado à reprogramação celular. Essa função poderia explicar também a expressão de *SERK* em células de calo obtidas em cultura de tecidos que originam embriões somáticos, indicando a preparação para o início de um novo programa molecular em células que já apresentavam uma função anterior diferente. Embora apresentem uma maior competência embriogênica em cultura de tecidos de *Arabidopsis*, plantas transgênicas adultas que apresentaram a

expressão constitutiva do gene *SERK* (*35S::SERK*; Hecht et al., 2001) não mostram nenhum tipo de fenótipo. Entretanto, em *M. truncatula* a expressão de *SERK* pôde ser observada em células que tem potencial meristemático como, por exemplo, células da zona procambial e nas células do periciclo da raiz (Nolan et al., 2009).

Outros genes também foram descritos como iniciadores do desenvolvimento embrionário. Lotan et al. (1998) mostraram que a expressão do gene *LEAFY COTYLEDON 1* (*LEC1*) é suficiente para a indução da embriogênese. *LEC1* foi primeiramente descrito em embriões zigóticos (Meinke, 1992) mas sua expressão durante a embriogênese somática foi determinada para diferentes espécies como *Arabidopsis* (Lotan et al., 1998); *Zea mays* (Zhang et al., 2002) e *Helianthus annuus* (Fambrini et al., 2006). Posteriormente, outro gene, *LEAFY COTYLEDON 2* (*LEC2*) foi também descrito como determinante para o desenvolvimento do embrião (Stone et al., 2001). *LEC1* e *LEC2*, juntamente com o gene *FUSCA3* (*FUS3*), determinam a classe de genes LEC, identificados e classificados como reguladores da embriogênese (Braybrook e Harada, 2008).

Diferentemente do gene *SERK*, as proteínas codificadas pela classe de genes LEC apresentam regiões identificadas como sítios de ligação ao DNA, regulando a transcrição a partir da interação direta com a molécula de DNA. *LEC1* compõe a subunidade HAP3 de um fator CCAAT box-binding (Lotan et al., 1998; Kwong et al., 2003) e *LEC2* apresenta um domínio proteico B3 (Stone et al., 2001). Esses domínios de ligação ao DNA são conhecidos como principais reguladores do desenvolvimento da semente, e eles são especialmente envolvidos com o desenvolvimento do embrião (Agarwal et al., 2011).

Genes *LEC* são expressos durante o início da embriogênese e mantêm sua expressão até estágios tardios de desenvolvimento do embrião (Braybrook e Harada, 2008). Mutantes da classe de genes *LEC* apresentam problemas no desenvolvimento embrionário: o eixo é encurtado quando comparado com o tipo selvagem e os cotilédones apresentam tricomas. Há

um acúmulo de antocianinas nas pontas dos cotilédones e o meristema apical caulinar é ativado precocemente, permitindo a formação de primórdios foliares antes da maturação completa dos embriões. Estes mutantes são também intolerantes à dessecação (Braybrook et al., 2006; Casson e Lindsey, 2006). Por outro lado, a expressão ectópica dos genes *LEC* induz o desenvolvimento de embriões a partir de tecidos vegetativos. Essas características indicam que os genes *LEC* são reguladores da competência embriogênica em diferentes tipos celulares e que estão também envolvidos na manutenção das condições ótimas para o desenvolvimento embrionário, inibindo vias pós-embrionárias até que a maturação dos embriões esteja completa (Braybrook et al., 2006; Casson e Lindsey, 2006).

Braybrook e Harada (2008) descrevem *LEC1* como um dos primeiros genes expressos durante a cascata molecular que controla a via de desenvolvimento do embrião, sendo que ele regula a expressão de *LEC2* e *FUS3*. Embora a expressão de *LEC1* não seja regulada por auxina, este hormônio deve estar envolvido na via embriogênica controlada pelos genes *LEC*. Casson e Lindsey (2006) mostraram que os transcritos de *LEC1* não variaram a sua concentração sob o tratamento com 2,4D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), mas a concentração de mRNA de *LEC2* foi afetada. Dessa maneira, auxina provavelmente está envolvida na transdução de sinal à jusante de *LEC1*.

Em adição a isso, *LEC2* pode ativar dois genes da família *YUCCA* (*YUC*): *YUC2* e *YUC4* (Zhao, 2008). Os genes *YUC* codificam enzimas importantes que agem em uma via triptofano-dependente de biossíntese de auxina (Braybrook e Harada, 2008; Stone et al., 2008). Juntamente com a regulação positiva dos genes *YUC*, há também a indução de genes responsivos à auxina. Essas observações mostram a importância de *LEC2* nos processos que envolvem auxina durante a formação do embrião (Braybrook e Harada, 2008). Além disso, a produção endógena de auxina durante a ativação da via controlada pelo *LEC2* no início da embriogênese explica porque calos embriogênicos e embriões no início do estágio globular

precisam ser realocados para meios de cultura sem a presença de auxina em experimentos de indução da embriogênese somática (Gaj et al., 2005).

Os genes *SERK* e *LEC* definitivamente conectam as embriogêneses zigótica e somática. Eles indicam que um mecanismo molecular conservado conduz a formação do embrião em diferentes tipos celulares. *SERK* está possivelmente relacionado com a reprogramação celular, tendo a função de organizar vias metabólicas para que a expressão dos genes *LEC* inicie a embriogênese. A expressão desses genes está provavelmente conectada com outros fatores – como hormônios e outros fatores de transcrição – que juntos criam uma condição fundamental para o desenvolvimento do embrião. Embora os fatores envolvidos na mudança do destino celular durante a embriogênese ainda não estejam completamente elucidados, é provável que algum sinal inicial comum esteja presente em todos os eventos da formação do embrião.

Instalação da polaridade apical-basal durante a embriogênese

Os aspectos morfo-anatômicos e moleculares do desenvolvimento embrionário, incluindo o estabelecimento e manutenção da polaridade apical-basal, são muito estudados na planta-modelo *Arabidopsis* (veja a revisão de Chandler et al., 2008). Em *Arabidopsis*, a polaridade apical-basal do embrião é iniciada já com as primeiras divisões do zigoto e já pode ser considerada estabelecida mesmo nos tecidos maternos, devido à distribuição assimétrica das células do saco embrionário (Yadegari e Drews, 2004). A oosfera é encontrada na porção basal do saco embrionário, próxima à micrópila, e possui polarização citoplasmática, com um grande vacúolo na porção basal e o núcleo na porção terminal (Yadegari e Drews, 2004). Após a fecundação, a primeira divisão zigótica também é assimétrica, dando origem a uma célula basal, que formará o suspensor; e a uma célula apical, que formará o embrião propriamente dito. A célula mais distal do suspensor, entretanto, dará origem à hipófise,

responsável pela diferenciação do centro quiescente e da columela da raiz (Long et al., 2002; Jenik et al., 2007).

Um dos principais fatores que determinam o estabelecimento do eixo apical-basal do embrião em *Arabidopsis* é o fluxo polar de auxina. Parte do processo de transporte polar de auxinas é realizada por proteínas transmembranares específicas (proteínas PIN), que garantem um fluxo de auxina em direção à base do embrião, estabelecendo nesse local uma alta concentração desse hormônio (Friml et al., 2003; Jenik et al., 2007). O *maximum* de auxina na região basal do embrião determina a diferenciação da hipófise e, portanto, a formação do meristema apical radicular.

A diferenciação de estruturas no corpo do embrião está intimamente relacionada com a expressão diferencial de genes induzida por meio do transporte polar de auxina. A família gênica *Aux/IAA* está envolvida com a rápida resposta transcricional ativada pela auxina e é conhecida por apresentar membros que são repressores da transcrição (Mockaitis e Estelle, 2008). As proteínas *Aux/IAA* se ligam aos fatores de transcrição da família *AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)*, que são responsáveis pela expressão de genes ativados pelo transporte polar de auxina. As proteínas *Aux/IAA* e *ARF* formam um complexo que inibe temporariamente a expressão de genes. Com a presença de auxina, as proteínas *Aux/IAA* são reconhecidas pelo sistema *SCF/TIR* (do inglês: *SKP1, Cullin and F-box-containing protein/TIR F-box protein containing leucine-rich repeats*) e são degradadas, permitindo que a transcrição de genes seja iniciada (Kepinski e Leyser, 2004).

O gradiente de concentração de auxina gerado pelo seu transporte polar ao longo do eixo apical-basal do embrião induz a expressão diferencial de genes e, conseqüentemente, a formação de um determinado tecido ou órgão. Dessa maneira, quando um grupo específico de genes é ativado, inicia-se uma programação genética em cascata que culminará no

estabelecimento e na manutenção de estruturas ao longo do desenvolvimento da planta (Friml et al., 2003; Jenik et al., 2007; Chandler et al., 2008).

Genes da família *WOX* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN*) codificam fatores de transcrição expressos em domínios específicos do embrião, determinando o seu padrão de desenvolvimento inicial (Haecker et al., 2004; Chandler et al., 2008). Estes genes foram inicialmente descritos na planta modelo *Arabidopsis* e apresentam 15 membros nesta espécie (Zhang et al., 2010). A análise dos genes *WOX* em outras espécies vegetais, como *Z. mays*, mostra a conservação evolutiva dos padrões de expressão destes genes também em Poaceae, indicando que provavelmente esta família gênica controla aspectos do desenvolvimento do embrião zigótico na maioria das angiospermas (Chandler et al., 2008; Zhang et al., 2010). Principalmente três genes *WOX* determinam a compartimentação do embrião: *WOX2*, *WOX8* e *WOX9*. O gene *WOX2* é responsável por determinar a identidade da região apical no início da embriogênese (Haecker et al., 2004; Chandler et al., 2008). A expressão de *WOX8* é complementar à expressão de *WOX2* e restrita às células basais do embrião (Haecker et al., 2004; Chandler et al., 2008). A expressão desses dois genes já pode ser detectada na oosfera e no zigoto, diferente do que ocorre com *WOX9*, cuja expressão só é observada após a primeira divisão do zigoto, na célula basal, sendo posteriormente restrita à hipófise. A expressão de *WOX9* eventualmente se expande para a região central do embrião (Haecker et al., 2004; Jenik et al., 2007). Além disso, em *Z. mays*, outro gene da família *WOX* também é descrito durante a formação do embrião. O gene *ZmWOX4* marca células procambiais ao longo do eixo embrionário, que darão origem ao sistema vascular do embrião (Chandler et al., 2008). Em *Arabidopsis* e em *Solanum lycopersicum* (tomate), o gene *WOX4* também é expresso em células procambiais de tecidos da planta adulta (Ji et al., 2010) e, embora o seu padrão de expressão não tenha sido descrito para os embriões dessas

espécies, é provável que a função de *WOX4* seja conservada também ao longo do desenvolvimento embrionário.

Os genes *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* também estão envolvidos na diferenciação do ápice caulinar durante a embriogênese zigótica em *Arabidopsis* (Aida et al., 1999; Veit, 2004; Jenik et al., 2007). Eles atuam, juntamente com o gene *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, no posicionamento do meristema apical caulinar. A expressão dos genes *CUC* ao redor do meristema e entre os cotilédones do embrião é requerida para localização correta da expressão de *STM*. De forma recíproca, a expressão de *STM* é importante para a expressão localizada de *CUC* e a separação espacial dos cotilédones (Aida et al., 1999; Veit, 2004; Jenik et al., 2007).

Além da separação espacial dos órgãos diferenciados pelo meristema caulinar, a determinação das faces adaxial e abaxial das estruturas aéreas é fundamental para o desenvolvimento das plantas. A expressão do gene *YABBY1 (YAB1)* especifica o destino celular abaxial em *Arabidopsis* (Siegfried et al., 1999). Durante a embriogênese ele é expresso na região abaxial dos cotilédones, desde o início do desenvolvimento dos primórdios cotiledonares no final da fase globular do embrião (Siegfried et al., 1999). Em *Arabidopsis* 6 genes fazem parte da família *YAB*: *YAB1* ou *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, *YAB2*, *YAB3*, *YAB4* ou *INNER NO OUTER (INO)*, *YAB5* e *CRABS CLAW (CRC)*. Os genes *YAB2* e *YAB3* também apresentam expressão ao longo do desenvolvimento embrionário, porém *YAB3* é expresso tardiamente quando comparado ao *YAB1*: a expressão é detectada apenas no estágio de coração. *YAB2* também é expresso na região abaxial dos cotilédones, entretanto em níveis de expressão bem menores quando comparados aos genes *YAB1* e *YAB3* (Siegfried et al., 1999; Bowman, 2000).

A maior parte do corpo da planta é formada após a germinação, pela elaboração dos meristemas estabelecidos durante a embriogênese. Paralelamente, a formação *de novo* de meristemas (em meio de cultura, por exemplo), demonstra a capacidade do tecido vegetal adulto em realizar organogênese em estágios pós-embrionários. Os programas moleculares da formação *de novo* dos meristemas apicais caulinar e radicular são bastante conservados quando comparados aos programas ativados durante o desenvolvimento embrionário dessas estruturas (Su et al., 2009). Além disso, a regeneração de estruturas é, como na embriogênese, influenciada pelo transporte polar de auxina (Friml, 2003). Experimentos clássicos mostraram que a identidade dos tecidos induzidos *in vitro* é coordenada pela proporção de hormônios presentes no meio de cultura. Foi mostrado, por exemplo, que meios de cultura ricos em auxina induzem a formação *de novo* de raízes (Skoog e Miller, 1957) e é justamente essa a resposta esperada quando se analisa o transporte polar de auxina durante a embriogênese. Outros estudos mostraram a formação de meristemas caulinares através da expressão ectópica de genes como *WUS* (Reinhardt et al., 2003), o que indica a similaridade dos processos de formação dos meristemas apicais caulinares durante a organogênese e durante a embriogênese.

Passiflora

Existem mais de 500 espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* (família Passifloraceae), a maioria originária de regiões tropicais com representantes encontrados principalmente na América Central e do Sul (Ulmer e MacDougal, 2004). O gênero *Passiflora* apresenta inovações morfológicas, principalmente nas estruturas reprodutivas, que são encontradas apenas nesse clado, tais como a corona, o androginóforo e o arilo abundante, originado do crescimento tardio das células do funículo do óvulo (Ulmer e MacDougal, 2004).

Essas estruturas estão diretamente relacionadas ao sucesso reprodutivo dessas espécies e estão envolvidas em eventos de polinização (Fenster et al., 2004) e de dispersão de sementes. Neste último caso, o arilo que envolve a semente no gênero *Passiflora* funciona como recompensa para o animal que é responsável pela sua dispersão (Ulmer e MacDougal, 2004).

Percebendo a importância desses eventos, alguns projetos já se dedicaram ao estudo do desenvolvimento reprodutivo desse gênero, como é o caso do Projeto Passioma (Dornelas et al., 2006), que visou construção de bibliotecas de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs) de estruturas reprodutivas de *P. edulis* e *Passiflora suberosa*. No banco de dados Passioma, estão presentes 6 bibliotecas de diferentes tecidos: ápices de plantas adultas de *P. edulis* (por volta de 1 cm) em estágio reprodutivo, botões florais de *P. edulis* no início do desenvolvimento (com tamanhos entre 0,2 e 0,5 cm de altura), botões florais de *P. edulis* em um estágio posterior de desenvolvimento (entre 0,5 e 1,0 cm de altura), ápices de plantas adultas de *P. suberosa* (por volta de 1 cm) em estágio reprodutivo, botões florais de *P. suberosa* no início do desenvolvimento (com tamanhos entre 0,1 e 0,5 cm de altura), botões florais de *P. suberosa* em estágio posterior de desenvolvimento (entre 0,5 cm e a pré-antese). A partir desses tecidos foram produzidas 10.272 ESTs de alta qualidade, sendo que aproximadamente 50% das sequências são de *P. edulis* e 50% de *P. suberosa* (Cutri e Dornelas, 2012).

Embora trabalhos visando a caracterização morfológica, anatômica e molecular do desenvolvimento floral de espécies do gênero *Passiflora* já estejam disponíveis na literatura científica (Aizza e Dornelas, 2011; Cutri e Dornelas, 2012), pouco se sabe sobre a embriogênese (zigótica ou somática) nessas espécies. O desenvolvimento embrionário se apresenta como um processo importante no desenvolvimento reprodutivo vegetal e os aspectos morfo-anatômicos e moleculares desse evento foram pouco estudados no gênero

Passiflora. Além disso, o desenvolvimento da embriogênese zigótica é condição *sine qua non* para a produção de sementes que, envolvidas pelo arilo, são fundamentais para a produção de suco, especialmente para as espécies comerciais do gênero, como é o caso de *P. edulis* (maracujá azedo).

Assim, este trabalho descreve o estudo da embriogênese zigótica em *P. edulis*, além da comparação da embriogênese zigótica com a embriogênese somática induzida *in vitro*. Com o objetivo de analisar comparativa e evolutivamente o controle molecular envolvido no processo de embriogênese, buscou-se ainda uma análise dos genes expressos na iniciação do programa embrionário somático e zigótico em *P. edulis*.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo determinar as etapas do desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro* de *P. edulis* através da caracterização morfo-anatômica dos embriões zigóticos e somáticos, respectivamente, com o uso de técnicas histológicas e de microscopia eletrônica de varredura. Baseando-se na análise prévia da literatura para busca de genes envolvidos com a formação do embrião em espécies modelo, e tendo como fonte de dados para seleção de genes em *P. edulis* o banco de ESTs do Passioma, foi selecionado um gene de cada uma das seguintes famílias de fatores de transcrição: *Aux/IAA*, *WOX* e *YAB*. Para tais genes, objetivou-se analisar o padrão de expressão ao longo do desenvolvimento embrionário somático e zigótico em *P. edulis* pelas técnicas de RT-PCR, qPCR e hibridização *in situ*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Embriões *in vivo* foram coletados em intervalos regulares de tempo a partir da polinização controlada de flores de plantas de *P. edulis* (cultivar FB100) cultivadas nos campos experimentais do Depto. de Biologia Vegetal do IB, Unicamp, em Campinas, SP. As sementes maduras para a retirada de explantes para a cultura de tecidos *in vitro* foram adquiridas no Viveiro Flora Brasil, cultivar FB100. Os diferentes estágios de desenvolvimento dos frutos, sementes e embriões foram nomeados com base no número de dias após a polinização (DAP). Para análise de PCR quantitativo (qPCR), as coletas foram feitas aos 5 DAP, entre 10 DAP e 15 DAP, entre 15 DAP e 20 DAP, aos 25 DAP e aos 30 DAP.

Todas as amostras destinadas às análises morfo-anatômicas e hibridização *in situ* foram fixadas e desidratadas segundo descrito no item 3.2.2. As amostras destinadas à extração de RNA foram imediatamente congeladas em N₂ líquido e devidamente armazenadas a -80°C até o momento de sua utilização.

3.2. Metodologia

3.2.1. Obtenção de embriões somáticos *in vitro*

Os explantes utilizados para o cultivo *in vitro* foram embriões zigóticos de *P. edulis*. Para a obtenção destes embriões, sementes maduras de *P. edulis* foram abertas e o endosperma retirado (juntamente com o embrião). Esse material foi previamente esterilizado por 20 minutos em solução hipoclorito de sódio 2,5% e lavado três vezes em água destilada autoclavada. Posteriormente, o endosperma foi retirado e apenas os embriões foram colocados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com concentrações de hormônios estabelecidas pelo protocolo publicado por Pinto et al. (2011) para indução de embriogênese

(Tabela 1). As culturas foram mantidas no escuro e a 25°C por 30 dias, e foram feitas coletas antes da indução da embriogênese (explante, zero dias em cultura, ou D0); 5 dias após a indução (D5), 10 dias após a indução (D10), 20 dias após a indução (D20) e 30 dias após a indução (D30)

Todas as amostras destinadas às análises morfo-anatômicas e hibridização *in situ* foram fixadas e desidratadas segundo descrito no item 3.2.2. As amostras destinadas à extração de RNA foram imediatamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C até o momento de sua utilização.

TABELA 1: Composição dos meios de cultura utilizados na obtenção de embriões somáticos, baseados no meio MS (Murashige e Skoog, 1962). Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,8 e autoclavados por 20min a 120°C (1atm).

<i>Macronutrientes</i>	(g.L⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1,65
KNO ₃	1,90
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,44
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,37
KH ₂ PO ₄	0,17
<i>Micronutrientes</i>	(mg.L⁻¹)
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
<i>Ferro – EDTA</i>	
Na ₂ EDTA	33,6
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8
<i>Vitaminas</i>	
Ácido Nicotínico	1
Piridoxina	1
Tiamina	10
Inositol	100
Sacarose	30.000
Phytigel	2.500
<i>Fitorreguladores</i>	
2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	16
BAP (6 -benzilaminopurina)	1

3.2.2. Microscopia óptica e eletrônica de varredura

Explantos em D0 e calos em D30, juntamente com sementes em diferentes estágios de desenvolvimento foram analisados em microscópio estereoscópico (ZEISS, modelo AXIOSKOPE) e documentados em fotografia digital com o uso do programa AxionVision.

Amostras de calo e sementes nos diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas, fixadas e preparadas para a observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a para a obtenção de cortes histológicos seriados para a observação em microscopia óptica (MO) e hibridizações *in situ*. A fixação do material, tanto para MO como para MEV foi feita a vácuo, em 4% paraformaldeído (p/v) em tampão fosfato, por 16 h a 4°C. O material submetido à MEV foi desidratado em série etílica, seco ao ponto crítico e metalizado com ouro coloidal (camada de 40 nm). A observação foi feita em microscópio de varredura LEO 435 VP. As imagens digitalizadas das observações foram obtidas utilizando-se o programa LEOUIF. A análise de MEV foi disponibilizada pelo Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, no laboratório de microscopia eletrônica (NAP/MEPA) da USP-ESALQ.

O material fixado para ser seccionado foi desidratado em série etílica e incluído em resina plástica (Historesin®, Leica), seguindo-se as instruções do fabricante. Secções de 5 µm foram obtidas com o uso de micrótomo rotativo e foram montadas em lâminas. Dois tipos diferentes de coloração foram utilizadas: azul de toluidina a 0,05% (p/v) em tampão de tetraborato de sódio (Huber et al., 1968), e Mäule: os cortes foram emergidos em permanganato de potássio 0,5% por 10 min, lavados com água, tratados com ácido clorídrico 3% por 5 min, e, posteriormente foi adicionado hidróxido de amônio concentrado. A secagem e montagem das lamínulas foram feitas em Entellan, as lâminas permanentes foram observadas em microscópio ZEISS modelo AXIOSCOPE 40 e fotografadas.

3.2.3. Análise do banco de dados e comparações de seqüências

Um levantamento de genes envolvidos com o processo de embriogênese na espécie modelo *Arabidopsis* foi feito a partir da literatura. Genes previamente selecionados foram: *LEC1*, *WUS*, *WOX2*, *WOX8*, *WOX9*, *PLT*, *YAB1*, *BODENLOSS (BDL)* – pertencente à família *Aux/IAA*, *MONOPTEROS (MP)* – pertencente à família *ARF* dentre outros. Sequências destes genes e suas respectivas proteínas foram adquiridas no banco de dados TAIR [The *Arabidopsis* Information Resource - (Poole, 2007)]. Estas seqüências foram utilizadas como “query” em buscas no banco de dados do Projeto Passioma (Dornelas et al., 2006) resultando na identificação de potenciais homólogos em *P. edulis*. Foram encontrados membros das famílias gênicas *Aux/IAA*, *WOX* e *YAB*.

As seqüências dos genes encontrados no banco de dados do Projeto Passioma foram alinhadas com seus possíveis homólogos descritos para outras espécies de plantas usando o programa Clustal W (Thompson et al., 1994). O alinhamento obtido foi utilizado para a obtenção de uma matriz de distâncias (método de parcimônia) pelo programa Mega 4.0 (Kumar et al., 2001). A robustez das árvores obtidas foi testada com cálculos de Bootstrap em 1000 repetições.

3.2.4. Análise da expressão gênica

Para a análise dos padrões de expressão dos genes identificados como descrito no item anterior, foram utilizadas as técnicas de RT-PCR semi-quantitativa e qPCR. Para essas análises, RNA total de cada amostra (constituída de uma mistura de diferentes amostras biológicas) foi isolado com o reagente TRizol (Invitrogen, de acordo com as instruções do fabricante), com posterior tratamento com DNase turbo[®]. Para confirmar a degradação de todo o DNA genômico, foi feita uma reação de PCR com os primers de *PeACT1* (Tabela 2) utilizando-se como amostra o RNA total tratado com DNase. Após essa confirmação, a

síntese de cDNA partiu de 1 µg de RNA total de cada amostra e utilizou-se o kit “Super Script First Strand Synthase” (Invitrogen, de acordo com as instruções do fabricante). Para a análise do padrão espacial de expressão desses genes, foi utilizada a técnica de hibridização *in situ*.

3.2.5. RT-PCR semi-quantitativa

Os cDNAs dos ovários de flores polinizadas de *P. edulis* (contendo embriões zigóticos) e dos embriões somáticos foram primeiramente amplificados com 20, 25, 30 e 35 ciclos de PCR (com utilização dos primers específicos de *PeACT1*, veja abaixo) com a finalidade de verificar a qualidade dos cDNAs produzidos e determinar as condições de reação não-saturante. Para tal, o cDNA concentrado foi diluído 10 vezes. Os ciclos das reações de PCR não-saturantes foram: 3 min a 95°C, seguido de 28 ciclos de 15 s a 95°C, 15 s a 55°C (no caso de *PeACT1*) ou 60°C (no caso dos genes candidatos), 30 s a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os pares de primers referentes aos genes candidatos foram desenhados para a análise de expressão dos mesmos a partir das sequências identificadas no item 3.2.3. (Tabela 2).

TABELA 2 – Primers utilizados para a análise de RT-PCR em *Passiflora edulis*.

Genes	“Primer foward”	“Primer reverse”
<i>PeACT1*</i>	ACCCACAACAGAGCACAACA	CCAGTGGTGGTGAAGGAGTAA
<i>PeYAB1</i>	GTCATGCCATTTTCGAGGAGT	ACGGGTTGATCAGGCATAAG
<i>PeAux/IAA</i>	AAACCCCTTTGAGCTACACATC	TCTTTTCCTTGAATCAACATT
<i>PeWOX4</i>	GAGCACGAACCCACATCTCT	TGTACATTGGGGGTCCTCAT

*Gene normalizador

Para a visualização do produto de PCR, 10µl de cada reação foram migrados juntamente com tampão de corrida 6x concentrado (6x DNA loading Dye, Fermentas) em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, Ac. Acético 20 mM, EDTA 1 mM).

Para verificar o tamanho das bandas foi utilizado o marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas).

3.2.6. PCR quantitativo (qPCR)

Para a análise de qPCR foram desenhados primers específicos com a utilização do programa Primer Express (Applied Biosystems), com seus parâmetros padrões, para os mesmos genes candidatos selecionados analisados pela RT-PCR semi-quantitativa. As reações de qPCR foram preparadas com o SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para ser utilizado com amostra, o cDNA de todos os tecidos analisados foi diluído 50 vezes. O volume final de cada reação foi de 10 µl dos quais: 5 µl Master Mix, 3 µl cDNA (amostra), 0,2 µl de cada primer a 10 mM.L⁻¹ (forward e reverse) e 1,6 µl de água. Cada amostra foi processada em triplicata técnica, sendo considerada também uma reação sem cDNA (controle). Foram realizadas três triplicatas biológicas para cada tecido e gene analisados. As reações foram feitas sob as seguintes condições, usando Chromo 4 Real Time PCR Detector (BioRad™): 5 min a 94°C seguidos de 40 ciclos de: 15 s a 94°C, 10 s a 60°C, 15 s a 72°C. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise da curva de dissociação gerada pelo equipamento. Um valor específico de Ct (*Cycle threshold*) foi criado, sendo que o Ct é definido como o número de ciclos no qual a taxa de amplificação do gene alvo é a mais exponencial para todas as amostras avaliadas. A quantidade relativa das moléculas alvo em relação ao calibrador foi calculada pelo software iQ™ Optical System Software que acompanha o equipamento, a partir do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Após analisar a expressão dos ortólogos de *P. edulis* dos genes codificadores de actina (*PeACT1*) e de uma enzima conjugadora de ubiquitina (*PeRAD6*) nas amostras a serem estudadas, *PeACT1* foi escolhido como um potencial gene constitutivo por apresentar valores de Ct mais estáveis e mais próximos dos valores obtidos para esse mesmo gene nas amostras analisadas neste trabalho, sendo utilizado para a normalização dos resultados. Na

tabela 3, seguem as sequencias de primers utilizadas para as análises de qPCR .

TABELA 3 – Genes escolhidos para as análises de expressão ao longo do desenvolvimento embrionário zigótico e somático em *Passiflora edulis* e seus respectivos primers.

Genes	"Primer forward"	"Primer reverse"
<i>PeACT1*</i>	CCAGGCATTGCTGATAGGAT	ATTCTGCCTTTGCAATCCAC
<i>PeRAD6*</i>	TGGAAGCATTTGTTTGGACA	TCCGAGCAGCTTCTGAGTTT
<i>PeYAB1</i>	GTCATGCCATTTTCGAGGAGT	ACGGGTTGATCAGGCATAAG
<i>PeAux/IAA</i>	CGAGCGCGATTTGAACTACA	ATCCACCGCTCCTTCCTTTG
<i>PeWOX4</i>	TCAGCTGGCTCGTGGATTCT	AGGAGGTGACCGCAGTAGCA

*Genes normalizadores

3.2.7. Hibridização *in situ*

As hibridizações foram realizadas utilizando-se sondas não-radioativas, segundo técnica já descrita na literatura (Dornelas et al., 1999). Sondas sense e antisense foram obtidas pela transcrição *in vitro* de plasmídeos linearizados contendo os cDNAs de interesse, com incorporação de uracilas marcadas com digoxigenina (DIG), segundo as instruções do fabricante do material de marcação (Boheringer-Mannheim). Os tecidos fixados e desidratados das amostras vegetais (veja item 3.2.2.) foram emblocados em parafina, seccionados seriadamente (10 µm) e montados em lâminas para microscopia pré-tratadas com solução 2% de 3-aminopropiltriétoxissilana em acetona. O material foi desparafinado com dois banhos de 15 min cada de xilol puro, seguidos por banhos, também de 15 min, em séries de xilol:etanol nas proporções 3:1; 1:1 e 1:3, respectivamente. Para finalizar, foram feitas duas imersões de 10 min cada em etanol absoluto e as lâminas foram secas ao ar. As amostras foram submetidas ao tratamento de pré-hibridização com proteinase-K (1 µg/ml em Tris-HCl 0,05 M pH:7,5) por 12 min a 37°C, e lavadas posteriormente em água livre de RNA. Foram adicionados 300 µl de solução de hibridização em cada lâmina (10 mM de Tris-HCl pH:7,5; 300 mM NaCl; 50% formamida deionizada; 1mM EDTA; 1x Denharts; 10% Dextran Sulfato 50% e 600ng de sonda marcada). As lâminas foram cobertas com filme plástico

(Parafilm) e incubadas em câmara úmida a 42°C por 16 h. O tratamento de pós-hibridização foi conduzido sob condições de estringência apropriadas, através de duas lavagens em solução salina SSC 20 vezes concentrado (0,15 M NaCl e 0,015 M citrato de sódio) quatro vezes concentrada por 30 min cada e duas lavagens em solução salina SSC duas vezes concentrada também por 30 min cada. Todas as lavagens foram realizadas à temperatura de 42°C. A seguir, iniciou-se o processo de imuno-deteccção. Para tal, as lâminas foram inicialmente mantidas por 5 min em DB1 (0,1 M Tris-HCl e 0,15 M NaCl, pH 7,5) em cubetas e posteriormente as lâminas foram submetidas ao tratamento de 30 min em tampão de bloqueio DB2 que consistiu em uma solução 1% de Blocking reagent (Roche), dissolvido em DB1. Após essa etapa, as lâminas foram enxaguadas em DB1 e, posteriormente, submetidas ao tratamento com solução DB2 contendo anticorpo (anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina, diluição 1:1000), incubando-as por 60 min em câmara úmida. Após esse período foram feitas duas lavagens em DB1 de 15 min cada e uma lavagem de 5 min em DB3 (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl₂.6H₂O; pH 9,5). Para a reação de detecccção colorimétrica da atividade da fosfatase alcalina, as lâminas foram tratadas com uma solução comercial de NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium chloride/ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine) contendo 1 µM de levamisole (Pierce). A reação de detecccção ocorreu em câmara úmida e no escuro por cerca de 16 h. As lâminas hibridizadas foram observadas ao microscópio e fotografadas para posterior análise.

4. RESULTADOS

4.1. Análise morfo-anatômica da embriogênese zigótica em *P. edulis*

Dez dias após a polinização (10 DAP) o zigoto encontrou-se envolto por resíduos, provavelmente oriundos do tubo polínico (Figura 1A). Em 11 DAP observou-se a primeira

divisão do zigoto, determinando a célula apical com citoplasma mais denso e uma célula basal mais vacuolizada (Figura 1B). Nesta fase o endosperma ainda não estava celularizado e foi possível visualizar vários núcleos livres no sincício logo acima do embrião (Figura 1B).

Aos 14 DAP, o embrião se encontrava em transição do estágio de 4 para 8 células (Figura 1C). A seta indica a finalização de uma divisão celular. Aos 15 DAP o embrião apresentou uma intensa proliferação celular, se encontrando no início do estágio globular (Figura 1D). A seta vermelha nesta mesma Figura indica a separação entre o embrião propriamente dito e o suspensor. A diferença celular entre as duas estruturas é evidente, uma vez que o embrião apresentava células com citoplasma denso e núcleo central, e o suspensor células com amplo vacúolo e núcleo posicionado marginalmente, próximo a parede celular (Figura 1D). Aos 19 DAP, o embrião se encontrava em estágio globular avançado (Figura 1E). Observa-se o início da celularização do endosperma e a lignificação de uma das camadas dos tegumentos. Ainda nessa etapa o suspensor era composto por volta de 6 camadas de células. Aos 23 DAP, o embrião iniciou o estágio de coração, quando as protuberâncias apicais no embrião indicam o começo da formação do cotilédone (Figura 1F).

Aos 25 DAP, os cotilédones se tornaram mais evidentes (Figura 1G). Aos 27 DAP, o embrião atingiu o estágio de torpedo. Nessa fase uma das camadas do tegumento externo está lignificada e foi possível observar os cotilédones mais alongados (Figuras 1H e 1I). As secções longitudinais foram realizadas observando-se a orientação das células dos tegumentos. Os embriões na fase de torpedo não foram seccionados por completo na região mediana. Isto indica que durante o desenvolvimento embrionário, os embriões podem sofrer um pequeno desvio na orientação em relação a orientação das camadas externas do tegumento.

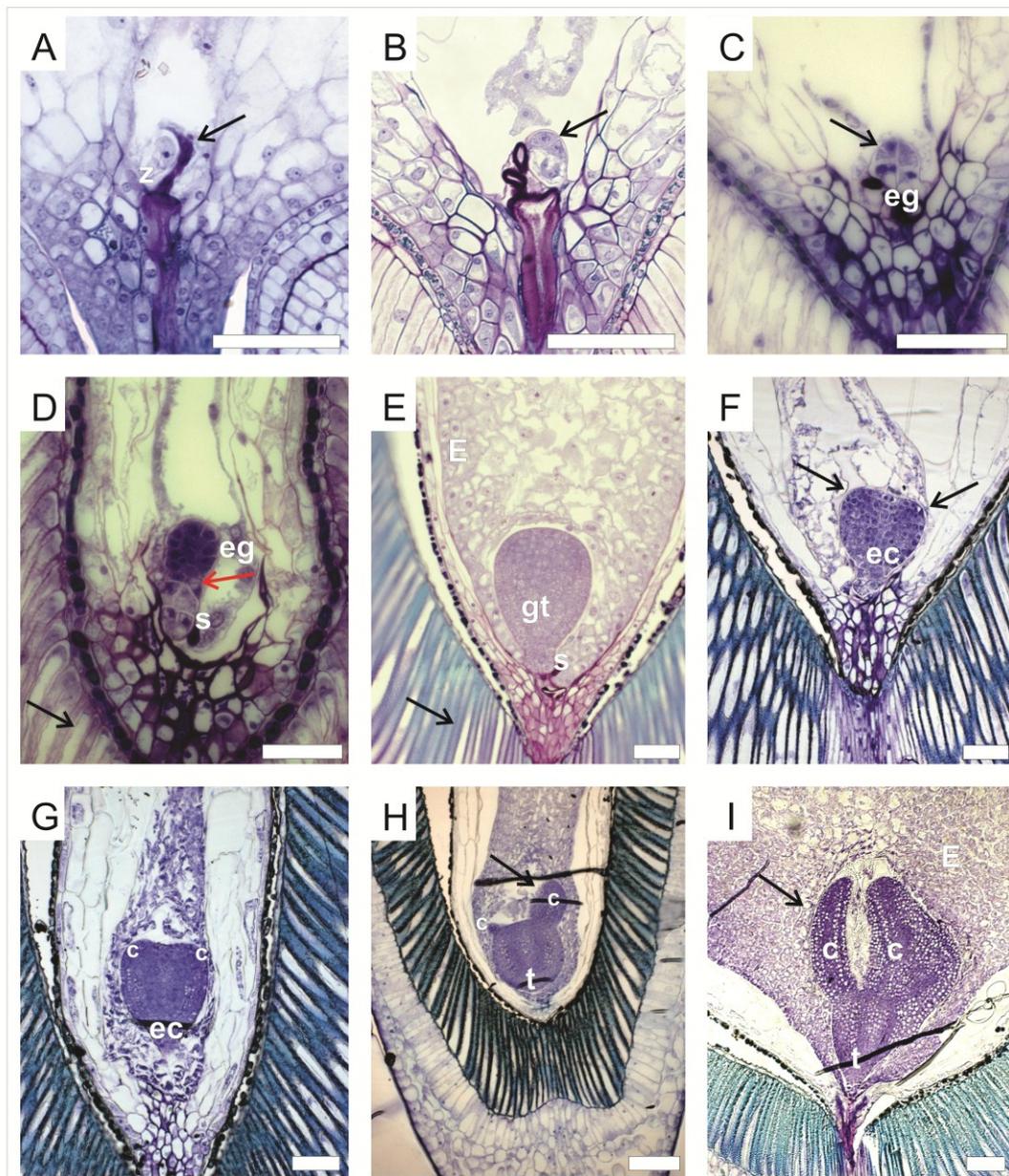


Figura 1 – Secções longitudinais dos embriões zigóticos de *Passiflora edulis* em diferentes estágios de desenvolvimento. **(A)** Zigoto aos 10 dias após a polinização (DAP). Setas indica traço de calose em forma de gancho deixado pelo tubo polínico. **(B)** Primeira divisão do zigoto aos 11 DAP. Setas indica o local da primeira divisão. **(C)** Embrião aos 14 DAP: transição do embrião de 4 células para um embrião de 8 células. Setas indica local da divisão celular. **(D)** Embrião em estágio globular inicial aos 15 DAP. Setas vermelha indica a separação entre suspensor e embrião. Setas pretas indica camada alongada de células de um dos tegumentos externos da semente. **(E)** Embrião em estágio globular tardio aos 19 DAP. Setas indica a mesma camada de células indicada na figura D, agora apresentando lignificação da mesma. **(F)** Embrião no estágio de coração inicial aos 23 DAP. Setas indicam início do desenvolvimento dos cotilédones. **(G)** Embrião em estágio de coração mais avançado aos 25 DAP. **(H e I)** Embrião em estágio de torpedo aos 27 DAP. Setas indicam cotilédones em diferentes planos de cortes. Letras **z** – zigoto; **eg** – embrião globular; **s** – suspensor; **gt** – embrião globular tardio; **E** – endosperma; **ec** – embrião em estágio de coração; **c** – cotilédone; **t** – embrião em estágio de torpedo. Barras = 100 μ m.

Juntamente com o desenvolvimento embrionário, realizou-se uma análise do desenvolvimento dos tegumentos da semente (Figura 2). Os tegumentos interno (tégmen) e externo (testa) na região da micrópila começaram a ser analisados aos 8 DAP (Figura 2A). Cada um dos dois tegumentos apresentou três camadas de células identificados ainda aos 8 DAP, quando também foi possível identificar o nucelo (Figura 2B). Aos 10 DAP, a camada mais interna da testa (endotesta) e a camada mais externa do tégmen (exotégmen) começaram a se alongar, entretanto as diferentes camadas dos tegumentos mantiveram-se com camadas únicas como aos 10 DAP (Figura 2C). O alongamento celular continuou aos 14 DAP, entretanto nesse momento do desenvolvimento algumas células do exotégmen se alongaram mais que outras, e algumas invaginações começaram a se formar (Figura 2D). Estas, posteriormente formarão as ornamentações da semente madura. O estudo do desenvolvimento de tais ornamentações é importante sob o ponto de vista de classificação de táxons, uma vez que essa característica é considerada de alto valor taxonômico. Além de servir como elemento de classificação entre espécies, também auxilia na divisão de subgêneros: muitas espécies do gênero *Passiflora* apresentam ornamentação aureolada, reticulada ou pontuada, mas o subgênero *Decaloba*, também pertencente ao mesmo gênero, apresenta sementes com estrias transversais (Ulmer e MacDougal, 2004).

Aos 23 DAP, a camada de células do exotégmen atingiu o tamanho máximo em espessura devido ao alongamento no sentido anticlinal e inicia-se o processo de lignificação, indicando que a camada rígida dos tegumentos externos da semente foi formada a partir do exotégmen, possibilitando a classificação das sementes de *P. edulis* em sementes exotegmáticas (Figura 2E). Até 25 DAP, a lignificação da semente se intensificou, e foi evidenciada pela coloração com o Reagente de Mäule, corante específico que mostra, em tons castanhos, a impregnação de lignina na parede celular do exotégmen (Figuras 2G e 2H).

Pode ser observado também a morfologia da semente ao longo de seu desenvolvimento de 8 DAP até 65 DAP (Figura 3). Para correlacionar temporalmente o desenvolvimento embrionário e o desenvolvimento dos tegumentos externos da semente, foi elaborado um cronograma do desenvolvimento geral da semente em *P. edulis* (Figura 4).

O embrião atinge a fase de torpedão aos 27 DAP, e posteriormente este continua a se desenvolver em tamanho até que preenche toda a área interna da semente. Esta pode levar até 70 dias para atingir o seu estágio de desenvolvimento final, incluindo modificações na cor do tegumento da semente, formação do arilo e suco.

Após a polinização e o desenvolvimento da semente foi observado que até a semente atingir dimensões próximas a da semente madura aos 15 DAP (por volta de 0,7 cm) o embrião permanecia ainda no estágio globular inicial. Somente após o início da lignificação de camadas de células do tegumento da semente, próximo aos 20 DAP, o embrião passa a apresentar intensas divisões celulares completando o seu desenvolvimento como demonstrado na figura 4.

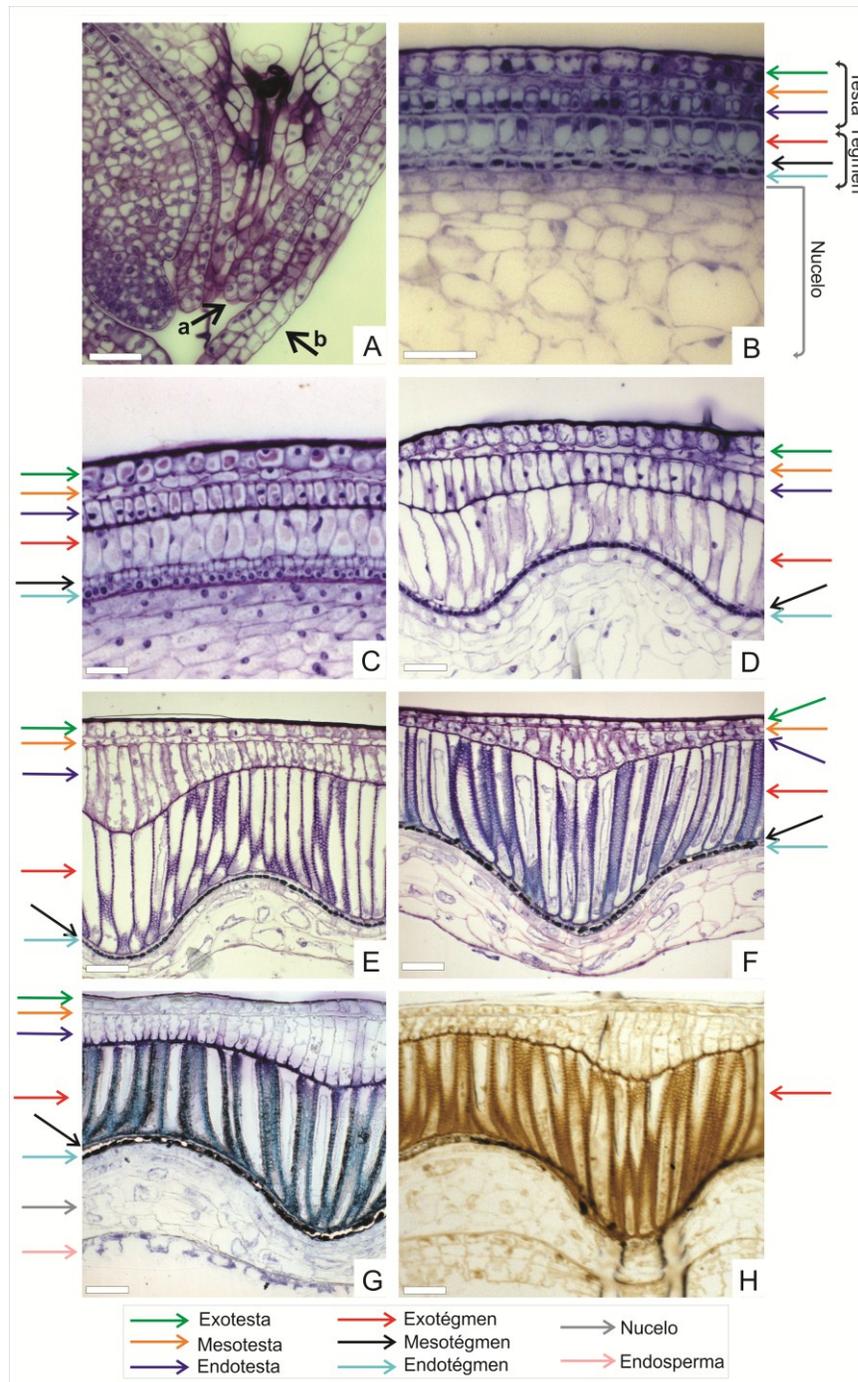


Figura 2 – Desenvolvimento dos tegumentos da semente de *Passiflora edulis*. **(A)** Região da micrópila em uma semente 8 DAP. Setas indicam tegumento interno (**a** – tégmen) e tegumento externo (**b** – testa). **(B)** Corte transversal da semente identificando as camadas que compõe tanto a testa como o tégmen. **(C)** Início do alongamento da camada externa do tégmen aos 10 DAP. **(D)** Alongamento mais acentuado do exotégmen e início de um alongamento na endotesta aos 14 DAP. Iniciam-se a formação de invaginações dos tegumentos que irão formar as ornamentações da casca da semente. **(E)** Início da lignificação do exotégmen aos 17 DAP. **(F)** Aumento da lignificação do exotégmen aos 23 DAP. **(G e H)** Tegumentos da semente aos 25 DAP. Aumento da lignificação do exotégmen mostrada também em H por meio de coloração com reagente de Mauli. Barras = 50µm. DAP: dias após a polinização.

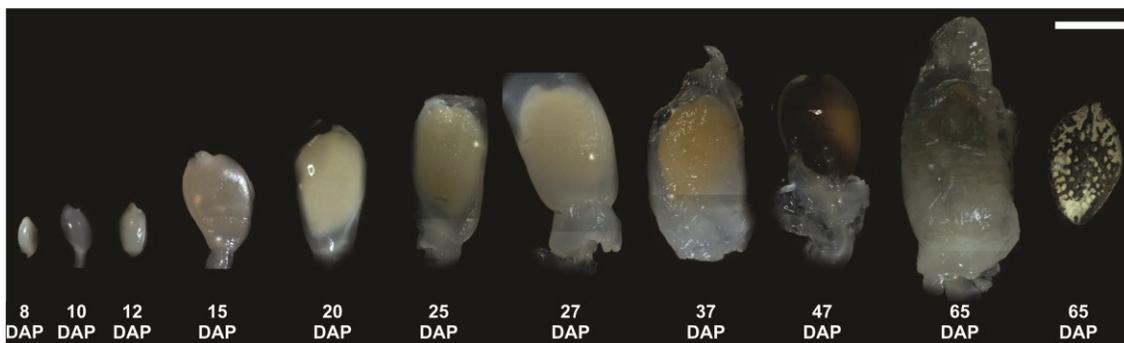


Figura 3 – Desenvolvimento morfológico da semente de *Passiflora edulis* juntamente com o arilo que a envolve e aos 65 DAP com o arilo retirado. DAP = Dias após a polinização. Barra = 0,5cm.

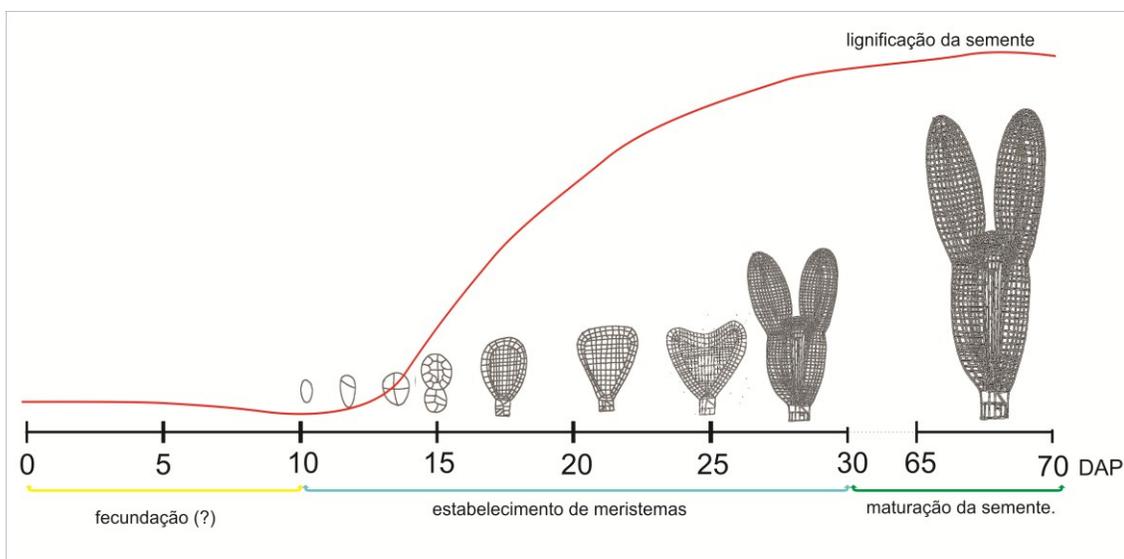


Figura 4 – Esquema que identifica três principais etapas durante o desenvolvimento embrionário de *Passiflora edulis* sendo a primeira fase: a fecundação da oosfera pelo grão de pólen, a segunda fase: o estabelecimento dos meristemas e cotilédones, e a terceira fase de maturação do embrião. A linha em vermelho ilustra o aumento da lignificação (a escala é arbitrária) da semente ao longo do desenvolvimento embrionário. DAP = dias após a polinização.

4.2. Análise morfo-anatômica da embriogênese somática em *P. edulis*

Podem-se observar duas diferentes etapas da indução da embriogênese somática em *P. edulis* (Figura 5). O explante utilizado no experimento de cultura de tecidos é o embrião zigótico maduro de *P. edulis* (Figura 5A). Ainda nessa figura, a superfície abaxial do cotilédone que não entrou em contato com o meio de cultura (aqui identificado como cotilédone superior). Imediatamente abaixo deste, encontra-se o outro cotilédone (não observável – identificado como cotilédone inferior) que foi apoiado sobre o meio de cultura. Os embriões somáticos surgiram a partir do cotilédone do embrião que não ficou em contato com o meio de cultura. Tais embriões podem ser observados no explante 30 dias após a indução da embriogênese somática (Figura 5B). A Figura 5C mostra em um maior aumento a porção marginal dos cotilédones, de onde começaram a surgir os embriões somáticos 30 dias após a indução do processo de embriogênese, mostrados em detalhe na Figura 5D.

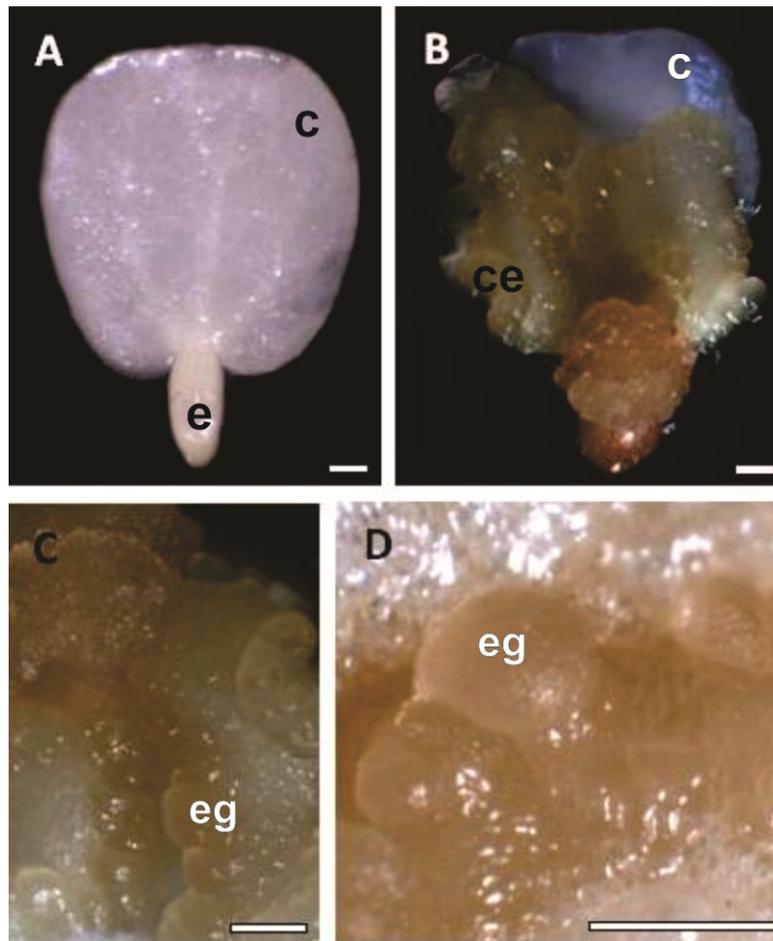


Figura 5. Embriogênese somática *in vitro* em *Passiflora edulis*. . As imagens foram obtidas por observação em microscópio estereoscópico. **(A)** Embrião zigótico obtido a partir da semente madura de *P. edulis*, utilizado com explante. **(B, C, D)** Calos embriogênicos após 30 dias de indução. **e** – corpo do embrião, **c** – cotilédone; **ce** – calo embriogênico; **eg** – embrião globular. Barras = 5mm.

A Figura 6A e 6C mostram em secção transversal os cotilédones do embrião zigótico maduro (explante) antes de ser induzido o processo de embriogênese somática. Os cotilédones apresentam epiderme da face adaxial e abaxial uniestratificada e mesofilo homogêneo e composto por 4 a 5 camadas de parênquima clorofiliano. A superfície dos cotilédones pôde ser observada por meio de MEV, e os detalhes anatômicos evidenciados por MO (Figura 6B e 6C, respectivamente). As células que compõem os cotilédones são isodiamétricas e com conteúdo granular abundante.

Dois cortes em diferentes aumentos de cotilédones superiores dez dias após a indução da embriogênese somática *in vitro* foram caracterizados (Figuras 6D e 6E). Nesses

cotilédones pode-se observar intensas divisões celulares na camada epidérmica e sub-epidérmica da face abaxial dos mesmos. Neste período foi possível identificar massas celulares que formaram protuberâncias compostos por células pequenas e com conteúdo denso que foram inicialmente observadas apenas na epiderme abaxial dos cotilédones (indicados pelas setas nas figuras 6D e 6E). A epiderme adaxial desses cotilédones não apresentou divisões periclinais que indicassem aumento do número de células nem possível formação de embriões. Vinte dias após a indução da embriogênese, o explante apresentou formação de massa celular em ambos os cotilédones, indicando um aumento na área de formação dessas estruturas (Figura 6F). O cotilédone superior do explante após 20 dias de cultivo no meio de cultura (Figura 6G) apresentou regiões de células meristemáticas e estruturas globulares espalhadas ao longo de toda a sua extensão. Ainda que a tendência dessas regiões seja crescer e ocupar o explante como um todo, a origem de tais estruturas se manteve restrita à epiderme abaxial do cotilédone superior do explante, como observado no estágio anterior de desenvolvimento do calo (Figura 6D). As células da epiderme abaxial do cotilédone superior do explante também sofreram modificações estruturais: se tornaram grandes e vacuolizadas, apresentando poucas divisões celulares e aumento de volume.

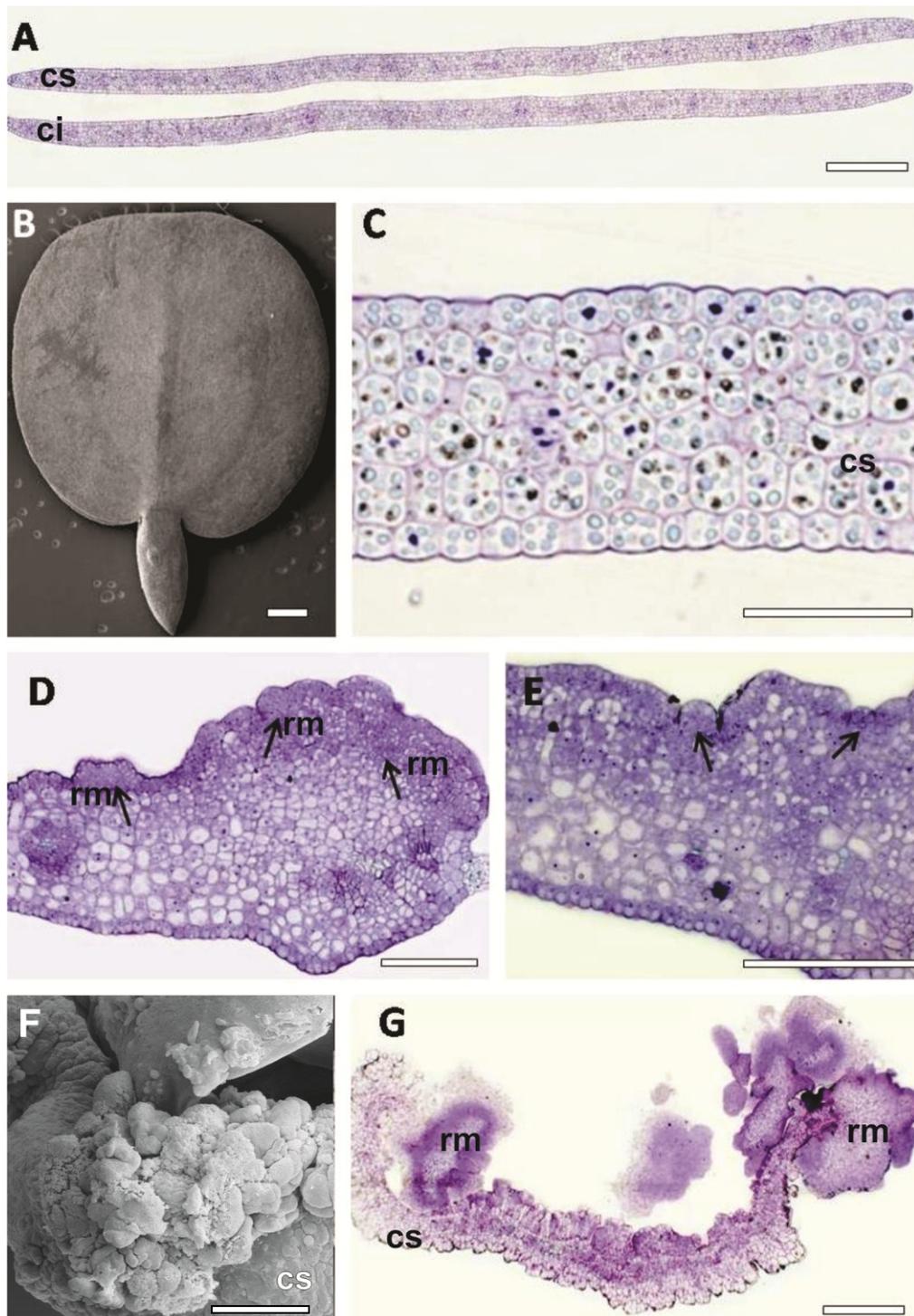


Figura 6. Desenvolvimento de embriões somáticos *in vitro* em *Passiflora edulis*. (A) Cotilédones do embrião zigótico utilizado como explante em corte transversal, observado em microscopia óptica. Microscopia eletrônica de varredura do explante (MEV) (B) e detalhe da anatomia do mesmo em microscopia óptica (C). (D, E) Corte transversal do cotilédone dez dias após a indução da embriogênese *in vitro*. Setas indicam superfície abaxial dos cotilédones do explante que sofreram divisões celulares. MEV (F) e corte transversal (G) do cotilédone 20 dias após a indução da embriogênese *in vitro*. **cs** – cotilédone superior; **ci** – cotilédone inferior; **rm** – região meristemática. Barras=100µm.

Após 20 dias da transferência dos explantes para o meio de indução da embriogênese somática, foram observados embriões globulares (Figuras 7A – 7F) formados a partir da proliferação celular observada nas camadas mais externas da face abaxial do cotilédone que não estava em contato com o meio de cultura, analisados em cortes anatômicos transversais nas Figuras 7B, 7D e 7F. Estas estruturas apresentaram uma intensa proliferação celular. Aos 30 dias após a indução, os embriões somáticos globulares já não puderam mais ser identificados facilmente (Figura 7G e 7H). Camadas de células que permeiam a massa de células do calo apresentaram o citoplasma mais denso (Figura 7H). Como não houve uma troca de meio de cultura, a quantidade de auxina presente ainda é muita alta e provavelmente desencadeou um processo de formação de embriões somáticos secundários. Dessa maneira, o embrião globular antes observado não chega a estágios de desenvolvimento mais avançados, uma vez que provavelmente houve uma redefinição dos destinos celulares de sua protoderme, gerando uma embriogênese repetitiva a partir das camadas celulares superficiais dos primeiros embriões somáticos formados *in vitro*.

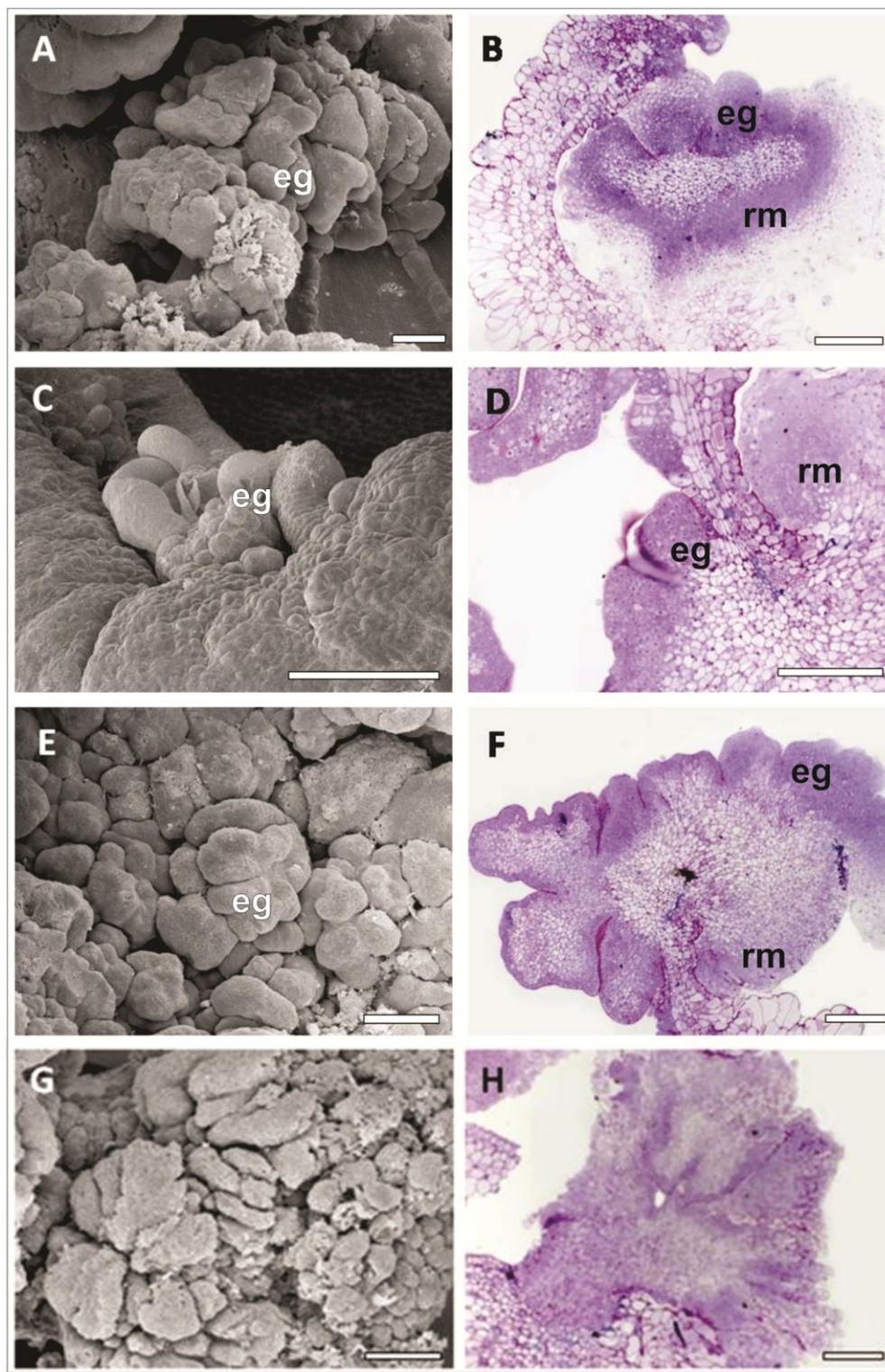


Figura 7. Embriões somáticos *in vitro* em *Passiflora edulis*. Microscopia eletrônica de varredura (**A, C, E e G**) e microscopia óptica (**B, D, F e H**) de regiões embriogênicas dos calos, 20 dias (**A-F**) e 30 dias (**G-H**) após a indução da embriogênese somática. **eg** – embrião globular; **rm** – regiões meristemáticas. Barras=100 μm.

4.3. Data-mining e análise das sequências obtidas do banco de dados de EST

- Passioma

Inicialmente, genes como o *LEC1*, *WUS*, *WOX2*, *WOX8*, *WOX9*, *PLT*, *YAB1*, *BDL* e *MP*, descritos como sendo importantes durante o desenvolvimento do embrião em espécies modelos como *Arabidopsis*, foram selecionados. A partir da sequência gênica dos mesmos, a busca no banco de dados Passioma, resultou na seleção inicial de ESTs relacionados ao processo de embriogênese em *P. edulis*. Algumas seqüências de *P. suberosa* também foram encontradas e adicionadas às análises filogenéticas. Esses genes encontrados pertencem às famílias multigênicas de fatores de transcrição *Aux/IAA*, *WOX*, e *YAB*.

As Figuras 8, 10 e 12 mostram os cladogramas construídos com o método de Neighbor-joining. Com essa estratégia foi possível identificar em *P. edulis* alguns dos possíveis ortólogos dos genes caracterizados em *Arabidopsis* das famílias *Aux/IAA*, *WOX* e *YAB*. A Figura 8 mostra a árvore construída a partir do alinhamento de seqüências de aminoácidos de proteínas homólogas às proteínas *Aux/IAA* de *Arabidopsis*. Os resultados sugerem que os ortólogos mais prováveis para PACEPE3005A01, PACEPE3007E06 e PACEPE3020B01 seriam AXR3/IAA17, IAA16 e IAA2, respectivamente. No entanto, os valores de bootstrap não excluem a possibilidade de que outros ortólogos/parálogos existam. É por esta razão que manteve-se os nomes dos clones originais (PACEPE3005A01, PACEPE3007E06 e PACEPE3020B01) ao invés de renomeá-los com o prefixo *Pe* (para *P. edulis*).

Os clones PACEPS7009B06 e PACEPS7013C09 representam ortólogos potenciais de IAA9 (suportado por um bootstrap de 83%). No entanto, estes clones são de *P. suberosa*. O gene PACEPE3005A01 foi escolhido para ser analisado durante a embriogênese em *P. edulis* pela qualidade de sua seqüência de EST. Assim, PACEPE3005A01 foi renomeado nesse

trabalho apenas como *PeAux/IAA*, uma vez que seu ortólogo direto não pode ser identificado nas análises filogenéticas.

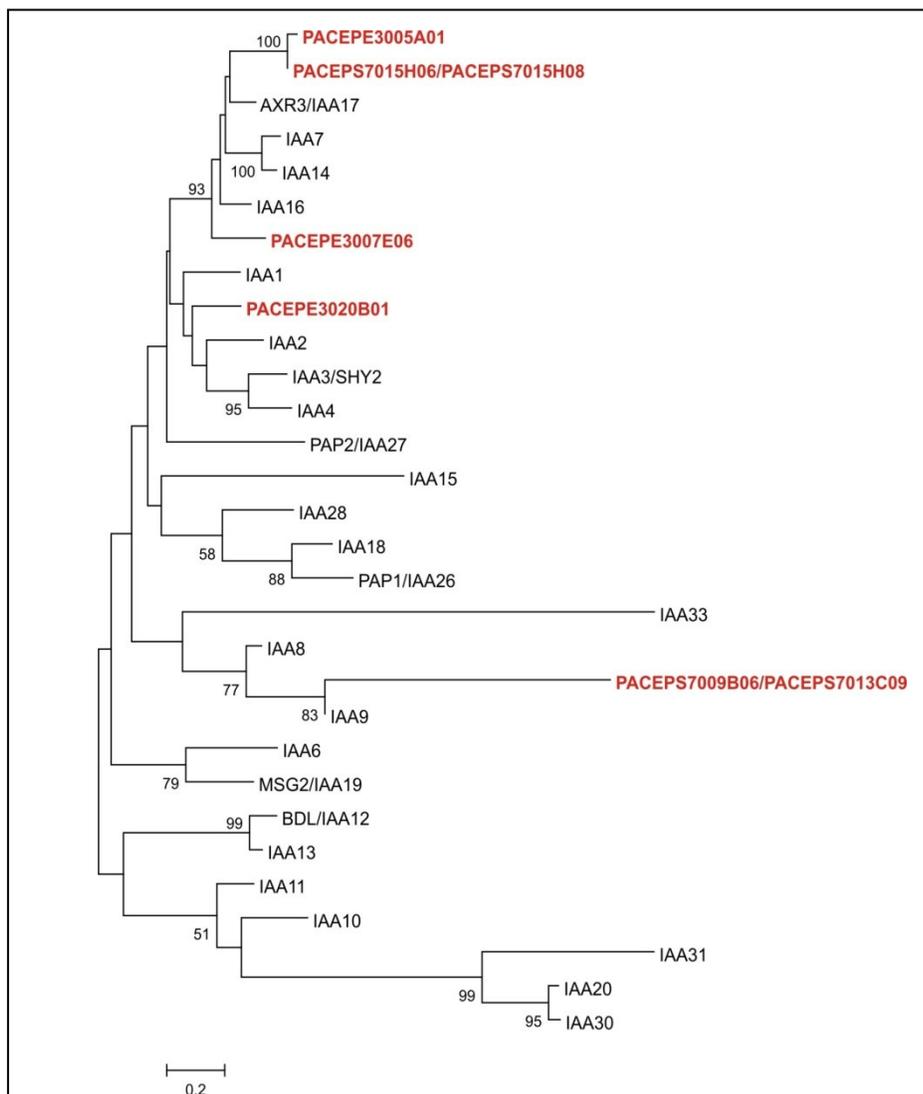


Figura 8. Árvore construída pelo método de Neighbor joining mostrando as relações de similaridade entre membros da família Aux/IAA de *Arabidopsis* e seus possíveis ortólogos em *Passiflora edulis* (sequências com nome iniciando-se em PACEPE) e *Passiflora suberosa* (sequências com nome iniciando-se em PACEPS). Valores de Bootstrap para 1000 replicatas são indicados quando superiores a 50. Escala indica o número de substituições.

O fragmento da proteína de *PeAux/IAA* utilizado para construir a árvore filogenética foi também alinhado com proteínas da mesma família gênica em outras espécies (Figura 9). Essas sequências foram adquiridas com o auxílio banco de dados do NCBI, utilizando-se como 'query' a sequência proteica resultante da tradução do EST selecionado para as análises neste trabalho. A partir do resultado obtido no NCBI, sequências proteicas com

valores de *E value* significativos foram selecionadas e alinhadas para identificação de domínios proteicos conservados. Neste alinhamento é possível identificar três dos quatro domínios proteicos que caracterizam a família Aux/IAA (indicados no alinhamento). Os domínios I e II são os domínios menos conservados entre as proteínas dessa espécie. O domínio I é responsável por uma região rica em leucina e é uma forte região repressora da transcrição. O domínio II está relacionado com a rápida degradação dessas proteínas pelo sistema SCF^{tr}. Os domínios III e IV são os mais conservados entre as proteínas dessa família, sendo responsáveis pela interação das proteínas Aux/IAA com as proteínas ARF (Jain et al., 2006; Audran-Delalande et al., 2012).

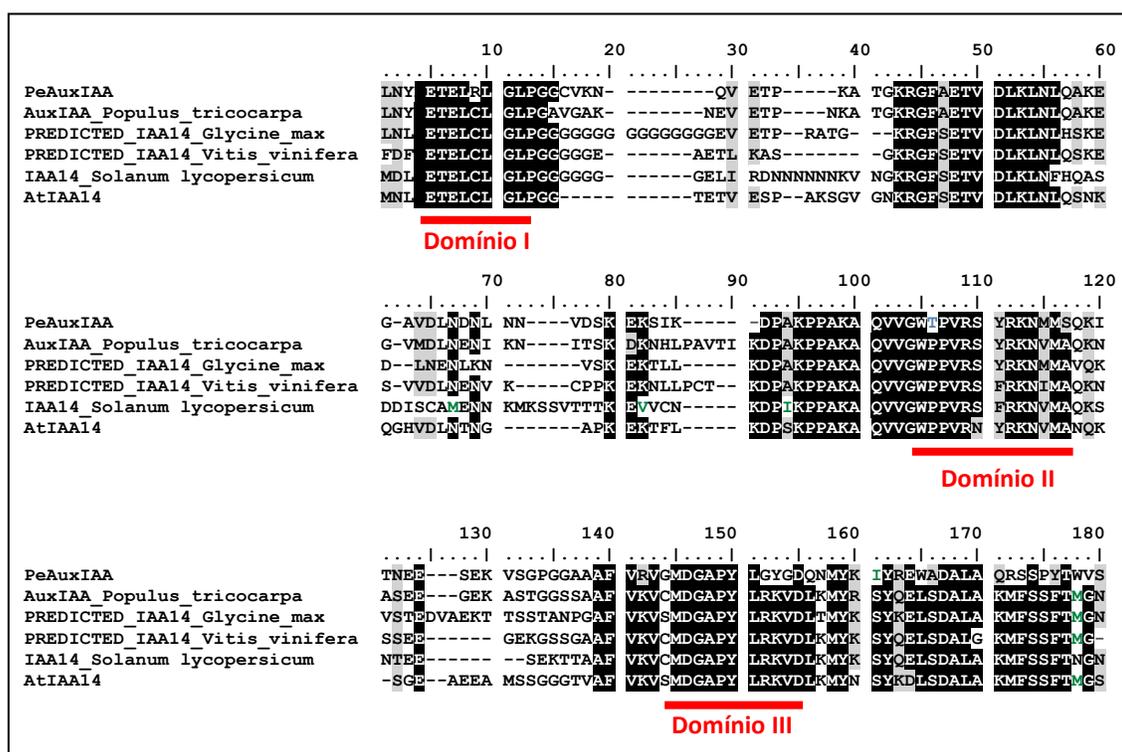


Figura 9 – Alinhamento das sequências de aminoácidos de ortólogos putativos de IAA14 de diferentes espécies vegetais, incluindo o possível ortólogo de *Passiflora edulis*. Resíduos idênticos são sombreados em preto e resíduos similares em cinza. As linhas em vermelho marcam domínios conservados da família Aux/IAA.

A Figura 10 mostra a árvore construída a partir do alinhamento de proteínas de *Passiflora* similares às proteínas YABBY de Arabidopsis. Esta família gênica possui apenas 6 membros em Arabidopsis e, embora a função do *YAB5* não seja conhecida, todos os outros compartilham funções relacionadas à polaridade adaxial e abaxial de órgãos laterais

(Bowman, 2000). Foram encontradas 3 seqüências no banco de dados PASSIOMA, com grande similaridade às seqüências codificadoras de proteínas YABBY. Duas delas PACEPS7008E11 e PACEPS7003E09 são oriundas de bibliotecas de *P. suberosa* e, portanto, a seqüência PACEPE3005G07 foi escolhida para uma caracterização adicional de seu padrão de expressão durante o desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos em *P. edulis*. Esta seqüência passou então a ser designada *PeYAB1*.

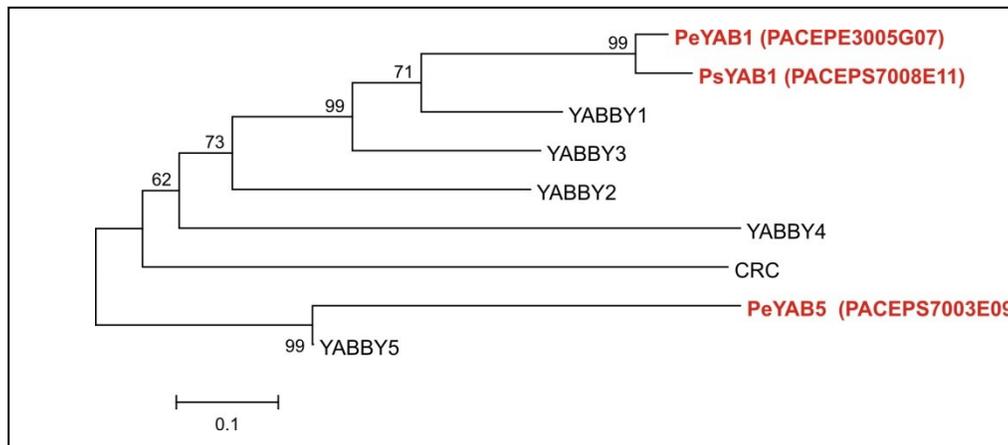


Figura 10. Árvore construída pelo método de Neighbor joining mostrando as relações de similaridade entre membros da família proteica YABBY de *Arabidopsis* e seus possíveis ortólogos em *Passiflora edulis* e *Passiflora suberosa*. Valores de Bootstrap para 1000 replicatas são indicados quando superiores a 50. Escala indica o número de substituições.

O alinhamento com proteínas da mesma família de outras espécies vegetais também foi construído para *PeYAB1* (Figura 11). As seqüências proteicas das outras espécies foram selecionadas da maneira descrita para o gene *PeAux/IAA* por meio do banco de dados do NCBI. Existem 2 domínios principais nas proteínas da família YAB: o domínio "zinc finger" e o domínio YAB (Toriba et al., 2007). A seqüência de *PeYAB1* não está completa no clone PACEPE3005G07. O domínio YAB, parte mais conservada das proteínas que compõe a família YABBY, pode ser observada na Figura 11. Entretanto, devido a baixa qualidade do sequenciamento nessa região do clone PACEPE3005G07, a região final desse domínio não está representada no alinhamento.

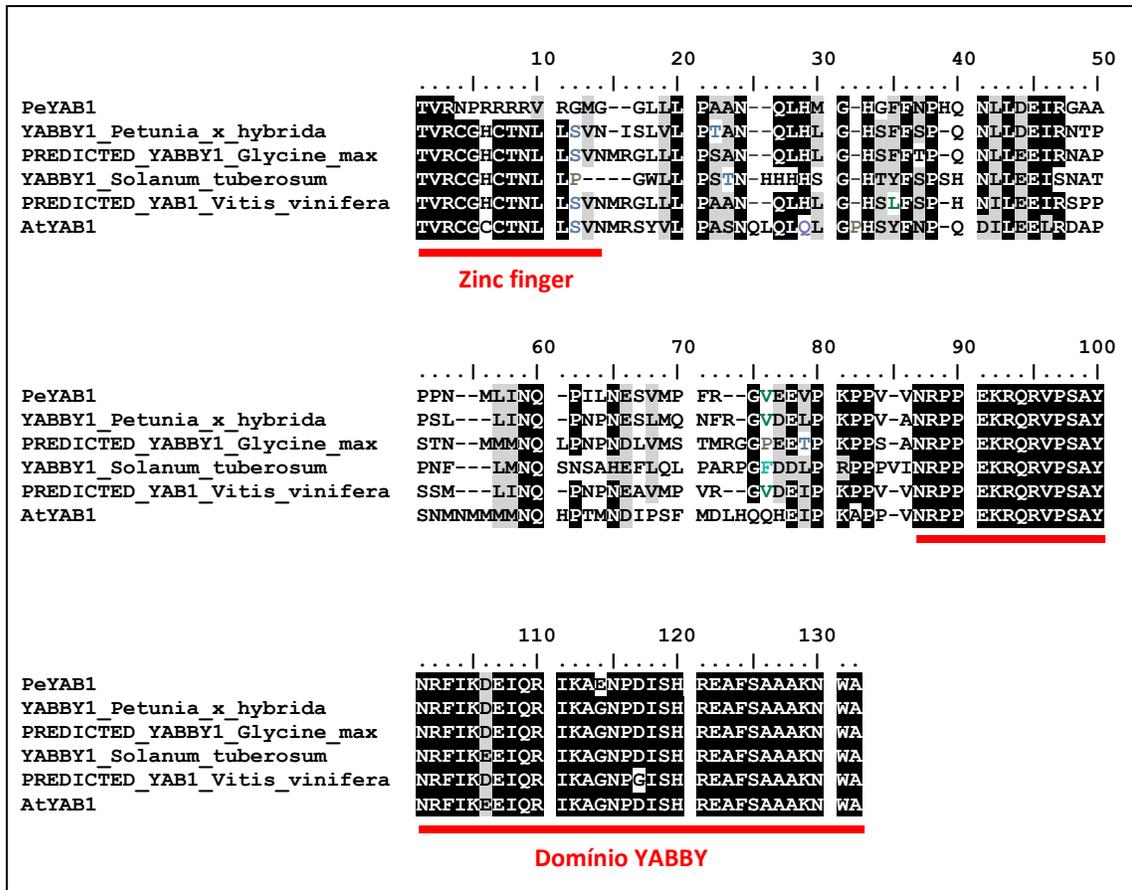


Figura 11 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos de ortólogos putativos de YAB1 de diferentes espécies vegetais, incluindo o possível hortólogo de *Passiflora edulis*. Resíduos idênticos são sombreados em preto e resíduos similares em cinza. As linhas em vermelho marcam domínios conservados da família YABBY.

A Figura 12 mostra a árvore construída a partir do alinhamento de proteínas de *Passiflora* similares às proteínas WOX de Arabidopsis. Esta família gênica possui apenas 15 membros (Deveaux et al., 2008). A partir da análise dessa árvore, identificou-se o clone PACEPE3027F05 como sendo o possível ortólogo de *P. edulis* do gene codificador da proteína WOX4 de Arabidopsis. Por essa razão, o clone PACEPE3027F05 foi renomeado neste trabalho como *PeWOX4*.

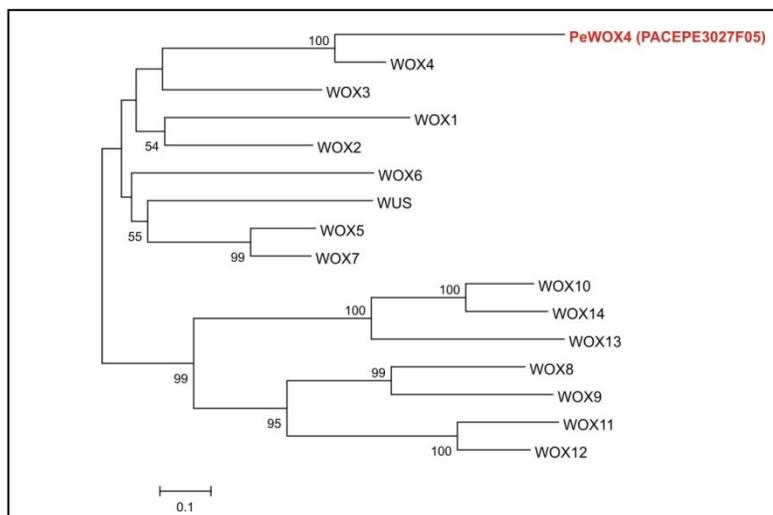


Figura 12. Árvore construída pelo método de Neighbor joining mostrando as relações de similaridade entre membros da família proteica WOX de *Arabidopsis* e seus possíveis ortólogos em *Passiflora edulis*. Valores de Bootstrap para 1000 replicatas são indicados quando superiores a 50. Escala indica o número de substituições.

A família proteica WOX também apresenta um domínio conservado comum a todas as proteínas dessa família. Ele é conhecido como domínio WOX, apresenta cerca de 60 aminoácidos altamente conservados entre todos os membros da família, mesmo quando diferentes espécies vegetais são comparadas (Graaff et al., 2009; Zhang et al., 2010). Na figura 13, é possível observar a proteína PeWOX4 alinhada a outras proteínas WOX4 de outras espécies. Apesar da sequência de *PeWOX4* estar aparentemente completa, a qualidade do sequenciamento do clone PACEPE3027F05 não permitiu que a porção final do gene pudesse ser traduzida. Dessa maneira, o alinhamento da Figura 13 mostra a proteína PeWOX4 apenas até a região do domínio WOX. Na porção C-terminal de todas as proteínas WOX é possível encontrar também o domínio conservado WUS (WUS-Box motif) que juntamente com o domínio WOX é responsável por agrupar todos os membros dessa família (Graaff et al., 2009).

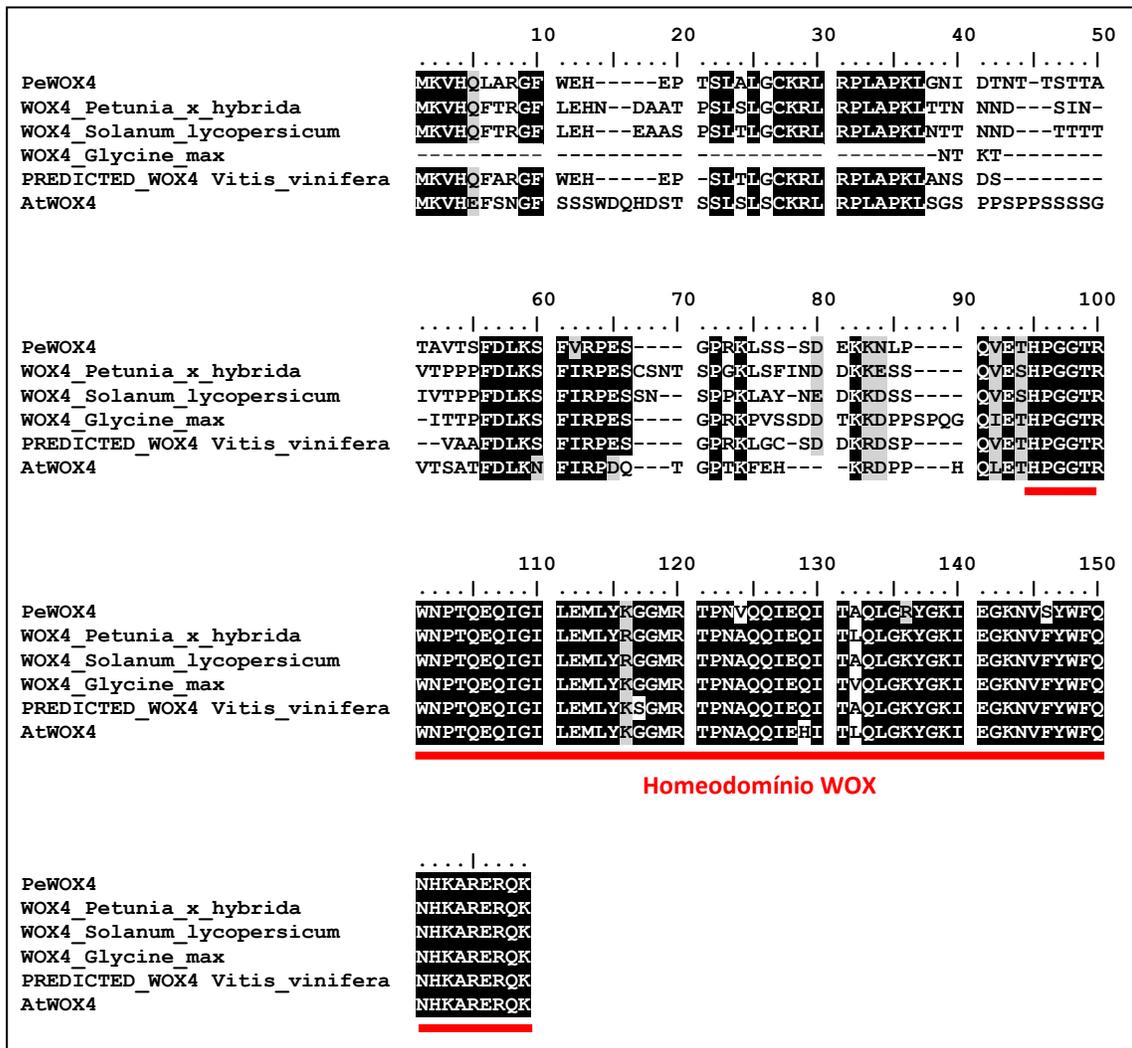


Figura 13 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos de ortólogos putativos de WOX4 de diferentes espécies vegetais, incluindo o possível ortólogo de *Passiflora edulis*. Resíduos idênticos são sombreados em preto e resíduos similares em cinza. As linhas em vermelho marcam domínios conservados da família WOX.

4.4. Análise de expressão dos genes *PeAux/IAA*; *PeYAB1* e *PeWOX4* durante o desenvolvimento embrionário zigótico e somático em *P. edulis*

4.4.1. Análises de RT-PCR e qPCR

As análises pela técnica de RT-PCR foram feitas com o objetivo de determinar se os genes analisados são expressos apenas nos tecidos escolhidos para o estudo ou se possuem expressão em tecidos produzidos em fases pós-embrionárias. A Figura 14 mostra a expressão de *PeAux/IAA*, *PeWOX4* e *PeYAB1* em diferentes tecidos pós-embrionários (raiz, caule, folha, meristema vegetativo jovem, meristema vegetativo maduro, meristema da inflorescência e botão floral) bem como nos tecidos utilizados para a análise do processo de embriogênese zigótica (Figura 14A) e somática (Figura 14B). O gene *PeACT1* foi utilizado como referência de normalização. As análises de RT-PCR indicam que os genes selecionados para as análises de expressão em *P. edulis* apresentam expressão diferencial ao longo das diferentes fases do desenvolvimento do embrião zigótico e somático. Entretanto, a taxa de expressão de *PeAux/IAA*, *PeWOX4* e *PeYAB1* é baixa nos tecidos de embriogênese zigótica e somática. Dessa maneira, o experimento de qPCR forneceu dados mais robustos com relação à quantificação dos transcritos presentes nos diferentes tecidos analisados.

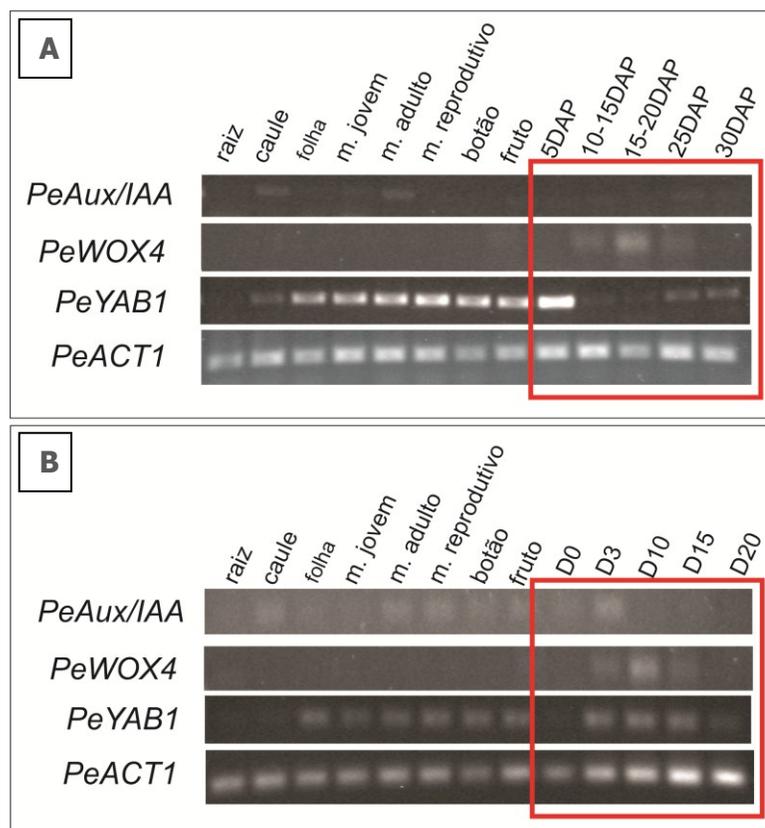


Figura 14 – Análise do padrão de expressão dos gene *PeAux/IAA*, *PeWOX4* e *PeYAB1* em diversos tecidos de *Passiflora edulis*. Em **A** a expressão nos diferentes tecidos é comparada com diferentes estágios de desenvolvimento da semente (indicados em dias após a polinização, 5 DAP a 30 DAP). Em **B**, os mesmos padrões são comparados com diferentes estágios da indução da embriogênese somática *in vitro* (indicados em dias em cultivo, D0 a D20). O padrão de expressão do gene *PeACT1* foi considerado como constitutivo e utilizado como normalizador. m. jovem = meristema jovem; m. adulto = meristema adulto; m. reprodutivo = meristema reprodutivo.

A Figura 15 mostra o padrão de expressão quantitativo dos genes *PeAux/IAA*, *PeWOX4* e *PeYAB1* analisados pelo método de qPCR. O estágio 65 DAP da embriogênese zigótica corresponde ao estágio D0 da embriogênese somática, uma vez que o embrião da semente madura de *P. edulis* foi utilizado como explante para os experimentos de embriogênese somática. A Figura 15A mostra a expressão de *PeAux/IAA* durante a embriogênese zigótica. No início do desenvolvimento a expressão foi basal, e tendeu a aumentar com passagem do embrião para fases mais avançadas do desenvolvimento. Do primeiro ponto analisado (5 DAP) até o embrião em fase de torpedão (30 DAP) a expressão gênica de *PeAux/IAA* aumentou 5 vezes. Ao final do processo de amadurecimento do embrião e da semente (65 DAP), a expressão do mesmo gene triplicou ao ser comparada

com o estágio anterior (30 DAP). Dessa maneira, a expressão de *PeAux/IAA* aumentou cerca de 15 vezes do início do desenvolvimento do embrião zigótico até o seu amadurecimento.

O gene *PeWOX4* (Figura 15B) seguiu o mesmo perfil crescente de expressão durante a embriogênese zigótica, encontrado para *PeAux/IAA*: do primeiro estágio (5 DAP) até o último estágio analisado (65 DAP) a expressão de *PeWOX4* aumentou 80 vezes. Na passagem do estágio 10-15 DAP para 15-20 DAP ocorreu o maior aumento relativo do número de transcritos, quando *PeWOX4* teve sua expressão aumentada 5 vezes. Na transição dos demais estágios, a expressão do gene dobrou a cada análise até os 30 DAP, evidenciando um aumento rápido na ativação desse gene nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário. Durante a fase de amadurecimento da semente (dos 30 até os 65 DAP) a expressão também foi aumentada, entretanto com uma taxa de crescimento menor, duplicando seus valores quando comparada com a expressão dos 30 DAP.

A expressão de *PeYAB1* no estágio inicial do desenvolvimento do embrião zigótico (Figura 15C, 5 DAP) foi 700 vezes maior quando comparada com o estágio subsequente (10-15 DAP). Após essa queda acentuada na transição do primeiro estágio para o segundo, o aumento da expressão de *PeYAB1* foi gradativo. Entre as amostras de 15-20 DAP e 25 DAP a expressão desse gene aumentou 25 vezes e depois três vezes até os 30 DAP. Durante o amadurecimento do embrião e da semente a expressão aumentou 2,5 vezes. Nesse último estágio, a expressão de *PeYAB1* foi 400 vezes maior do que a expressão mínima encontrada em 10-15DAP.

A análise quantitativa da expressão gênica dos genes alvo também foi realizada durante a embriogênese somática. *PeAux/IAA* (Figura 15D) apresentou expressão elevada em D0, reduzindo o número de transcritos pela metade no estágio D3. A expressão foi

reduzida 200 vezes com a passagem para o estágio D10. A produção de transcritos de *PeAux/IAA* duplicou na fase subsequente (D15), e se manteve estável em D20.

Para o gene *PeWOX4*, a maior concentração de transcritos foi encontrada nos dois primeiros estágios (D0 e D3), e em D10, a concentração de transcritos foi reduzida 8 vezes (Figura 15E). Uma taxa de redução similar (10 vezes) aconteceu com a passagem de D10 para D15, mantendo-se semelhante 20 dias após a indução da embriogênese (D20).

A expressão de *PeYAB1* é ilustrada também durante a embriogênese somática (Figura 15F). Os valores encontrados nos dois primeiros estágios do desenvolvimento (D0 e D3) se mantiveram inalterados e apresentam valores bem maiores dos detectados nas outras fases analisadas. A expressão de *PeYAB1* diminuiu 6,5 vezes em D10, se manteve inalterada em D15, diminuindo novamente 20 dias após a indução da embriogênese somática (D20).

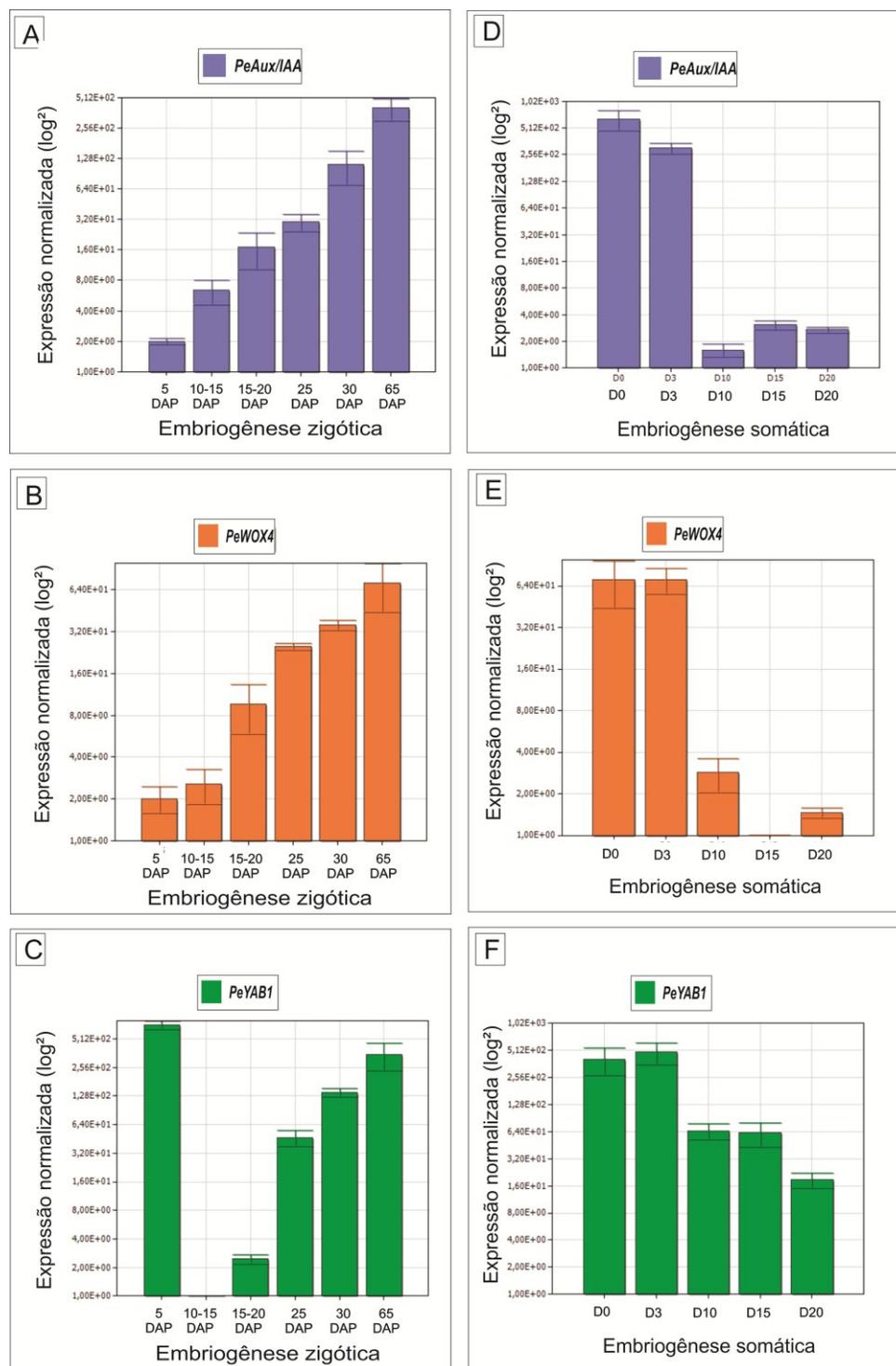


Figura 15 – Análise do padrão de expressão dos genes *PeAux/IAA*, (**A** e **D**), *PeWOX4* (**B** e **E**) e *PeYAB1* (**C** e **F**) em *Passiflora edulis* por RT-PCR em tempo real em diferentes estágios da embriogênese zigótica (**A-C**, estágios expressos em dias após a polinização, DAP) e somática (**D-F**, estágios indicados em dias de cultivo, de D0 a D20). Os estágio 65 DAP, da embriogênese zigótica (embrião maduro) e D0, da embriogênese somática (explante) são equivalentes. Os valores do eixo Y representam a expressão normalizada dos genes em relação ao gene *PeACT1*.

4.4.2. Hibridização *in situ*

O padrão espacial da expressão dos genes *PeAux/IAA*, *PeWOX4* e *PeYAB1* foi analisada durante a embriogênese zigótica e somática por meio da técnica de hibridização *in situ*. Na Figura 16A pode-se observar a expressão de *PeAux/IAA* no tecido embrionário zigótico aos 15 DAP. O sinal da hibridização foi fraco mas a distribuição foi consistente em todo o embrião globular de *P. edulis*. Posteriormente, aos 27 DAP (Figura 16B), o embrião na fase de torpedo apresentou um sinal forte concentrado nos tecidos procâmbio. Nas Figuras 16C e 16D pode-se observar o embrião somático em estágio globular apresentando expressão de *PeAux/IAA*, similar à observada no embrião zigótico globular (Figura 16A). Um fraco sinal da sonda de *PeAux/IAA* foi observado também nos tecidos de calo, sugerindo que a expressão de *PeAux/IAA* não é restrita apenas a tecidos embriogênicos (Figuras 16E e 16F).

A Figura 17 mostra a expressão do gene *PeWOX4* em alguns estágios do desenvolvimento embrionário zigótico (aos 15 DAP e aos 27 DAP) e somático (aos 20D) de *P. edulis*. O embrião zigótico globular apresentou uma distribuição uniforme do sinal de hibridização (Figura 17A). No embrião zigótico em estágio de torpedo, observou-se a expressão de *PeWOX4* em todo o embrião, com um sinal de hibridização mais pronunciado nos cotilédones (Figura 17B). O aumento da expressão de *PeWOX4* ao longo da embriogênese zigótica pode ser confirmado por meio dos dados resultantes de qPCR. Durante a embriogênese somática, embriões globulares também apresentaram a expressão de *PeWOX4*, mas com menor intensidade do sinal de hibridização (Figura 17C) quando comparado com o embrião zigótico em estágio semelhante. As Figuras 17 D-F mostram sinal de hibridização da sonda para *PeWOX4* em tecidos de calo, provavelmente relacionados à formação de tecidos pró-vasculares, comuns à regiões embriogênicas e não embriogênicas.

A expressão do gene *PeYAB1* é mostrada na Figura 18. Como já mostrado pelos dados de qPCR, acontece um aumento da expressão de *PeYAB1* ao longo do desenvolvimento zigótico de *P. edulis* a partir de 15DAP. O sinal de hibridização de *PeYAB1* é baixo em embriões zigóticos aos 15DAP, mas foi visível na periferia do embrião globular aos 20 DAP (Figura 18C). Em embriões na fase de torpedo aos 27DAP (Figura 18D), o sinal de hibridização concentrou-se na região distal dos cotilédones. O sinal de hibridização também foi observado em tecidos somáticos maternos, como o arilo aos 15DAP (Figura 18E). Entretanto essa expressão no arilo não foi mais observada aos 20 e 27 DAP (Figuras 18B e 18F, respectivamente), sugerindo que a expressão de *PeYAB1* é reprimida após o arilo atingir um determinado estágio de desenvolvimento. Tais resultados poderiam explicar a expressão aumentada de *PeYAB1* no início do desenvolvimento embrionário (dados qPCR).

A Figura 19 mostra a expressão do gene *PeYAB1* em três diferentes estágios do desenvolvimento do embrião somático. A Figura 19A mostra a expressão de *PeYAB1* em cotilédones do embrião zigótico utilizados como explante para a indução de embriões somáticos em D3. Observou-se expressão diferencial de *PeYAB1* no cotilédone que não entrou em contato com o meio de cultura. No cotilédone que entrou em contato com o meio, foram observados algumas células que apresentaram o sinal da sonda na epiderme abaxial. Aos 10 dias após a indução da embriogênese (Figura 19B), observaram-se regiões meristemáticas formadas a partir do explante que não apresentaram a expressão de *PeYAB1*. Contornando tais regiões, a expressão de *PeYAB1* foi observada nas células dos cotilédones e em tecidos de calo indiferenciados. Aos 20 dias após a indução (Figura 19C), a expressão desse gene foi observada em algumas células dos calos mas não nas regiões meristemáticas oriundas dos mesmos. Algumas células da periferia das regiões meristemáticas apresentaram células com expressão de *PeYAB1*. No detalhe (Figura 19D), é possível observar a expressão de *PeYAB1* em um embrião somático que está sendo formado a partir do tecido

meristemático. Estes pontos de expressão localizada encontraram-se preferencialmente nas regiões mais distais dos embriões somáticos, aparentemente em tecidos protodérmicos, de forma similar à observada no embrião globular zigótico. Tais observações estão em concordância com a diminuição do padrão de expressão do gene *PeYAB1* mostrada nos resultados de qPCR para amostras de embriogênese somática em *P. edulis*.

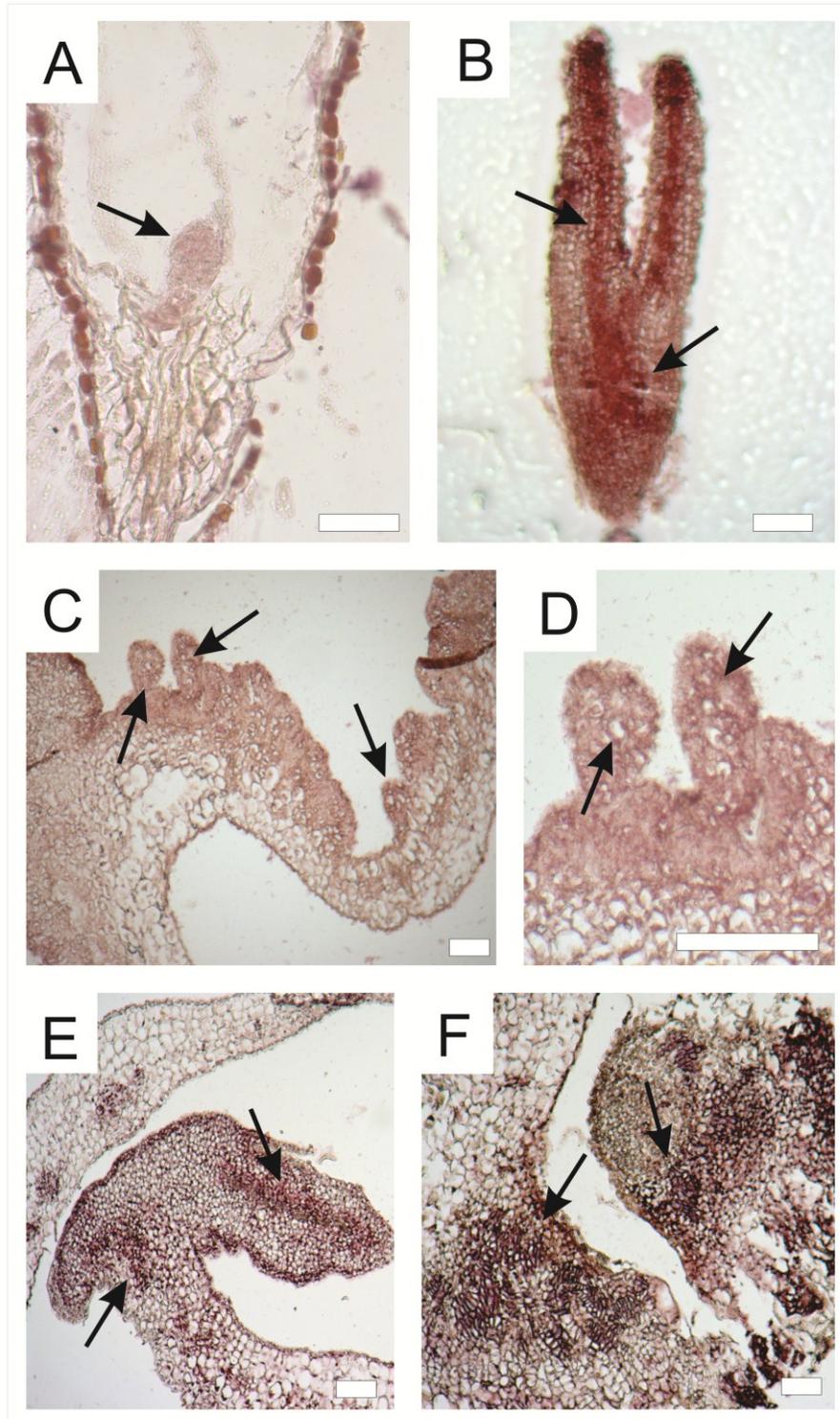


Figura 16 –Padrão espacial de expressão do gene *PeAux/IAA* por hibridização *in situ* em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário zigótico (**A-B**) e somático (**C-F**) em *Passiflora edulis*. Embrião zigótico no estágio globular aos 15DAP (**A**) e de torpedo aos 27 DAP (**B**). Região de calos embriogênicos (**C**) e detalhe do embrião somático em estágio globular aos 20 dias após a indução da embriogênese (**D**). Algumas regiões não embriogênicas do calo também apresentam expressão de *PeAux/IAA* (**E, F**). Setas indicam locais de expressão. Barras = 100 μ m.

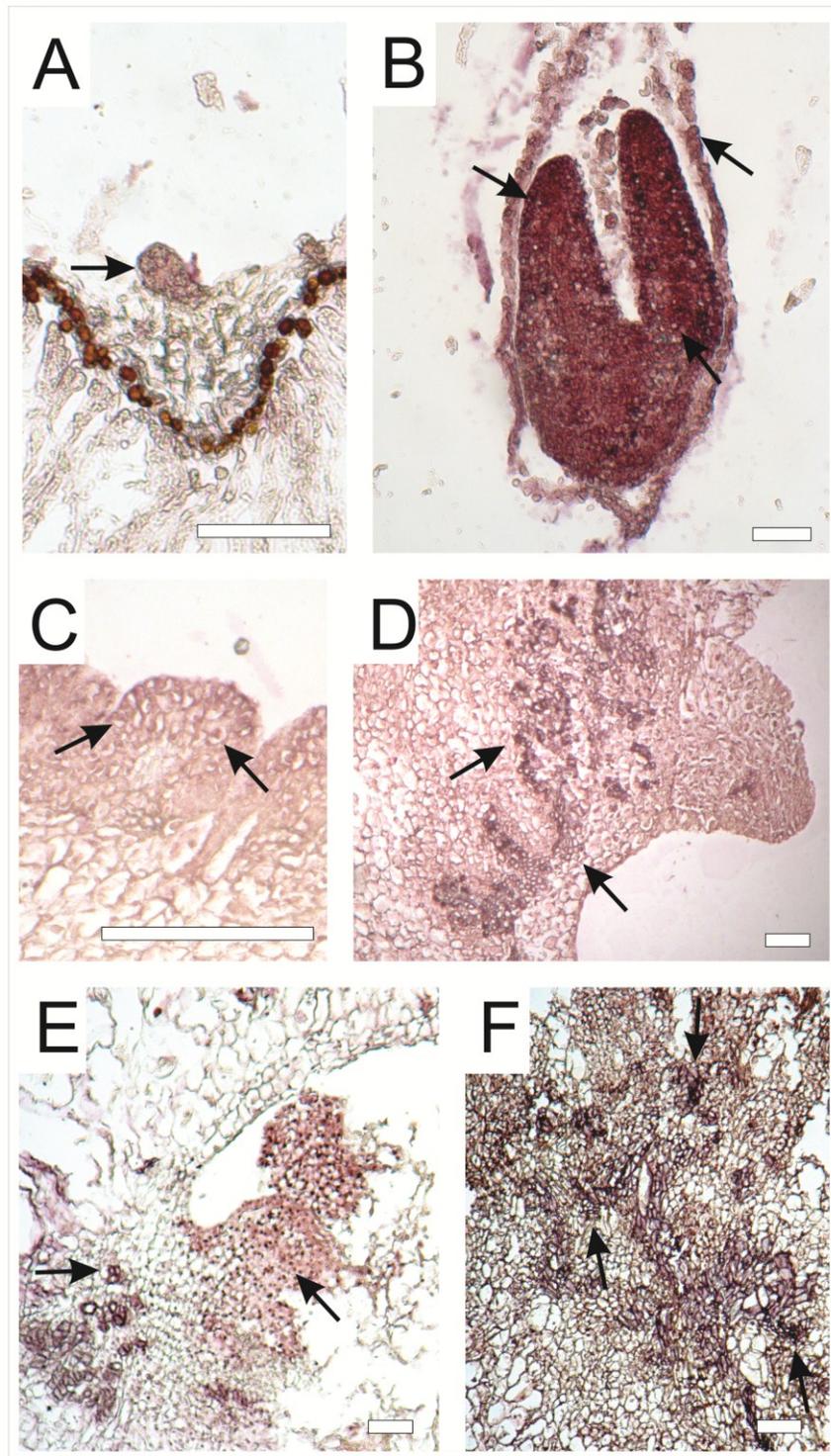


Figura 17 – Padrão espacial de expressão do gene *PeWOX4* por hibridização *in situ* em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário zigótico (**A-B**) e somático (**C-F**) em *Passiflora edulis*. Embrião zigótico no estágio globular aos 15DAP (**A**) e de torpedo aos 27DAP (**B**). Detalhe do embrião somático em estágio globular aos 20 dias após a indução da embriogênese (**C**). Algumas regiões não embriogênicas do calo também apresentam expressão de *PeWOX4* (**D-F**). Setas indicam locais de expressão. Barras = 100 μ m.

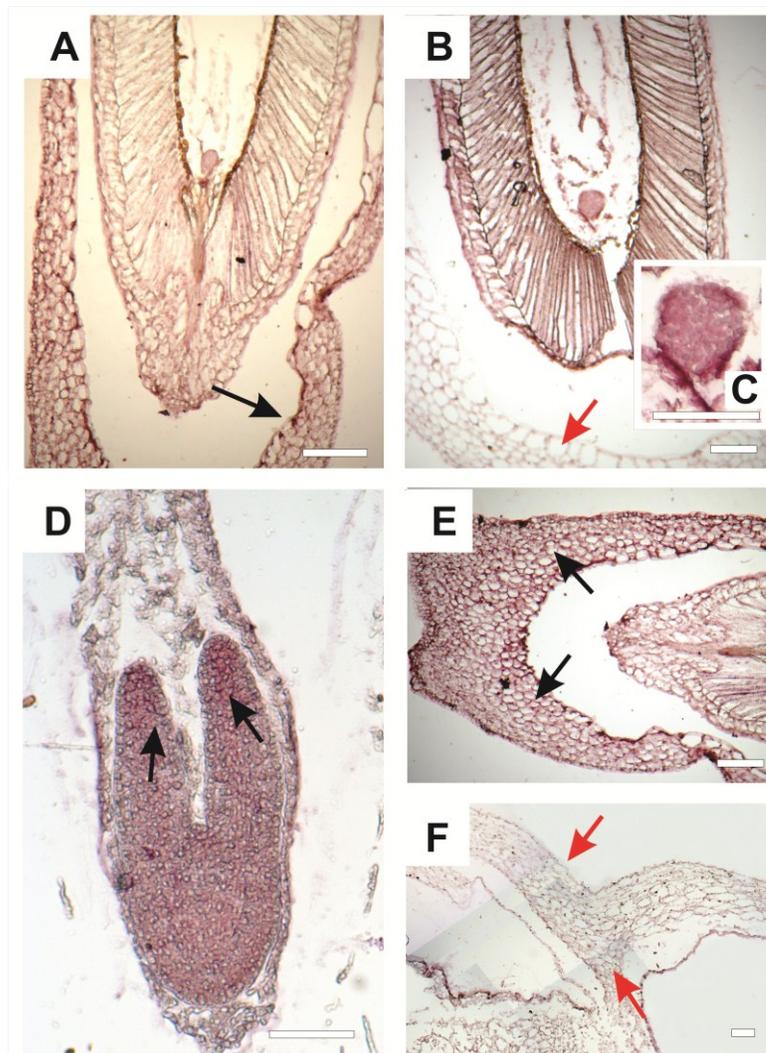


Figura 18 – Padrão espacial de expressão do gene *PeYAB1* por hibridização *in situ* em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário zigótico (**A-F**) em *Passiflora edulis*. Embrião zigótico no estágio globular aos 15DAP (**A**) e aos 20DAP (**B**). O embrião mostrado em **B** foi ampliado na figura **C**. Embrião em fase de torpedo aos 27DAP (**D**). Detalhe do arilo aos 15DAP (**E**) e aos 27DAP (**F**). Setas pretas indicam locais de expressão. E setas vermelhas indicam o arilo aos 27 DAP, onde não se detectou sinal de expressão para *PeYAB1*. Barras = 100µm.

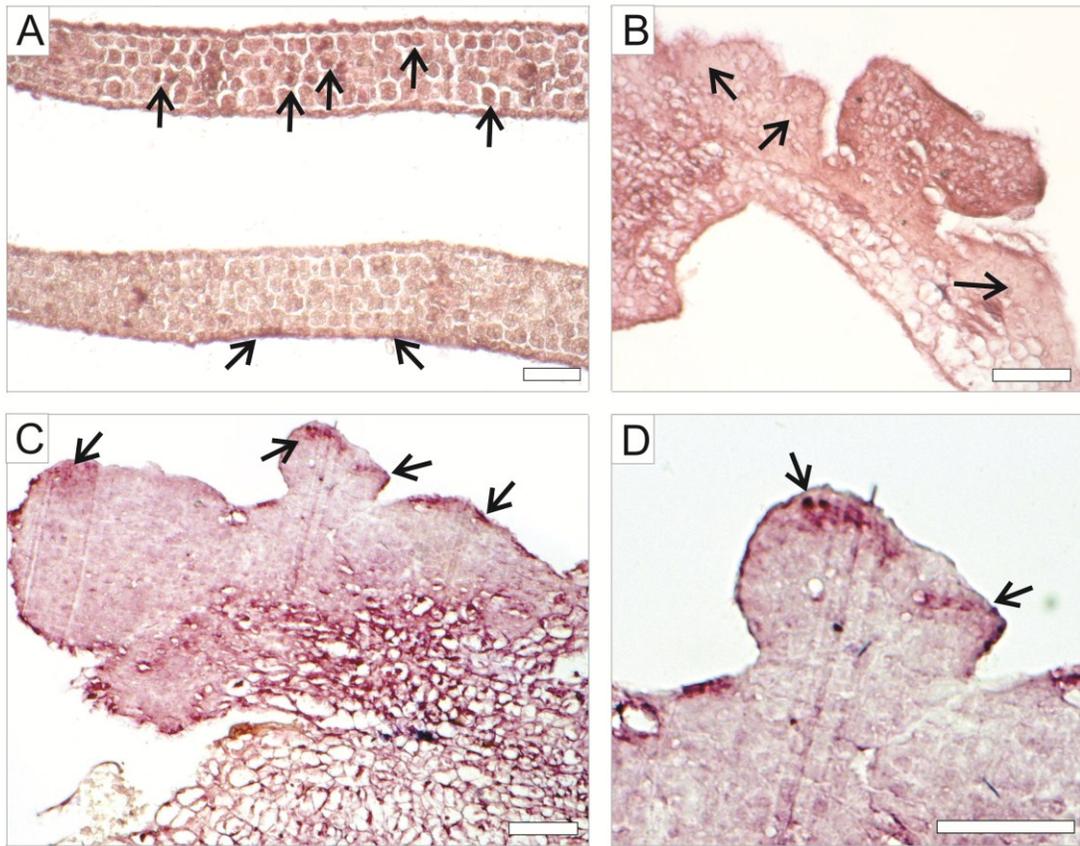


Figura 19 - Hibridização *in situ* do gene *PeYAB* durante o desenvolvimento embrionário zigótico de *Passiflora edulis*. **(A)** Cotilédone de embrião somático de *P. edulis* (explante) após 3 dias de indução de embriogênese somática. Setas indicam núcleos de células marcadas pelo sinal da hibridização *in situ*. **(B)** Explante após 10 dias de indução. Regiões meristemáticas começam a ser formadas ao mesmo tempo em que a expressão de *PeYAB* é desligada nessas células. Setas indicam regiões sem a expressão de *PeYAB*. **(C)** Explante após 20 dias em meio de indução de embriogênese somática. Sinal de *PeYAB* continua desligado em regiões meristemáticas, mas começam a ser ativados em porções da protoderme e camadas subepidérmicas. **(D)** Detalhe da figura C: embrião zigótico apresentando expressão na região abaxial do local em que vai se desenvolver o cotilédone. Barras = 50 μ m.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento embrionário zigótico em *P. edulis* é relativamente mais demorado quando comparado com a planta modelo *Arabidopsis*. O ciclo de vida de *Arabidopsis* é considerado curto, um dos motivos que levaram a escolha dessa planta como modelo para estudos do desenvolvimento vegetal. Em *Arabidopsis*, todo o processo de germinação, crescimento, florescimento, produção de frutos/sementes e senescência acontece em um tempo médio de 60 dias (Boyes et al., 2001; Poole, 2007). Durante esse período, a embriogênese zigótica é completada em aproximadamente 10 dias a partir da antese: em 4 dias o embrião está em estágio de coração e em 6 dias o de torpedo. Após o período de estabelecimento da polaridade do embrião e crescimento dos cotilédones, acontece o amadurecimento da semente que dura de 6-8 dias. Nessa última etapa o embrião perde água, se torna resistente ao dessecamento e entra em dormência (Keith et al., 1994).

Em *P. edulis*, a primeira divisão do zigoto só acontece 11 DAP, e o embrião em estágio de torpedo pode ser observado apenas por volta dos 27 DAP. O amadurecimento do embrião juntamente com a lignificação da semente leva mais de dois meses para acontecer, período que supera o tempo total do ciclo de vida de *Arabidopsis*. Entretanto, embora comparativamente o tempo de desenvolvimento dos embriões seja distinto entre *Arabidopsis* e *P. edulis*, os estágios de desenvolvimento dos mesmos são similares. Em *P. edulis* a fecundação acontece entre os 10 primeiros dias após o evento de polinização. Após o início da divisão do zigoto, todas as fases de desenvolvimento embrionárias encontradas em *Arabidopsis* podem ser identificadas também em *P. edulis*: a primeira divisão do zigoto é assimétrica, resultando em uma célula apical menor e com conteúdo celular mais denso, e uma célula basal maior, com volume vacuolar evidente. Essa divisão é bastante similar à primeira divisão do zigoto em *Arabidopsis*. Na planta modelo, o zigoto se alonga e, após a divisão, há a formação de uma célula apical que dará origem ao embrião propriamente dito e

a uma célula basal, que sofrerá divisões periclinais formando o suspensor do embrião (Zhang e Laux, 2011).

Esse padrão assimétrico de divisão é constantemente observado em outras espécies vegetais, incluindo clados filogeneticamente mais distantes de *Arabidopsis*, como é o caso de gramíneas, por exemplo (Nakajima et al., 2010). Entretanto, a primeira divisão do zigoto não corresponde ao estabelecimento de polaridade no processo de embriogênese. Na verdade, a polaridade já pode ser identificada no zigoto, quando o seu núcleo se localiza na região apical e um grande vacúolo está presente na região basal da célula, antes da primeira divisão (Ueda e Laux, 2012). Após a primeira divisão, não apenas duas células com diferentes diâmetros e conteúdo celular são produzidas, como elas também apresentam perfis de transcrição distintos. Em *Arabidopsis*, o início da expressão de *WOX2* e *WOX8* já determina diferentes destinos celulares para as células apical e basal do embrião, respectivamente. Os perfis citológicos e moleculares dessas duas primeiras células resultantes da primeira divisão do zigoto caracterizam passos fundamentais na formação do eixo embrionário (Haecker et al., 2004; Jenik et al., 2007; Ueda e Laux, 2012).

Em *P. edulis* o suspensor é composto por várias camadas de células resultantes de divisões periclinais e transversais da célula basal do zigoto, formando uma estrutura diferente da encontrada no suspensor de *Arabidopsis*, que apresenta uma única coluna de células resultante apenas de divisões periclinais da célula basal (Kawashima e Goldberg, 2010). O suspensor é uma estrutura extremamente plástica, podendo variar em número, tamanho e formato de células, de acordo com a posição taxinômica da planta em questão (Meinke, 1991; Kawashima e Goldberg, 2010). Os suspensores presentes em leguminosas, por exemplo, apresentam formas bastante distintas, havendo inclusive um suspensor sincicial, onde ocorrem divisões nucleares, mas não há citocinese (Meinke, 1991). Embora o suspensor de *P. edulis* apresente divisões celulares que obedecem a um padrão complexo, é possível

identificar que o mesmo assume uma forma bastante definida, indicando um fino controle genético ativo nessa estrutura e, provavelmente, conservado evolutivamente.

As fases subsequentes da embriogênese identificadas em *Arabidopsis* também podem ser visualizadas em *P. edulis*. Os embriões nos estágios globular inicial, globular tardio, coração e torpedo foram identificados ao longo do estudo da embriogênese zigótica em maracujá. Como os estágios de desenvolvimento embrionário de *P. edulis* são similares aos estágios de desenvolvimento embrionário em *Arabidopsis*, é possível que os mecanismos moleculares descritos na espécie modelo sejam mantidos e conservados ao longo da embriogênese zigótica em *P. edulis*. Em *Arabidopsis*, no período de transição do estágio globular para o estágio de coração inicial, os fatores de transcrição responsáveis pela formação do corpo básico do embrião: *WUS*, *STM*, *CUC* já estão ativos e determinam o terço superior do embrião, da mesma maneira que os genes *PLT*, *SRC* e *SHR* determinam a identidade da porção basal do embrião propriamente dito (Jenik et al., 2007; Ueda e Laux, 2012). Nessa etapa o transporte polar de auxina já foi estabelecido, bem como o posicionamento diferencial dos diferentes tipos de proteínas PIN (Friml, 2003; Friml et al., 2003).

Uma diferença fundamental observada nos estágios finais do desenvolvimento embrionário zigótico entre *P. edulis* e *Arabidopsis* é relacionada ao posicionamento final do embrião dentro da semente. Quando atinge o estágio de torpedo, o embrião de *Arabidopsis* apresenta uma curvatura dos cotilédones sobre o eixo hipocótilo-radícula. Nessa fase o embrião é chamado de "embrião em estágio de *bent cotyledons*" [cotilédones dobrados, em tradução literal (Raz et al., 2001)]. Em *P. edulis* o crescimento das camadas externas da semente (testa e tégmen) acontecem de forma mais acelerada e, até certo ponto, de forma independente do desenvolvimento do embrião propriamente dito. Dessa maneira, quando o embrião atinge o estágio de torpedo em *P. edulis*, este ocupa apenas uma pequena

porcentagem do espaço interno da semente. Assim, ao longo do período de amadurecimento do embrião, os cotilédones não encontram nenhuma barreira física para o seu crescimento, o que culmina com a formação de um embrião estendido, sem que os cotilédones se dobrem sobre o eixo hipocótilo-radícula.

Dessa maneira, o processo de lignificação da semente em *P. edulis*, que começa a acontecer por volta dos 15-17 DAP, é ativado depois que a semente já atingiu o estágio máximo de crescimento. Foi possível observar que a proliferação (divisão) celular decorrente dos tecidos do tégmen e testa é intensa principalmente entre os 10 e 15 DAP em *P. edulis*. Entretanto, após esse período, o tamanho da semente pouco se altera e o arilo que a envolve começa a se desenvolver rapidamente.

Uma vez determinada a caracterização anatômica da embriogênese zigótica em *P. edulis* é possível estabelecer uma comparação com a embriogênese somática induzida na mesma espécie. Vinte dias após a indução da embriogênese somática foi possível identificar a formação de embriões somáticos em estágio globular, formados a partir de um calo embriogênico, cuja proliferação pode ser observada desde os 10 dias após a indução da embriogênese. Embora o estudo de estágios avançados da embriogênese somática não tenha sido abordado neste trabalho, a análise da embriogênese somática até o estágio globular é por si só suficiente para determinar similaridades entre os processos de embriogênese somática e zigótica. Isto deve-se ao fato de que os destinos celulares do embrião são determinados precocemente durante a embriogênese. Em *Arabidopsis* a expressão de genes que determinam destinos celulares presentes em embriões em estágio de torpedo, por exemplo, são expressos desde o início do embrião globular, indicando que o controle molecular acontece anteriormente à formação da estrutura *per se* (revisado por Jenik et al., 2007; Ueda e Laux, 2012).

Em *P. edulis* a estrutura anatômica observada no embrião globular somático e zigótico é bastante similar, e, com exceção do suspensor que não foi observado na embriogênese somática, o formato, tamanho. na fase globular são características compartilhadas pelos embriões somáticos e zigóticos.

A principal diferença entre os embriões zigóticos e somáticos em *P. edulis* é a mesma compartilhada pelos mesmos processos embriogênicos em outras espécies vegetais: a origem do embrião. A formação do embrião somático a partir de uma célula do corpo da planta adulta ou a partir de um tecido já diferenciado envolve a reprogramação molecular da célula mãe em questão. Como já foi descrito anteriormente, alguns genes desempenham papel importante nesse processo, como é o caso dos genes *SERK* e *LEC1*, por exemplo (Braybrook e Harada, 2008; Nolan et al., 2009). No processo de embriogênese somática em *P. edulis* as mesmas modificações moleculares são induzidas nas células que precedem a formação dos embriões. Durante a indução da embriogênese somática, o gene *PeSERK* (o provável ortólogo de *P. edulis* do gene *SERK* de *Arabidopsis*), que já foi identificado em *P. edulis*, apresenta expressão nas células de calos embriogênicos que darão origem aos embriões somáticos *in vitro* (Pinto et al., em preparação). Tal padrão de expressão provavelmente está relacionado com a reorganização do programa molecular ativo nas células precursoras do embrião somático, e, assumindo que a função do gene *PeSERK* é conservada em *P. edulis*, a expressão desse gene nas células do saco embrionário provavelmente também é essencial para o início da embriogênese zigótica nessa espécie.

Embora a comparação da embriogênese somática e zigótica por técnicas anatômicas seja essencial para o entendimento do desenvolvimento dos dois processos, o estudo do padrão de expressão de genes ativados durante a embriogênese é fundamental para um estudo comparativo entre os dois tipos de embriogênese.

O transporte polar de auxinas é de extrema importância durante os mais diversos processos do desenvolvimento vegetal, incluindo a formação da folha (Bilsborough et al., 2011), desenvolvimento do fruto (Seymour et al., 2008), formação e determinação da raiz (Overvoorde et al., 2010) e embriogênese (Hamann et al., 2002). Como já exposto anteriormente na introdução deste trabalho, a família gênica *Aux/IAA* é responsável pela inibição dos fatores responsivos a auxina (ARF) em *Arabidopsis*. A auxina estimula diretamente a interação entre complexos do sistema SCF^{TIR1} e proteínas da família *Aux/IAA*, resultando na degradação destas (Chapman e Estelle, 2009). Dessa maneira, proteínas ARF são liberadas da inibição e podem regular a expressão de genes responsivos à auxina. Uma maneira de modular as interações entre as proteínas ARF e *Aux/IAA* é regular a transcrição de genes da família *ARF* e *Aux/IAA*. Weijers et al. (2005) mostraram que a regulação transcricional de genes *ARF* e *Aux/IAA* contribuiu para especificar a resposta da planta à auxina durante diferentes fases do desenvolvimento.

Embora o padrão de expressão de *BDL*, um dos genes pertencentes a família *Aux/IAA*, tenha sido descrito durante a formação do embrião zigótico em *Arabidopsis* (Hamann et al., 2002), nenhum homólogo putativo desse gene foi encontrado no banco de ESTs disponível para *P. edulis*. Entretanto, ao analisar os genes *AXR3/IAA17*, *IAA14*, *IAA7* e *IAA16* de *Arabidopsis* com a ferramenta "Arabidopsis eFP Browser" no site www.bar.utoronto.ca, observamos que a expressão destes genes que se encontram próximos a *PeAux/IAA* no cladograma apresentado na Figura 8 (Item 4.3. da seção de Resultados), apresentam uma grande diversificação de padrões de expressão em diferentes tecidos. Isto parece indicar que *PeAux/IAA* pode estar envolvido na via de sinalização de auxinas em diferentes tecidos ao longo do desenvolvimento, inclusive no embrião. Esta suposição é suportada pela observação da expressão (ainda que pouco intensa) de *PeAux/IAA* em tecidos não-embriogênicos como indicaram os resultados de RT-PCR semi-quantitativa.

A expressão do gene *PeAux/IAA* durante a embriogênese zigótica é bastante similar ao descrito para o gene *BDL* de *Arabidopsis*: a expressão é menor no início da embriogênese e seus transcritos podem ser observados em toda a extensão do embrião propriamente dito (Hamann et al., 2002). Com a passagem do embrião do estágio globular para o estágio de coração e, posteriormente, para o estágio de torpedo, a expressão de *BDL* em *Arabidopsis* se restringe à região pró-vascular (Hamann et al., 2002). De forma concordante, o transporte polar de auxina é essencial na formação de tecido pró-vascular, ativando genes envolvidos na diferenciação de xilema e floema (Ohashi-Ito e Fukuda, 2010; Jansen et al., 2012).

Os resultados de qPCR também apontam para o aumento da expressão de *PeAux/IAA* durante o desenvolvimento do embrião zigótico, sugerindo também sua atuação de maneira importante no processo do desenvolvimento embrionário zigótico de *P. edulis*. Durante a embriogênese somática, o número de transcritos de *PeAux/IAA* pareceu diminuir até D10, provavelmente devido aos processos de reprogramação do estado de diferenciação das células do explante. Entretanto, durante a formação do calo que deu origem aos embriões somáticos, foi possível identificar por hibridização *in situ*, a expressão de *PeAux/IAA* também em tecidos de calos não embriogênicos. Uma vez que os explantes estão em contato com um meio que disponibiliza auxina (2,4D) ao sistema estabelecido, é esperado que o transporte desse hormônio aconteça através dos tecidos do explante (cotilédone). Gordon et al. (2007) descreveram a formação *de novo* de meristemas apicais caulinares em um sistema *in vitro*. Estes autores descreveram a ocorrência de uma reorganização do padrão de expressão de genes relacionados ao transporte polar de auxina (como o que codifica PIN1) para que um novo meristema caulinar fosse formado a partir de tecidos de raiz, indicando a participação potencial do sistema de sinalização Aux/IAA/ARF em eventos de diferenciação *de novo*. Além disso, durante a embriogênese somática em *Arabidopsis* a ocorrência de *maxima* de auxina é evidenciada nas regiões centrais do calo, próximas a regiões de tecido pró-vascular, e

posteriormente, após retirada do explante do meio rico em auxina, essa *maxima* se localizam nas regiões periféricas dos calos embriogênicos (Su et al., 2009). Dessa maneira, é esperado também que em *P. edulis* aconteça um transporte diferencial de auxinas ao longo do tecido do explante, que pode ser evidenciado pelo padrão de expressão do gene *PeAux/IAA*.

Outro gene analisado ao longo da embriogênese somática e zigótica de *P. edulis* foi o gene *PeWOX4*. Recentemente, a expressão do gene *WOX4* em *Arabidopsis* e de seu ortólogo potencial em *Solanum lycopersicum* (tomate) foi detectada em tecidos procambiais (Ji et al., 2010). A função sugerida para os ortólogos de *WOX4* é a determinação e delimitação das regiões procambiais, estando o controle de sua expressão sob a influência do fluxo polar de auxina, uma vez que, como comentado acima, este hormônio está intimamente ligado com a formação do sistema pró-vascular (Ohashi-Ito e Fukuda, 2010; Suer et al., 2011). Embora a expressão de *WOX4* não tenha sido descrita para o desenvolvimento embrionário em *Arabidopsis*, Chandler et al. (2008) descrevem a expressão desse gene em tecidos pró-vasculares de milho.

Em *P. edulis*, a expressão de *PeWOX4* ocupa grande parte extensão do embrião zigótico na fase globular. Durante o estágio de torpedo, a expressão é mais ampla, ocorrendo por todo o corpo do embrião. O aumento da produção de transcritos de *PeWOX4* no embrião em estágio de torpedo é corroborado com os dados oriundos da qPCR, que indicam um aumento no número de transcritos desse gene ao longo do desenvolvimento embrionário zigótico. Nos estágios globular e torpedo o padrão de expressão apresentado por *PeWOX4* é similar ao encontrado para *PeAux/IAA*. Uma vez que os genes *Aux/IAA* estão relacionados com transporte polar de auxina e este está relacionado com a formação do sistema vascular em plantas, tal resultado sugere que *PeWOX4* provavelmente está relacionado com a formação do tecido vascular em tecidos de origem embriogênica e de calo em *P. edulis*.

O terceiro gene analisado durante a embriogênese de *P. edulis* foi o *PeYAB1*. Inicialmente, todos os genes dessa família foram relacionados à determinação da abaxialidade nos mais diferentes órgãos vegetais em *Arabidopsis* (Siegfried et al., 1999). Na verdade, em *Arabidopsis* os genes *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, *YAB2*, *YAB3* e *YAB5* são expressos na região abaxial de órgãos laterais e tem funções redundantes que são essenciais para controlar programas moleculares específicos, como a repressão do meristema apical caulinar e a formação do domínio marginal de folhas (Sarojam et al., 2010). Funções similares desses genes foram descritas também para *Antirrhinum majus* (Yamada et al., 2011). Entretanto, embora o padrão de expressão dos genes *YAB* sejam semelhantes para a maioria das eudicotiledôneas, alguns genes *YAB* presentes em algumas espécies da família Poaceae são expressos adaxialmente, ou com uma expressão mais generalizada ao longo do tecido de órgãos laterais (Zhao et al., 2006; Yamada et al., 2011). Esse contraste no padrão de expressão pode ser atribuído a diferenças presentes nas vias regulatórias presentes em Poaceae e em Eudicotiledôneas (Yamada et al., 2011).

Em *Arabidopsis*, o padrão de expressão de alguns dos genes dessa família é tecido específico, embora alguns deles apresentem similaridade temporal e espacial de expressão. *YAB1* e *YAB3* são expressos durante a embriogênese vegetal, embora a expressão de *YAB1* seja iniciada já no embrião globular enquanto a expressão de *YAB3* inicia-se mais tardiamente, na região cotiledonar do embrião na fase de coração (Siegfried et al., 1999). Goldshmidt et al. (2008) se referem aos genes *FIL* e *YAB3* como pertencentes ao grupo *YAB1* de genes *YAB* por causa da similaridade de sequência entre esses dois genes.

Em *P. edulis* o gene da família *YAB* encontrado no banco de dados Passioma, foi nominado *PeYAB1*. O padrão de expressão observado para *PeYAB1* foi similar ao descrito para *YAB1* de *Arabidopsis*: no estágio globular do embrião zigótico é possível identificar a presença de transcritos nas regiões do embrião que darão origem aos cotilédones. Esse

padrão de expressão é similar ao encontrado para *YAB1* durante a embriogênese de *Arabidopsis* (Siegfried et al., 1999).

No estágio de torpedo do embrião de *P. edulis*, o gene *PeYAB1* é expresso na região superior dos cotilédones, diferenciando um pouco do padrão de expressão encontrado em *Arabidopsis*, onde a expressão de *YAB1* é restrita à região abaxial dos cotilédones. Ainda em *P. edulis*, a expressão de *PeYAB1* no início da formação do arilo e a queda de expressão desse gene em estágios posteriores da formação desta estrutura indicam que esse gene pode também estar atuando na formação do arilo. Tais resultados também fornecem indícios para entender a expressão aumentada desse gene no início do desenvolvimento do embrião zigótico (5 DAP), uma vez que os tecidos utilizados como amostras nas análises de RT-PCR eram as sementes e as estruturas ligadas a ela, como a testa e o arilo. Há grande interesse no estudo do envolvimento do gene *PeYAB1* na formação do arilo, uma vez que esta estrutura não está presente nas sementes de plantas modelo como *Arabidopsis*. Durante a embriogênese somática, o padrão de expressão do gene *PeYAB1* também foi similar ao encontrado na embriogênese zigótica, ficando restrito à região periférica da parte superior do embrião somático.

Embora o foco deste estudo tenha sido o padrão de expressão dos genes analisados em tecidos embrionários zigóticos e somáticos, foi possível observar também o padrão de expressão desses genes em outros tecidos que não os embrionários. O gene *Pe YAB1* teve uma expressão mais ampla em tecidos não embrionários do que os genes *PeAux/IAA* e *PeWOX4*. Isso se deve provavelmente a função vegetativa que este gene apresenta na formação do padrão abaxial nos diferentes tecidos vegetais (Yamada et al., 2011). *PeYAB1* foi expresso em tecidos de calo em todas as etapas do desenvolvimento embrionário somático. Entretanto, no início da formação dos primeiros grupos de células meristemáticas (D10) o gene *PeYAB1* foi desligado (Figura 16). A expressão de *PeYAB1* parece ter delimitado

grupos de células meristemáticas ao longo do calo embriogênico, apresentando expressão nessas regiões apenas depois da formação dos embriões somáticos, durante a determinação dos cotilédones, como discutido anteriormente.

Embora o padrão de expressão de genes *YAB* não seja descrito durante a formação de calo, é possível relacionar os dados obtido neste trabalho com a formação do meristema apical caulinar (MAC). Como descrito anteriormente, além de determinar a região abaxial de diversos órgãos do corpo da planta, os genes *YAB* têm também função na formação do meristema apical caulinar na planta modelo *Arabidopsis* apesar de não serem expressos diretamente nas células meristemáticas. Os genes *YAB* sinalizam para o meristema que as células derivadas do mesmo assumiram identidade foliar. Sem a expressão dos genes *YAB*, a folha perde sua identidade e não se desenvolve de maneira correta, e o meristema perde informações moleculares que auxiliam na delimitação do mesmo, se desenvolvendo de maneira irregular (Sarojam et al., 2010). O padrão de expressão do gene *PeYAB1* nas células que delimitam regiões meristemáticas em tecidos de calo de *P. edulis*, parece descrever uma função similar a encontrada por Sarojam et al. (2010) ainda que o tecido meristemático em questão não seja o MAC. A Figura 20 mostra um esquema descritivo dos padrões de expressão de *PeYAB1* ao longo do desenvolvimento embrionário somático de *P. edulis*, com base nos resultados observados na Figura 16.

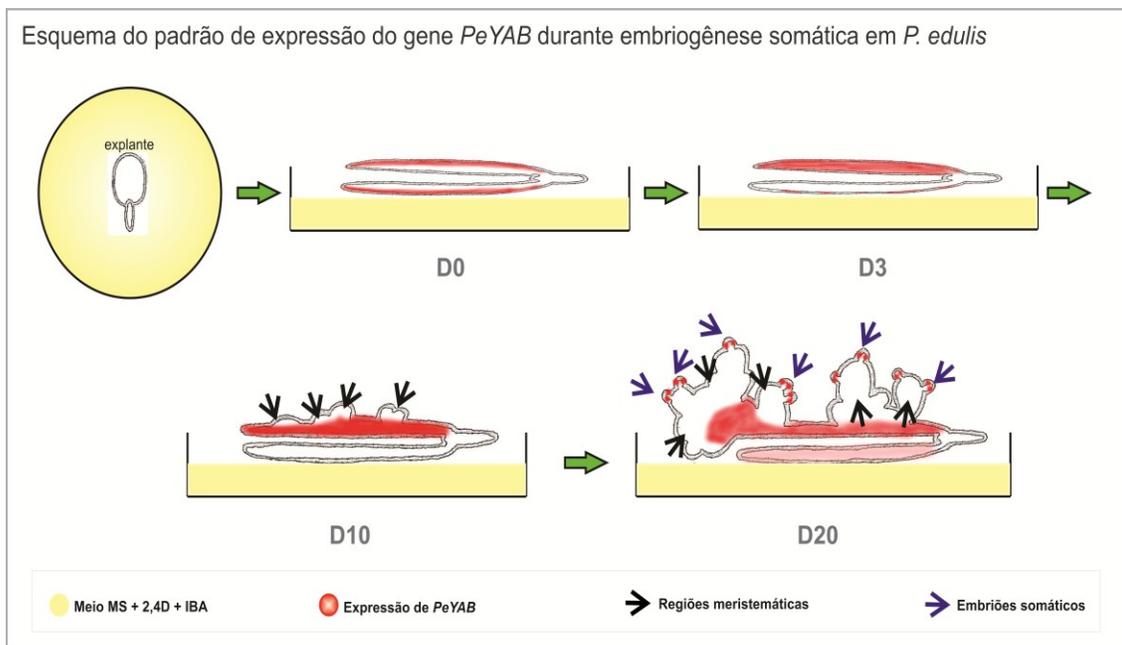


Figura 20 – Esquema demonstrando a indução e a repressão do gene *PeYAB1* durante a indução da embriogênese somática em *Passiflora edulis*. O gene *PeYAB1* passa a se expressar no cotilédone que não está em contato com o meio de cultura, marcando, indiretamente, o local de produção de embriões somáticos. Aos 10 dias (D10), com o início do desenvolvimento de calo, a expressão de *PeYAB1* não é detectada nestes tecidos. Aos 20 dias (D20), com o início da formação de embriões somáticos, a expressão de *PeYAB1* é observada na face abaxial dos embriões globulares.

6. CONCLUSÃO

A descrição morfo-anatômica do embrião zigótico de *P. edulis* culminou com a elaboração de um cronograma que permite a localização temporal dos diferentes estágios da embriogênese zigótica a partir do evento da polinização. Tal cronograma descreve três diferentes etapas ao longo do desenvolvimento embrionário de *P. edulis*: a fecundação, o estabelecimento de meristemas e a maturação da semente. Essa análise também possibilitou a caracterização dos tegumentos que envolvem o embrião, classificando a semente de *P. edulis* como exotegmática, uma vez que a camada que se lignifica ao longo do seu desenvolvimento é o exotégmen.

Além disso, a partir de um levantamento bibliográfico prévio de genes envolvidos com a embriogênese na espécie modelo *Arabidopsis* e a posterior busca por homólogos dos mesmos no banco de dados Passioma, identificou-se três genes potencialmente expressos ao longo da formação do embrião em *P. edulis*: *PeAux/IAA*, *PeWOX4* e *PeYAB1*. Tais genes apresentaram padrões de expressão comparáveis entre si durante a embriogênese zigótica e somática em *P. edulis*. As análises dos padrões espaciais de expressão gênica revelados pela hibridização *in situ*, indicaram que o padrão de expressão dos mesmos se manteve similar durante o início da embriogênese zigótica e somática, embora a expressão dos mesmos tenha também sido detectada em outras células que não as embriogênicas. Dessa maneira, as evidências descritas e discutidas nesse trabalho apontam para uma conservação de mecanismos moleculares responsáveis por eventos importantes da embriogênese zigótica e somática.

7. REFERÊNCIAS

- Agarwal P, Kapoor S, Tyagi AK** (2011) Transcription factors regulating the progression of monocot and dicot seed development. *Bioessays* **33**: 189–202
- Aida M, Ishida T, Tasaka M** (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* **126**: 1563–1570
- Aizza LCB, Dornelas MC** (2011) A genomic approach to study anthocyanin synthesis and flower pigmentation in passionflowers. *Journal of Nucleic Acids* **2011**: 1–17
- Albertini E, Marconi G, Reale L, Barcaccia G, Porceddu A, Ferranti F, Falcinelli M** (2005) *SERK* and *APOSTART*. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiology* **138**: 2185–2199
- Aleith F, Richter G** (1991) Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. *Planta* **183**: 17–24
- Audran-Delalande C, Bassa C, Mila I, Regad F, Zouine M, Bouzayen M** (2012) Genome-wide identification, functional analysis and expression profiling of the *Aux/IAA* gene family in tomato. *Plant & Cell Physiology* **53**: 659–672
- Becraft PW** (2002) Receptor kinase signaling in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **18**: 163–192
- Bicknell RA, Koltunow AM** (2004) Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell* **16**: S228–S246
- Bilsborough GD, Runions A, Barkoulas M, Jenkins HW, Hasson A, Galinha C** (2011) Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 3424–3429
- Bowman JL** (2000) The YABBY gene family and abaxial cell fate. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 17–22
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J** (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant cell* **13**: 1499–1510
- Braybrook S a, Stone SL, Park S, Bui AQ, Le BH, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2006) Genes directly regulated by *LEAFY COTYLEDON2* provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3468–3473
- Braybrook SA, Harada JJ** (2008) LECs go crazy in embryo development. *Cell* **13**: 624–630

- Casson S a, Lindsey K** (2006) The turnip mutant of *Arabidopsis* reveals that LEAFY COTYLEDON1 expression mediates the effects of auxin and sugars to promote embryonic cell identity. *Plant Physiology* **142**: 526–41
- Cazoto JL, Dornelas MC** (2009) A matter of place and time: Common molecular mechanisms in plant organogenesis and embryogenesis. *Advances in Plant Physiology*. p 613
- Chandler J, Nardmann J, Werr W** (2008) Plant development revolves around axes. *Trends in Plant Science* **13**: 78–84
- Chapman EJ, Estelle M** (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual Review of Genetics* **43**: 265–285
- Cutri L, Dornelas MC** (2012) PASSIOMA: Exploring Expressed Sequence Tags during Flower Development in *Passiflora* spp. *Comparative and Functional Genomics* **2012**: 1–11
- Dettmer J, Friml J** (2011) Cell polarity in plants: when two do the same, it is not the same. *Current Opinion in Cell Biology* **23**: 1–11
- Deveaux Y, Toffano-Nioche C, Claisse G, Thareau V, Morin H, Laufs P, Moreau H, Kreis M, Lecharny A** (2008) Genes of the most conserved WOX clade in plants affect root and flower development in *Arabidopsis*. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 291
- Dornelas MC, Tsai SM, Rodriguez APM** (2006) Expressed sequence tags of genes involved in the flowering process of *Passiflora* spp. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* **I**: 483–488
- Dornelas MC, Wittich P, von Recklinghausen I, van Lammeren A, Kreis M** (1999) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. *Plant Molecular Biology* **39**: 137–47
- Fambrini M, Durante C, Cionini G, Geri C, Giorgetti L, Michelotti V** (2006) Characterization of LEAFY COTYLEDON1-LIKE gene in *Helianthus annuus* and its relationship with zygotic and somatic embryogenesis. *Development Genes Evolution* **216**: 253–264
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD, Fenster B, Dudash R, Thomson D** (2004) Pollination and floral syndromes. *Annual Review Ecological Evolution System* **35**: 375–403
- Friml J** (2003) Auxin transport - shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 7–12
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 147–153
- Gaj MD, Zhang AES, Harada AEJJ, Lemaux PG** (2005) Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* **222**: 977–988

- Garces HMP, Champagne CEM, Townsley BT, Park S, Malho R, Pedroso MC, Garce HMP, Harada JJ, Sinha NR** (2007) Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalchoë*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**: 15578–15583
- Goldshmidt A, Alvarez JP, Bowman JL, Eshed Y** (2008) Signals derived from YABBY gene activities in organ primordia regulate growth and partitioning of Arabidopsis shoot apical meristems. The Plant Cell **20**: 1217–1230
- Gordon S, Heisler M, Reddy G, Ohno C, Meyerowitz E** (2007) Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. Development **134**: 3539–3548
- Graaff EVD, Laux T, Rensing SA** (2009) Protein family review The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. Genome Biology **10**: 1–9
- Haecker A, Groß-hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T** (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. Development **131**: 657–668
- Hamann T, Benkova E, Bäurle I, Kientz M, Jürgens G** (2002) The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting *MONOPTEROS*-mediated embryo patterning. Genes & Development **16**: 1610–1615
- Hecht V, Vielle-Calzada J-P, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U, Vries SCD** (2001) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. Plant Physiology **127**: 803–816
- Huber J, Parker F, Odland G** (1968) A basic fuchsin alkalized methylene blue rapid stain for epoxy-embedded tissue. Stain Technology **43**: 83–87
- Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H** (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **34**: 107–114
- Jain M, Kaur N, Garg R** (2006) Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). Functional Integrative Genomics **6**: 47–59
- Jansen L, Roberts I, De Rycke R, Beeckman T** (2012) Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences **367**: 1525–1533
- Jenik PD, Gillmor CS, Lukowitz W** (2007) Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. Annual Review of Cell and Developmental Biology **23**: 207–236
- Jeong S, Bayer M, Lukowitz W** (2011) Taking the very first steps: from polarity to axial domains in the early *Arabidopsis* embryo. Journal of Experimental Botany **62**: 1687–1697

- Ji J, Shimizu R, Sinha N, Scanlon MJ** (2010) WOX4 promotes procambial development. *Plant Signaling & Behavior* **152**: 1346–1356
- Jong AJ, Schmidt EDL, Vries SC** (1993) Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology* **22**: 367–377
- Kawashima T, Goldberg RB** (2010) The suspensor: not just suspending the embryo. *Trends in Plant Science* **15**: 23–30
- Keith K, Kraml M, Dengler NG, McCourt P** (1994) *fusca3*: A heterochronic mutation affecting late embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**: 589–600
- Kepinski S, Leyser O** (2004) Auxin-induced SCFTIR1-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCFTIR1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 12381–12386
- Koltunow AM, Grossniklaus U** (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 547–574
- Kwong RW, Bui AQ, Lee H, Kwong LW, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2003) LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *The Plant Cell* **15**: 5–18
- Little E, Magbanua Z, Parrott W** (2000) A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. *Plant Cell Reports* **19**: 351–357
- Long J, Woody S, Poethig S, Meyerowitz EM, Barton MK** (2002) Transformation of shoots into roots in *Arabidopsis* embryos mutant at the TOPLESS locus. *Development* **129**: 2797–2306
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West M a, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**: 1195–1205
- Mayer U, Büttner G, Jürgens G** (1993) Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* **117**: 149–162
- Meinke DW** (1992) A homoeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science* **258**: 1647–50
- Meinke DW** (1991) Perspectives on genetic analysis of plant embryogenesis. *The Plant Cell* **3**: 857–866
- Mockaitis K, Estelle M** (2008) Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24**: 55–80
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497

- Nakajima K, Uchiumi T, Okamoto T** (2010) Positional relationship between the gamete fusion site and the first division plane in the rice zygote. *Journal of Experimental Botany* **61**: 3101 – 3105
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ** (2003) Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology* **133**: 218–230
- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ** (2009) Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR- LIKE KINASE1 (SERK1)* gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1759–1771
- Ohashi-Ito K, Fukuda H** (2010) Transcriptional regulation of vascular cell fates. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 670–676
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T** (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**: 1–16
- Pinto DLP, Almeida AMR, Rêgo MM, Silva ML, Oliveira EJ, Otoni WC** (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **107**: 521–530
- Poole RL** (2007) The TAIR database. *Methods Molecular Biology* **406**: 179–212
- Raz V, Bergervoet JH, Koornneef M** (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* **128**: 243–252
- Reinhardt D, Frenz M, Mandel T, Kuhlemeier C** (2003) Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development* **130**: 4073–4083
- Salaj J, Recklinghausen IRV, Hecht V, Vries SCD, Schel JHN, Lammeren AA** (2008) *AtSERK1* expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 709–714
- Sarojam R, Sappl PG, Goldshmidt A, Efroni I, Floyd SK, Eshed Y, Bowman JL** (2010) Differentiating *Arabidopsis* shoots from leaves by combined YABBY activities. *The Plant Cell* **22**: 2113–2130
- Schmidt ED, Guzzo F, Toonen M a, de Vries SC** (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* **124**: 2049–2062
- Seymour G, Poole M, Manning K, King GJ** (2008) Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 58–63

- Siegfried KR, Eshed Y, Baum SF, Otsuga D, Drews GN, Bowman JL** (1999) Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* **126**: 4117–4128
- Singh S, Dhyani D, Ahuja PS** (2011) Apomixis in Plants - Embryology, genetics and molecular basis. *Journal of Cell and Plant Sciences* **2**: 24–31
- Singla B, Khurana JP, Khurana P** (2008) Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports* **27**: 833–843
- De Smet I, Lau S, Mayer U, Jürgens G** (2010) Embryogenesis - the humble beginnings of plant life. *The Plant Journal* **61**: 959–70
- Smith BW** (1956) *Arachis hypogaea*. Embryogeny and the effect of peg elongation upon embryo and endosperm growth. *American Journal of Botany* **43**: 233–240
- Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC** (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. *Plant Cell Reports* **19**: 718–726
- Stamp JA** (1986) Somatic Embryogenesis in Cassava: The anatomy and morphology of the regeneration process. *Annals of Botany* **59**: 451–459
- Stone SL, Braybrook SA, Paula SL, Kwong LW, Meuser J, Pelletier J, Hsieh T, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2008) *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON2* induces maturation traits and auxin activity : Implications for somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 3151–3156
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 11806–11811
- Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill SD, Zhang XS** (2009) Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **59**: 448–460
- Suer S, Agusti J, Sanchez P, Schwarz M, Greb T** (2011) *WOX4* imparts auxin responsiveness to cambium cells in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**: 3247–3259
- Thomas C, Meyer D, Hember C, Steinmetz A** (2004) Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 35–42
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680

- Toriba T, Harada K, Takamura A, Nakamura H, Ichikawa S, Suzaki T, Hirano H** (2007) Molecular characterization the *YABBY* gene family in *Oryza sativa* and expression analysis of *OsYABBY1*. *Molecular Genetics and Genomics* 1–18
- Tucker MR, Araujo AG, Paech NA, Hecht V, Schmidt EDL, Rossell J, Vries SCD, Koltunow AMG** (2003) Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. *The Plant Cell* **15**: 1524–1537
- Ueda M, Laux T** (2012) The origin of the plant body axis. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 1–7
- Ulmer T, MacDougal J** (2004) *Passiflora*: Passionflowers of the world. Timber press, Portland
- Veit B** (2004) Determination of cell fate in apical meristems. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 57–64
- Weijers D, Benkova E, Jäger KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC, Reed JW, Jürgens G** (2005) Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *The EMBO Journal* **24**: 1874–1885
- Yadegari R, Drews GN** (2004) Female gametophyte development. *The Plant Cell* **16**: S133–S142
- Yamada T, Yokota S, Hirayama Y, Imaichi R, Kato M, Gasser CS** (2011) Ancestral expression patterns and evolutionary diversification of *YABBY* genes in angiosperms. *The Plant Journal* **67**: 26–36
- Yang X, Zhang X** (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**: 36–57
- Zhang S, Wong AEL, Meng AEL, Lemaux PG** (2002) Similarity of expression patterns of *knotted1* and *ZmLEC1* during somatic and zygotic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Planta* **215**: 191–194
- Zhang X, Zong J, Liu J, Yin J, Zhang D** (2010) Genome-wide analysis of *WOX* gene family in rice, sorghum, maize, *Arabidopsis* and Poplar. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**: 1016–1026
- Zhang Z, Laux T** (2011) The asymmetric division of the *Arabidopsis* zygote: from cell polarity to an embryo axis. *Sexual Plant Reproduction* **24**: 161–9
- Zhao W, Su HY, Song J, Zhao XY, Zhang XS** (2006) Ectopic expression of TaYAB1, a member of YABBY gene family in wheat, causes the partial abaxialization of the adaxial epidermises of leaves and arrests the development of shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Science* **170**: 364–371
- Zhao Y** (2008) The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 16–22